



**HAL**  
open science

**Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy**

Clément Debiton

► **To cite this version:**

Clément Debiton. Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2010. Français. NNT : 2010CLF22067 . tel-00625530

**HAL Id: tel-00625530**

**<https://theses.hal.science/tel-00625530v1>**

Submitted on 21 Sep 2011

**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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
N° D.U. : 2067

UNIVERSITE D'AUVERGNE  
ANNEE 2010

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE,  
DE LA SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT  
N° 530

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE  
(Specialité : physiologie et génétique moléculaires)

soutenue le 17 Novembre 2010

**Clément DEBITON**

---

**Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.)  
favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de  
cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy**

---

<b>Président :</b>	Mohamed Fouad BOUZIDI	Professeur, UBP, Clermont Ferrand
<b>Rapporteurs :</b>	Véronique PLANCHOT	Directeur de recherche, INRA, Nantes
	Michel ROSSIGNOL	Directeur de recherche, INRA, Montpellier
<b>Examineurs :</b>	Pascale GADONNA	Maître de conférence, IPLB, Beauvais
	Philippe LEREBOUR	Directeur d'Unisigma GIE, Froissy
<b>Directeur de thèse :</b>	Gérard BRANLARD	Directeur de recherche, INRA, Clermont-Ferrand

Unité Mixte de Recherche 1095 INRA-Université Blaise Pascal  
« Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales » - 63100 Clermont-Ferrand

## **REMERCIEMENTS**

Dans ces quelques lignes je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué à l'élaboration de cette thèse.

Je souhaite tout d'abord remercier Gérard Branlard, Philippe Lerebour, et Fouad Bouzidi d'avoir accepté d'encadrer cette thèse.

Je remercie tous les membres du CETAC (Caussade semences, Lemaire Deffontaines, Momont et Fils, R2N, Saaten Union Recherche, Secobra recherches, Unisigma GIE) ainsi que l'Institut Polytechnique Lasalle Beauvais (Thierry Aussenac, Pascale Gadonna, Larbi Rhazi et David Marier) pour leur participation dans ce projet.

Je tiens à remercier tout particulièrement Emmanuelle Bancel ainsi que toutes les personnes de l'équipe protéomique de l'INRA de Clermont-Ferrand (Marielle Merlino, Isabelle Nadaud, Annie Faye, René Saccomano) pour leur soutien et leur gentillesse durant cette thèse.

Merci à tous les stagiaires et non titulaires, Bastien, Aurélie, Sébastien, Géraldine, Ayesha et Leonor pour leur aide précieuse.

Je souhaite enfin remercier les membres du comité de thèse pour leur suivi des recherches, et les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail.

# SOMMAIRE

<b>I. TRAVAUX ANTÉRIEURS</b> .....	1
<b>A. LE BLÉ : ORIGINE, STRUCTURE, COMPOSITION, UTILISATIONS</b> .....	2
1. Définition et origine .....	2
2. Structure et composition du grain de blé.....	2
2.1 Les enveloppes et la couche à aleurone .....	2
2.2 Le germe.....	4
2.3 L'albumen .....	4
3. Les protéines du grain de blé.....	5
3.1 Les protéines métaboliques .....	5
3.2 Les protéines de réserves.....	6
4. Production et utilisations du blé .....	7
4.1 La production du blé .....	7
4.2 Les utilisations du blé.....	7
<b>B. LES BIOCARBURANTS</b> .....	8
1. Définition des biocarburants .....	8
2. Les enjeux du développement des biocarburants .....	9
2.1 Les exigences du protocole de Kyoto .....	9
2.2 La dépendance énergétique .....	10
2.3 Une nouvelle filière agroindustrielle créatrice d'emploi.....	11
3. La production de biocarburants dans le monde.....	11
3.1 La production de biodiesel .....	11
3.2 La production de bioéthanol.....	11
4. Processus de fabrication du bioéthanol .....	12
4.1 Le broyage.....	12
4.2 Gélatinisation et liquéfaction .....	13
4.3 La saccharification .....	13
4.4 La fermentation .....	14
4.5 La distillation et la déshydratation .....	14
5. Développement et limite de la production de bioéthanol.....	14
<b>C. QUEL BLÉ POUR LA PRODUCTION DE BIOÉTHANOL ?</b> .....	15
1. L'amidon et le taux de protéines : deux paramètres fortement corrélés au rendement en bioéthanol.....	15
1.1 L'amidon et les sucres.....	15
1.2 Le taux de protéines .....	16
2. Les paramètres du grain pouvant avoir un effet sur la production de bioéthanol .....	16
2.1 La composition de l'amidon.....	16
2.2 La dureté et la distribution de la taille des granules d'amidon.....	17
2.3 L'activité alpha amylasique.....	17
2.4 Les polyssacharides autres que l'amidon (NSP).....	17

D. STRUCTURE ET COMPOSITION DE L'AMIDON .....	19
1. Composition de l'amidon .....	19
1.1 L'amylose.....	19
1.2 L'amylopectine.....	19
1.3 Les composés minoritaires de l'amidon.....	20
2. Structure de l'amidon .....	21
2.1 A l'échelle 1-100 µm : le granule d'amidon .....	21
2.2 A l'échelle 120-500 nm : les cercles de croissance.....	22
2.3 A l'échelle 20-500 nm : les blocklets.....	22
2.4 A l'échelle 9 nm : les lamelles amorphes et cristallines .....	22
3. La structure semi-cristalline .....	22
3.1 La phase cristalline.....	22
3.2 La phase amorphe.....	23
4. Changement d'état de l'amidon en fonction de la température et de l'humidité.....	23
4.1 La gélatinisation .....	24
4.2 La rétrogradation .....	25
E. LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE L'AMIDON .....	26
1. L'ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase).....	27
1.1 Généralités.....	27
1.2 Rôle de l'AGPase .....	28
1.3 Régulation de l'AGPase .....	28
1.4 Le transporteur de l'ADP-glucose à travers la membrane du plastide chez les céréales .....	29
2. Les starch synthases .....	30
2.1 GBSS .....	31
2.2 Les starch synthases SSI .....	33
2.3 Les starch synthases SSII .....	34
2.4 Les starch synthases SSIII.....	35
2.5 La starch synthase SSIV .....	36
3. Les branching enzymes .....	36
3.1 Généralités.....	37
3.2 Propriétés.....	37
4. Les starch debranching enzymes.....	38
4.1 Généralités.....	38
4.2 Propriétés.....	39
5. Les autres enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon .....	40
5.1 La starch phosphorylase .....	40
5.2 La glucane water dikinase .....	41
5.3 La D-enzyme .....	41
5.4 L'amylogénine, un homologue de la glycogénine .....	42
6. Modèle de synthèse de l'amylopectine et de l'amylose .....	43
6.1 La synthèse de l'amylopectine .....	43
6.2 La synthèse de l'amylose .....	44
<b>II. PROBLÉMATIQUE DE LA THÈSE .....</b>	<b>45</b>

<b>III. DÉTERMINATION D'UN IDÉOTYPE DE BLÉ DESTINÉ À LA PRODUCTION DE BIOÉTHANOL</b> .....	50
A. INTRODUCTION .....	51
B. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	53
1. Matériel végétal et dispositif expérimental .....	53
2. Caractérisation des grains de blé .....	53
3. Dureté et teneur en protéines .....	54
4. Composition allélique des sous unités de haut et faible poids moléculaire .....	54
5. Distribution de la taille des granules d'amidon .....	54
6. Rendement en éthanol et glucose .....	55
7. Tests statistiques .....	56
C. RÉSULTATS .....	57
1. Description des variétés françaises pour les caractéristiques physicochimiques et technologiques du grain .....	57
1.1 Amplitude des variations observées .....	57
1.2 Analyse de variance sur les variétés françaises .....	58
1.3 L'analyse en composantes principales .....	58
1.4 Les corrélations entre les différentes variables .....	59
1.5 Les corrélations avec les rendements en glucose et en éthanol .....	60
1.6 Effet des allèles de gluténines de haut et faible poids moléculaire sur le rendement en glucose et éthanol. ....	62
2. Description des lignées isogéniques pour les caractéristiques physicochimiques et technologiques du grain .....	63
2.1 Amplitude des variations observées .....	63
2.2 Analyse de variance sur les lignées isogéniques waxy .....	65
2.3 Analyses en composantes principales des lignées isogéniques Soissons, Trémie et Crousty .....	66
2.4 Analyses en composantes principales sur les lignées isogéniques de Trémie et leur rendement en glucose et éthanol. ....	66
2.5 Les corrélations avec les rendements en glucose et éthanol .....	67
D. DISCUSSION .....	68
1. Les ACP des variétés françaises donnent un aperçu des relations entre les différentes variables et le rendement en éthanol .....	68
1.1 Premier axe : La relation entre la dureté et la taille des granules d'amidon .....	68
1.2 Deuxième axe : les rendements en glucose et en éthanol, le PMG et le taux de protéines .....	69
2. Le temps de chute de Hagberg faible chez les lignées isogéniques triples nulles .....	69
3. L'effet des allèles des sous unités de gluténines de haut et faible poids moléculaire sur les rendements en glucose et en éthanol .....	69
4. Les caractéristiques du grain corrélées aux rendements en glucose et en éthanol .....	71
5. Les lignées waxy de Trémie et le rendement en glucose .....	72
6. Brève conclusion .....	73

<b>IV. PRINCIPE DE L'ANALYSE PROTÉOMIQUE.....</b>	<b>74</b>
A. DÉFINITION .....	75
B. PRINCIPALES ÉTAPES DE L'ANALYSE PROTÉOMIQUE.....	75
1. Extraction et solubilisation des protéines.....	75
2. Le dosage des protéines.....	76
3. L'électrophorèse bidimensionnelle .....	76
3.1 La première dimension : l'électrofocalisation.....	76
3.2 La deuxième dimension : l'électrophorèse SDS-PAGE .....	77
4. La coloration des gels.....	77
5. L'analyse d'image .....	78
6. L'identification des protéines par spectrométrie de masse .....	78
6.1 L'ionisation des échantillons.....	78
6.2 L'analyse des ions chargés .....	79
6.3 L'analyse des banques de données.....	79
<b>V. ANALYSES PROTÉOMIQUES DES ALBUMINES, GLOBULINES ET PROTÉINES AMPHIPHILES DES LIGNÉES ISOGÉNIQUES WAXY.....</b>	<b>81</b>
A. ABSTRACT .....	83
B. INTRODUCTION .....	84
C. EXPERIMENTAL.....	85
1. Plant material.....	85
2. Protein extraction .....	86
2.1 Albumins-globulins extraction.....	86
2.2 Amphiphilic proteins extraction.....	86
3. Bi-dimensional electrophoresis .....	87
4. Image analysis .....	88
5. Protein identification .....	88
6. Grain and starch granule characterization.....	89
7. Determination of sugar content .....	90
8. Susy and AGPase activities.....	90
D. RESULTS.....	91
1. Protein variations in the albumin-globulin fraction .....	91
2. Protein variations in the amphiphilic fraction .....	93
3. Sugar content, Susy activity and AGPase activity .....	95
E. DISCUSSION .....	95
F. REFERENCES.....	100
<b>VI. EFFETS DES TROIS ALLÈLES NULS DES GÈNES WAXY SUR LES ENZYMES ASSOCIÉES AUX GRANULES D'AMIDON .....</b>	<b>104</b>
A. ABSTRACT .....	106
B. INTRODUCTION .....	107
C. EXPERIMENTAL.....	108
1. Plant material.....	108
2. Purification of starch granules.....	109
3. Protein extraction for one dimensional electrophoresis .....	109
4. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis.....	110
5. Two-dimensional electrophoresis .....	110

6. Image analysis .....	111
7. Protein identification .....	111
8. Amylose determination .....	113
<b>D. RESULTS</b> .....	113
1. One dimensional gel electrophoresis.....	113
2. Protein variation on the 2DE gels .....	114
3. Protein identification .....	115
<b>E. DISCUSSION</b> .....	117
<b>F. REFERENCES</b> .....	122
<b>VII. DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	125
<b>A. DÉTERMINATION D'UN TYPE DE BLÉ ADAPTÉ À LA PRODUCTION DE BIOETHANOL</b> .....	126
1. Le taux de protéines : indicateur de la quantité de sucres fermentescibles.....	126
2. La dureté et la distribution des granules d'amidon : impacts sur l'efficacité d'hydrolyse.....	127
3. La composition en protéines de réserves et la teneur en arabinoxylanes : deux paramètres à considérer .....	128
4. Les lignées isogéniques waxy et les rendements en glucose et éthanol.....	129
<b>B. EFFETS DES ALLÈLES NULS WAXY SUR LA PHYSIOLOGIE DU GRAIN DE BLÉ</b> .....	130
1. Effets des allèles nuls des trois gènes <i>waxy</i> sur les enzymes associées aux granules d'amidon.....	130
2. Effets des allèles nuls sur le métabolisme des sucres et de l'amidon .....	132
<b>VIII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>IX. ANNEXES</b>	
A. ANNEXES DES VARIÉTÉS FRANÇAISES	
B. ANNEXES DES LIGNÉES ISOGÉNIQUES WAXY	

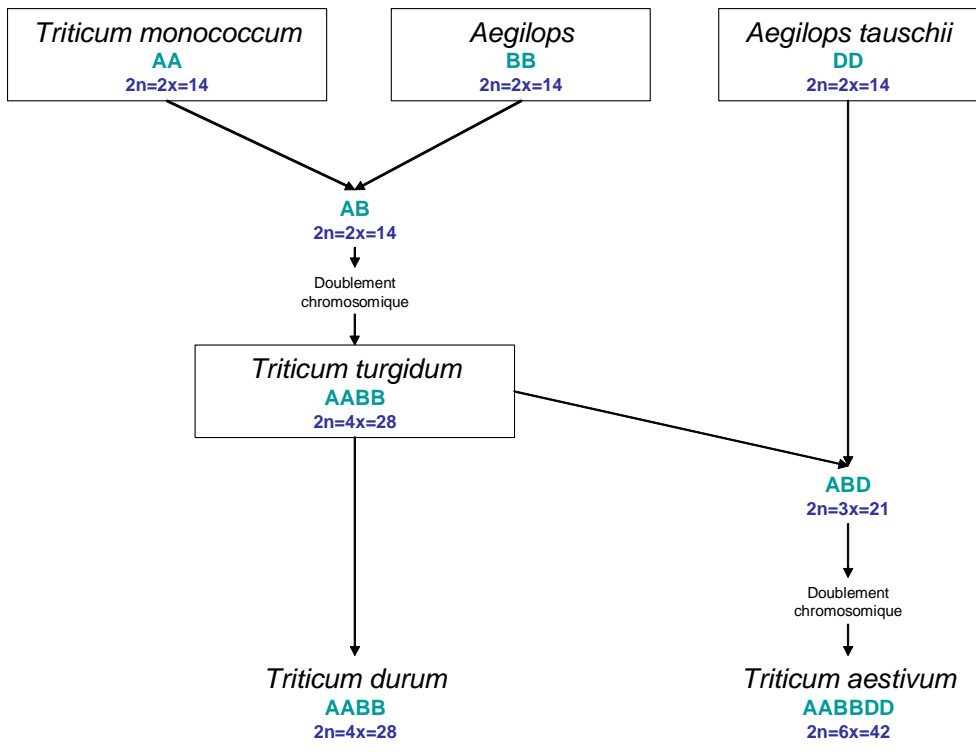


## ABRÉVIATIONS

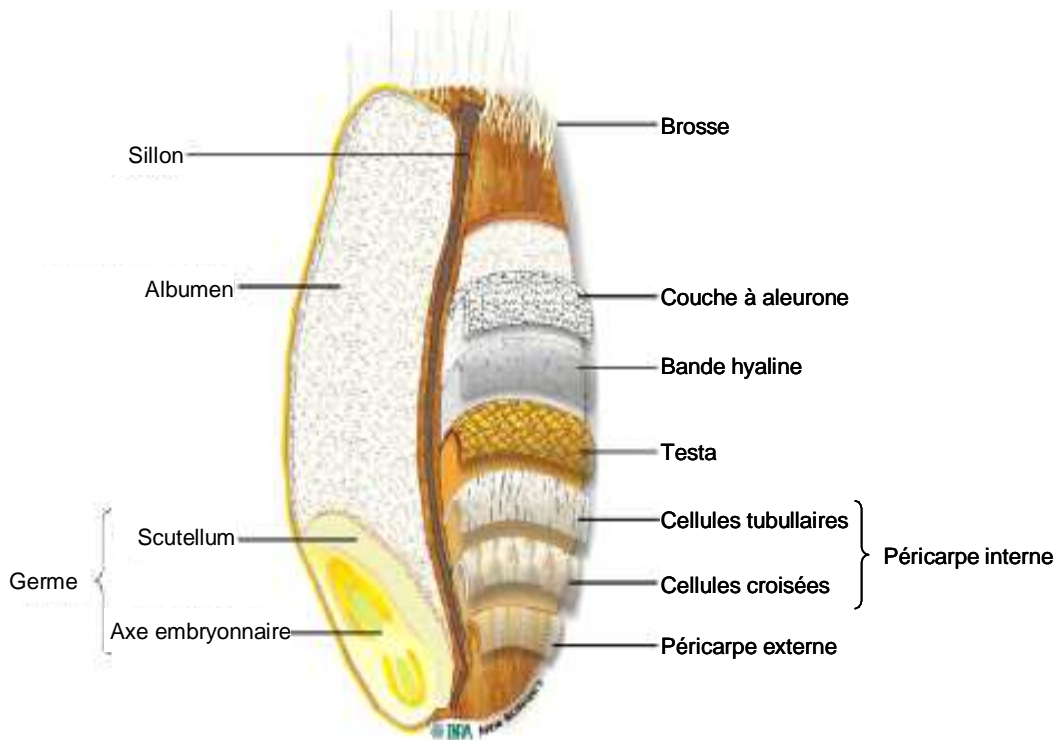
2DE	2-dimensional electrophoresis
3-PGA	Acide 3 phosphoglycérique
AACC	American Association of Cereal Chemists
ACP	Analyse en composantes principales
ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADP	Adenosine diphosphate
ADPGlc	Adenosine diphosphate glucose
AF	Autofécondation, autofécondé
AGPase	ADP-Glucose pyrophosphorylase;
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosine triphosphate
BC	Backcross
BE	Branching enzyme
CAU	Caussade
CFD	Clermont-Ferrand
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate;
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Études de la Pollution Atmosphérique
DAF	Day after flowering (jour après floraison)
DArT	Diversity Arrays Technology
DBE	Debranching enzyme
D-enzyme	D disproportionating enzyme
DP	Degré de polymérisation
DTT	Dithiothreitol
DW	Dry Weight
E2D	Electrophorèse bidimensionnelle
EBI	European Bioinformatics Institute
Ebio	European bioethanol fuel association
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EMHV	Ester méthylique d'huile végétale
EST	Expressed sequence tag
ETBE	Ethyle Tertio Butyl ether
Frc 6P	Fructose 6 phosphate
GBSS	Granule Bound Starch Synthase
GES	Gaz à effets de serre
GFP	Green fluorescent protein
GLM	General linear model
Glc 1P	Glucose 1 phosphate
Glc 6P	Glucose 6 phosphate
GWD	Glucan water dikinase
HCA	Hierarchical Clustering Analysis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

IPG	Immobiline pH Gradient
JRC	Joint Research Center
KO	Knock Out
LC-MSMS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LeD	Lemaire Deffontaines
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight
MOM	Momont
MOS	oligosaccharide de maltose
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDP	Nucléoside diphosphate
NIL	Near Isogenic Lines
NSP	Non Starch Polysaccharide
NYMEX	New York Mercantile Exchange
ONIGC	Office national interprofessionnel des grandes cultures
PGM	Phosphoglucomutase
pI	Point Isoélectrique
Pi	Phosphate inorganique
PM	Poids Moléculaire
PMG	Poids de mille grains
Ppi	inorganic pyrophosphate
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
PWD	Phosphoglucan water dikinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SEC	Secobra
SG-FPM	Sous-unités gluténines de faible poids moléculaire
SG-HPM	Sous-unités gluténines de haut poids moléculaire
SGP	Starch granule protein
SRS	Sequence retrieval System
SS	Starch synthase
SSR	Simple sequence repeats
Susy	Sucrose synthase
TKW	Thousand Kernel Weight
UDP	Uridine diphosphate
UDPGlc	Uridine diphosphate glucose
UNI	Unisigma
UTP	Uridine triphosphate
WTI	World Texas Intermediate
Wx	Waxy

# **I. TRAVAUX ANTÉRIEURS**



**Figure 1.** Phylogénie du blé tendre.



**Figure 2.** Histologie du grain de blé (Surget et Barron, 2005).

## A. LE BLÉ : ORIGINE, STRUCTURE, COMPOSITION, UTILISATIONS

### 1. Définition et origine

Le blé est une monocotylédone de la famille des *Poaceae* appartenant au genre *Triticum*. Cette plante annuelle produit un fruit sec indéhiscant, le caryopse. Le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) sont les deux espèces les plus cultivées dans le monde. Le blé tendre est constitué de trois génomes possédant chacun 7 paires de chromosomes homéologues, soit 42 chromosomes au total. Il possède une structure génomique hexaploïde (**AA BB DD**) et le blé dur une structure tétraploïde (**AA BB**).

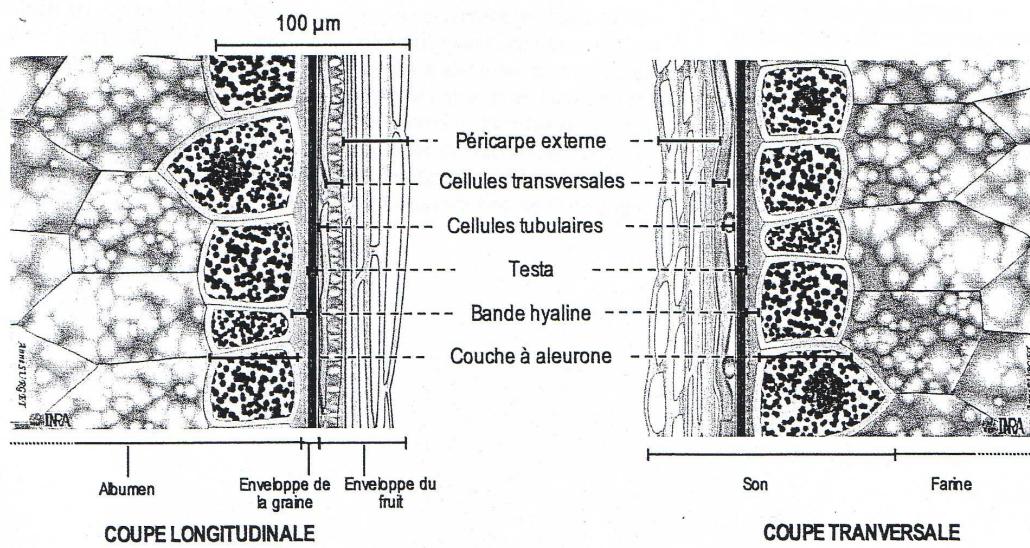
Le blé tendre d'un point de vue phylogénétique est issu de deux hybridations interspécifiques suivi d'un doublement chromosomique (Figure 1). Le croisement entre *Triticum monococcum* (**A**) et un *Aegilops* (**B**) a donné un individu de structure génomique (**AB**) avec 14 chromosomes. Après doublement chromosomique est apparu *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccoides* (**AA BB**), ancêtre du blé dur (Chapman, 2009 ; Chen et al., 1984 ; Gill et Kimber, 1974). Le second croisement interspécifique a eu lieu entre *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccoides* et *Aegilops tauschii* (**D**) ce qui a donné un individu (**ABD**) possédant 21 chromosomes. Ce dernier a lui aussi subi un doublement chromosomique (**AA BB DD**) et est l'ancêtre de *Triticum aestivum*.

### 2. Structure et composition du grain de blé

Le grain de blé est constitué de 3 grandes parties : le germe, l'albumen et les enveloppes. (Figure 2). Il est constitué majoritairement d'amidon qui représente environ 70% de la matière sèche du grain et qui est situé dans l'albumen. Les protéines représentent entre 10 et 15% de la matière sèche et se retrouvent dans tous les tissus du grain de blé avec une concentration plus importante dans le germe et la couche à aleurone (Pomeranz, 1988). Les pentosanes (polysaccharides non amylicés) représentent quant à eux entre 2 et 3% de la matière sèche et sont les principaux constituants des parois cellulaires de l'albumen (70 à 80%).

#### 2.1 Les enveloppes et la couche à aleurone

Les enveloppes sont constituées de quatre tissus : le péricarpe externe, le péricarpe interne, la testa et la couche nucellaire ou bande hyaline (qui correspond à l'épiderme du nucelle). Ces enveloppes et la couche à aleurone sont composées principalement de polysaccharides (arabinoxylanes, xyloglucanes et cellulose) mais aussi d'acides phénoliques,



**Figure 3 :** Couches cellulaires du grain de blé (Surget et Barron, 2005).

lignine et de protéines (principalement albumines globulines localisées dans la couche à aleurone) (Figure 3).

Le péricarpe externe d'une épaisseur de 15-30 $\mu$ m correspond à l'épiderme et est constitué de deux tissus composés de cellules mortes : l'épiderme et l'hypoderme. L'épiderme est constitué de cellules allongées mesurant 80 à 300 $\mu$ m (Bradbury, 1956) et disposées selon l'axe embryonnaire. L'hypoderme possède la même structure que l'épiderme et lui est fortement adhérent. Le péricarpe externe est constitué de 45% d'arabinoxylane, 25% de glucose, 10% de lignine et 6-7% de protéines (Pomeranz, 1988 ; Surget et Barron, 2005).

Le péricarpe interne correspond à l'endocarpe et au mésocarpe, respectivement constitués de cellules tubulaires et de cellules croisées. Les cellules croisées sont perpendiculaires à l'axe longitudinal du grain tandis que les cellules tubulaires lui sont parallèles. Les cellules croisées sont de tailles variables mesurant en moyenne 150 $\mu$ m de longueur sur 20 $\mu$ m de largeur.

Chez le blé, la continuité entre les cellules croisées et le péricarpe externe est interrompue au niveau de l'arête dorsale du grain du fait de l'autolyse des cellules parachymateuses lors de la maturation.

Le péricarpe permet d'éviter les pertes d'eau durant le développement du grain mais n'empêche pas sa pénétration (Evers et al., 1999). Les cellules mortes du péricarpe sont capables de retenir l'eau et d'augmenter le poids du grain de 4-5% après seulement quelques minutes d'imbibition (Hinton, 1955).

La testa correspond au spermodermes. Sa face interne repose sur la cuticule de la couche hyaline. Elle est constituée de deux cuticules compressées riches en lipides et composées de cellules allongées mesurant entre 120 et 190 $\mu$ m de longueur et 20 $\mu$ m de largeur (Bradbury et al., 1956) qui fusionnent avec un film pigmentaire. Les axes des cellules de ces deux couches sont perpendiculaires ; l'un parallèle au sillon, l'autre perpendiculaire à celui-ci (Evers et Bechtel, 1988). La testa est décrite comme très hydrophobe.

La couche nucellaire ou bande hyaline correspond au périsperme. Son épaisseur est d'environ 20 $\mu$ m. Elle est constituée d'une assise cellulaire tassée due au remplissage de l'albumen amylicé et au développement de l'embryon (Fulcher et Wong, 1980). Elle est composée de cellules de taille comprise entre 30 et 200 $\mu$ m de longueur et 15 à 40 $\mu$ m de largeur. Cette couche est tapissée d'une fine cuticule qui la relie à la couche à aleurone aussi

appelée couche du lysat nucellaire. Cette bande hyaline est très hydrophobe et semble avoir un rôle important dans la circulation de l'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la graine.

Une seule couche à aleurone entoure l'albumen amylicé chez le blé. Elle est, avec le germe, la seule partie du grain constituée de cellules vivantes. Les cellules de la couche à aleurone sont de forme polygonale et mesurent approximativement 65µm. Elles possèdent de gros noyaux, des parois épaisses (jusqu'à 8µm) et sont riches en vitamines (B1, B2, B3, B6, B9 et E) et en minéraux (P, K, Mg, Mn et Fe) (Pomeranz, 1988 ; Antoine et al., 2002 ; McKevith, 2004). La couche à aleurone par sa richesse en métabolites a un rôle nourricier et par sa structure un rôle de protection.

## 2.2 Le germe

Le germe provient de la fusion des gamètes mâles et femelles. Il est constitué d'une part, de l'axe embryonnaire qui donnera la tigelle, le mésocotyle et la radicule et d'autre part du scutellum qui donnera le cotylédon (Evers et Millar, 2002 ; Surget et Barron, 2005). Le germe est la partie du grain où le taux d'humidité et la concentration en lipides sont les plus importantes (Pomeranz, 1988). Les protéines dans le germe sont des albumines et globulines et représentent environ 35% de la matière sèche.

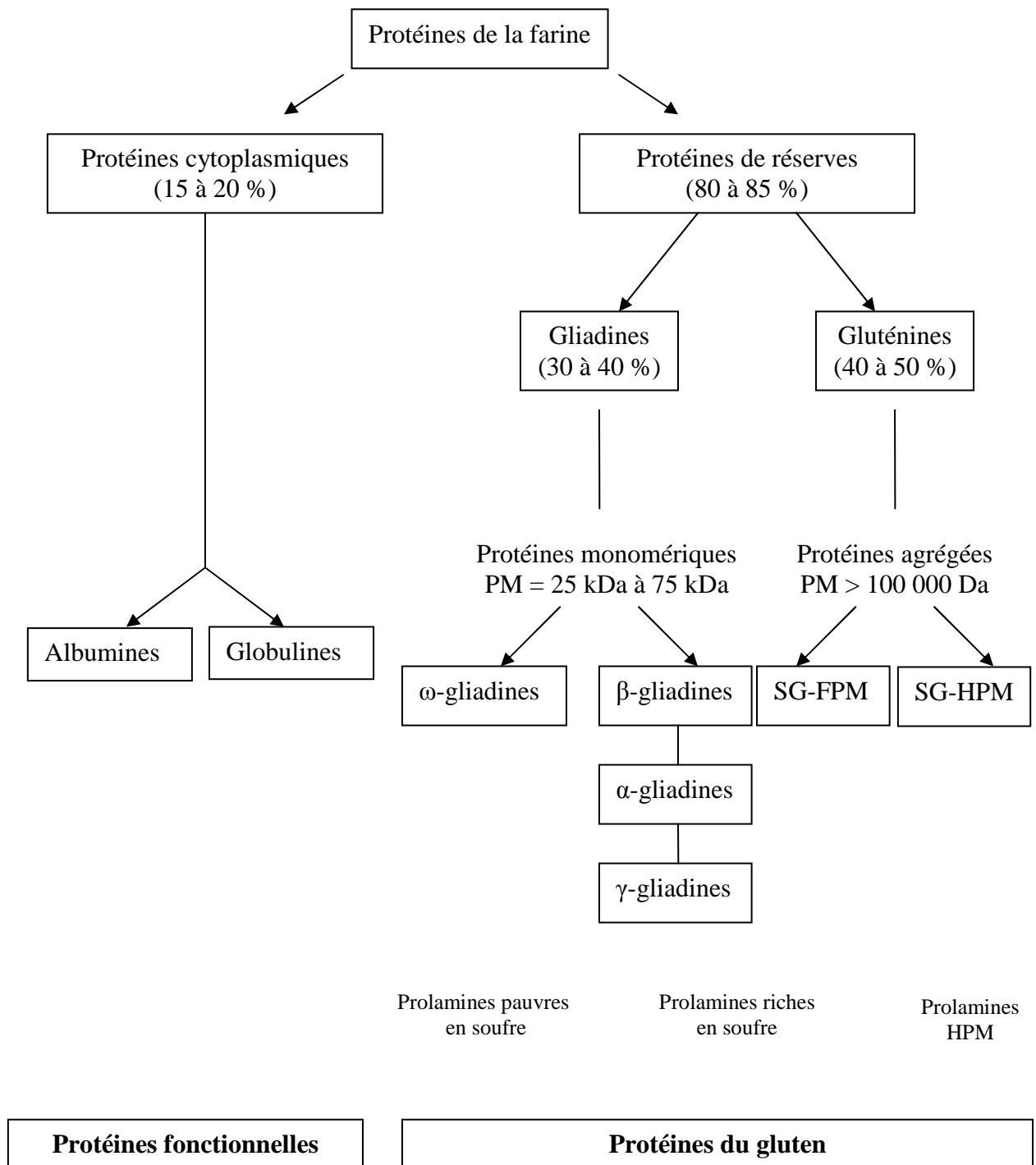
## 2.3 L'albumen

L'albumen constitue le plus important compartiment du grain et représente environ 80% de son poids (Pomeranz, 1988). Il correspond au tissu de réserve. L'albumen amylicé est essentiellement constitué des granules d'amidon enchâssés dans une matrice protéique composée en grande partie de prolamines (gliadines, gluténines de hauts et faibles poids moléculaires) mais aussi d'albumines et de globulines. Ces deux familles protéiques, gluténines et gliadines, sont hydrolysées lors de la germination et du développement de la plantule par les enzymes produites dans l'embryon et la couche à aleurone. Elles constituent la source d'acides aminés nécessaires à la germination de la graine.

Les cellules de l'albumen amylicé possèdent des parois fines et peuvent être classées en trois grands groupes (Evers et Millar, 2002) :

- Les cellules périphériques situées sous la couche à aleurone et mesurant 60µm
- Les cellules prismatiques situées sous les cellules périphériques qui mesurent entre 128-200µm de long et 40-60µm de large
- Les cellules situées dans la partie centrale de l'albumen qui sont de forme arrondie ou polygonale mesurant entre 72-144µm de long et 69-120µm de large.





**Figure 4.** Composition protéique de la farine du blé (rapprochement des classifications de Osborne et Shewry).

L'albumen est la partie du grain qui présente le plus d'intérêt du point de vue de l'utilisation. En effet, les protéines de réserve qui le constituent ont la capacité de former en présence d'eau des liaisons covalentes, hydrogènes et des interactions notamment de type hydrophobe aboutissant sous l'action du pétrissage à un réseau glutineux qui possède des propriétés viscoélastiques aux multiples usages. De plus, il est également constitué d'amidon qui est d'intérêt pour de nouveaux usages comme la production de biocarburant.

### 3. Les protéines du grain de blé

Osborne, en 1907, a été le premier à s'intéresser à la classification des protéines du grain de blé. En 1924, il définit quatre groupes de protéines caractérisés par leur solubilité dans différents milieux (Osborne, 1924), (Figure 4) :

- les albumines qui sont solubles dans l'eau ;
- les globulines qui sont solubles dans les tampons salins ;
- les gliadines qui sont solubles dans une solution d'alcool à 70% ;
- les gluténines qui sont solubles dans une base ou un acide ou des détergents en présence d'un réducteur.

Cette classification a été revue en 1986 par Shewry et collaborateurs qui ont proposé deux grandes catégories :

- les protéines métaboliques : les albumines et globulines, les amphiphiles ;
- les protéines de réserves : les gliadines et les gluténines.

#### 3.1 Les protéines métaboliques

##### *a) Les albumines et globulines*

Les albumines et globulines représentent 15 à 20% des protéines présentes dans la farine de blé et sont solubles respectivement dans l'eau et les tampons salins. Ce groupe de protéines est très diversifié de par ses propriétés physicochimiques (compositions en acides aminés, points isoélectriques et poids moléculaires). Ces protéines participent à la formation du grain et à l'accumulation des réserves dans l'albumen (Vensel et al., 2005).

##### *b) Les protéines amphiphiles*

Les protéines amphiphiles représentent entre 5 et 9% des protéines présentes dans la farine de blé. Elles possèdent un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile. Ces protéines sont solubles dans le détergent Triton X114 et sont liées aux membranes. Elles jouent un rôle

important dans la qualité, notamment les puroindolines qui sont connues pour avoir un effet sur les propriétés technologiques de la pâte (Dubreil et al., 1997 ; Igrejas et al., 2001). Les travaux réalisés par Amiour et al. en 2003 ont permis d'assigner certaines de ces protéines sur les chromosomes du blé tendre.

### 3.2 Les protéines de réserves

Les protéines de réserves font partie des prolamines et sont constituées par un mélange complexe de protéines. Chez le blé, les gènes codant pour ces protéines sont situés sous forme de « cluster » de 2 à plus de 40 séquences codantes dépourvues d'introns sur les bras courts et longs des chromosomes du groupe 1 et les bras courts des chromosomes 6A, 6B et 6D. Ces protéines ont largement été étudiées du fait de leur relation avec la qualité technologique du blé. Une synthèse bibliographique a été rassemblée par Wrigley, Békés et Bushuk en 2006 dans l'ouvrage « Gliadin and Glutenin : the unique balance of wheat quality ».

Les prolamines regroupent d'une part les protéines monomériques (les gliadines) et d'autre part les protéines polymériques (les gluténines) qui sont elles mêmes constituées de deux sous groupes : les sous unités de gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) et les sous unités de gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM). D'une manière générale, la proportion entre ces différentes prolamines est la suivante : 40% de gliadines, 40% SG-FPM et 20% de SG-HPM.

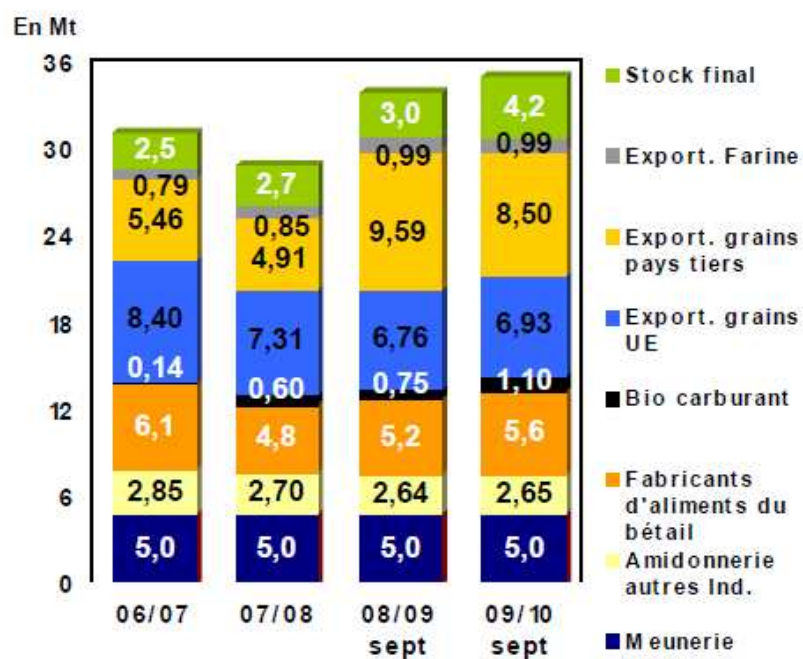
Ces protéines ont aussi été classées selon leur composition et séquences. On distingue :

- les prolamines riches en soufre
- les prolamines pauvres en soufre
- les prolamines de haut poids moléculaire

Les prolamines riches en soufre représentent 70% des prolamines et sont constituées des gliadines de type  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et des SG-FPM.

Les prolamines pauvres en soufre représentent entre 10 et 12% des prolamines totales et sont exclusivement constituées des gliadines de type  $\omega$ .

Les prolamines de haut poids moléculaire représentent 20% des prolamines. Les SG-HPM peuvent être de deux types différents : x et y. Ces prolamines ont la capacité de former des structures polymériques avec les SG-FPM et certaines gliadines par l'intermédiaire de ponts disulfures. La masse du réseau polymérisé, en fonction des allèles de gluténines et gliadines, va de 600000 Da à plus de  $10^7$  Da.



**Figure 5.** Utilisations du blé tendre en France en millions de tonnes (France export céréales).

## 4. Production et utilisations du blé

### 4.1 La production du blé

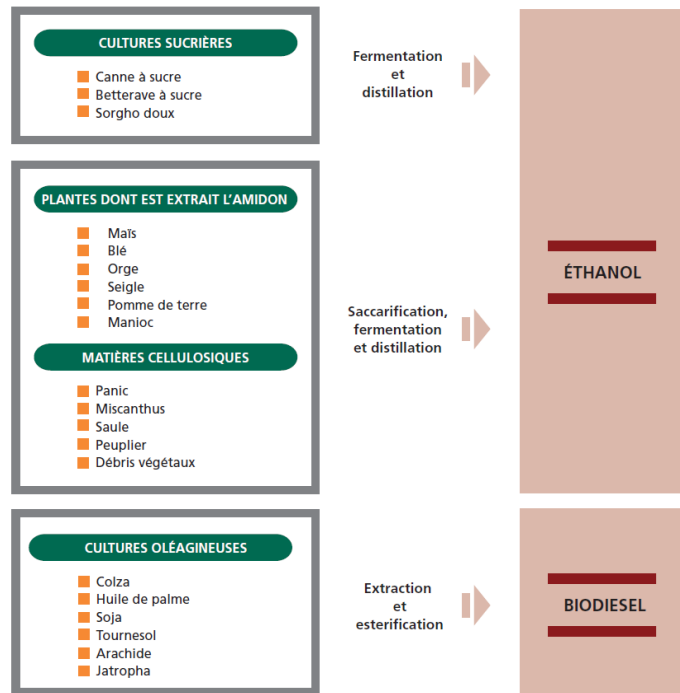
Le blé fait partie des trois céréales les plus cultivées dans le monde avec le riz et le maïs. La production mondiale de blé s'élève à 690 Mt en 2008 (FAOstat). En France, le blé est la première céréale cultivée avec une production pour le blé tendre de 36.5Mt et de 2.1Mt pour le blé dur pour la récolte 2009 (ONIGC). Les exportations de blé tendre pour la récolte 2009 furent de 42% (18.5% pour les pays membres de l'Union Européenne et 23.5% pour les pays hors UE). Concernant les utilisations nationales du blé tendre, l'alimentation animale est le plus gros débouché (5.6 Mt) suivie de l'alimentation humaine avec 5 Mt. L'amidonnerie valorise 2.65 Mt. Le secteur des biocarburants, en constante augmentation, a utilisé 1.1 Mt de blé tendre en 2009 (Figure 5).

### 4.2 Les utilisations du blé

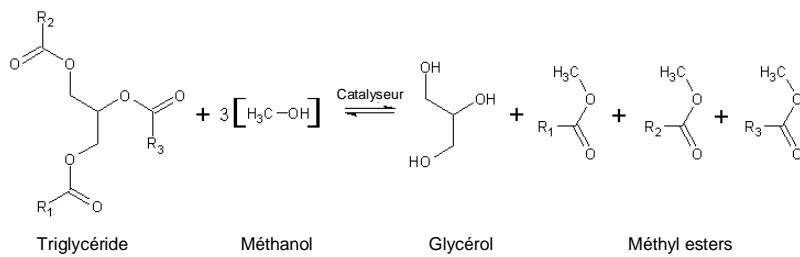
La majorité des utilisations du blé tendre concerne l'alimentation humaine et animale. Dans l'alimentation humaine, le blé dur est destiné à la biscuiterie, la fabrication de semoule, ou de pâtes. Le blé tendre quant à lui est utilisé principalement en meunerie pour obtenir de la farine nécessaire à la production de pain, de viennoiseries ou de pâtisseries.

Outre ces utilisations classiques du blé, de nouvelles utilisations à échelle industrielle apparaissent depuis quelques années telles que la fabrication de bioplastiques à base de gluten ou d'amidon. Les principaux débouchés sont les sacs plastiques, les plastiques agricoles, les emballages et certains produits d'hygiène. Ces bioplastiques ont l'avantage par rapport à leurs homologues d'origine fossile d'être biodégradables et renouvelables.

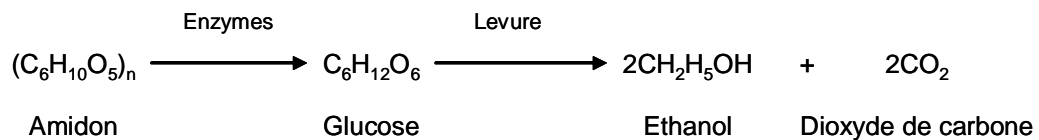
L'amidonnerie, troisième secteur valorisant le blé en France, utilise l'amidon pour faire des épaississants alimentaires. Par l'intermédiaire de la chimie, l'amidon a de multiples usages. Par exemple dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé en tant que dragéifiant, liant ou encore principe actif tel que le sorbitol. Dans de moindres proportions, l'amidon transformé peut être employé dans la fabrication de papier, de carton mais aussi de détergents. L'amidon du blé tendre est également utilisé depuis plusieurs années comme matière première pour la fabrication de biocarburants.



**Figure 6.** Matières premières utilisées pour la fabrication de l'éthanol et du biodiesel (Source FAO, 2008).



**Figure 7.** La transestérification à l'origine de la production d'esters méthyliques.



**Figure 8.** Hydrolyse enzymatique et fermentation : principales étapes de la transformation de l'amidon en éthanol.

## B. LES BIOCARBURANTS

### 1. Définition des biocarburants

Les biocarburants sont issus de la transformation des matières premières organiques non-fossiles provenant de la biomasse. Ces carburants, comme l'énergie solaire, éolienne, hydraulique et géothermique sont dit renouvelables. Ils sont consommés à une vitesse proche de celle de la régénération de la source contrairement au pétrole et autres combustibles fossiles qui sont consommés à une vitesse supérieure à celle à laquelle ces ressources sont créées.

Les biocarburants peuvent être de première génération, ou de deuxième génération. Cette distinction se fait essentiellement sur la provenance des matières premières. Si elles sont issues de produits alimentaires (blé, maïs, betterave, canne à sucre,...), on parlera de biocarburants de première génération et si elles proviennent de sources non alimentaires comme les matières lignocellulosiques, on parlera de biocarburants de seconde génération.

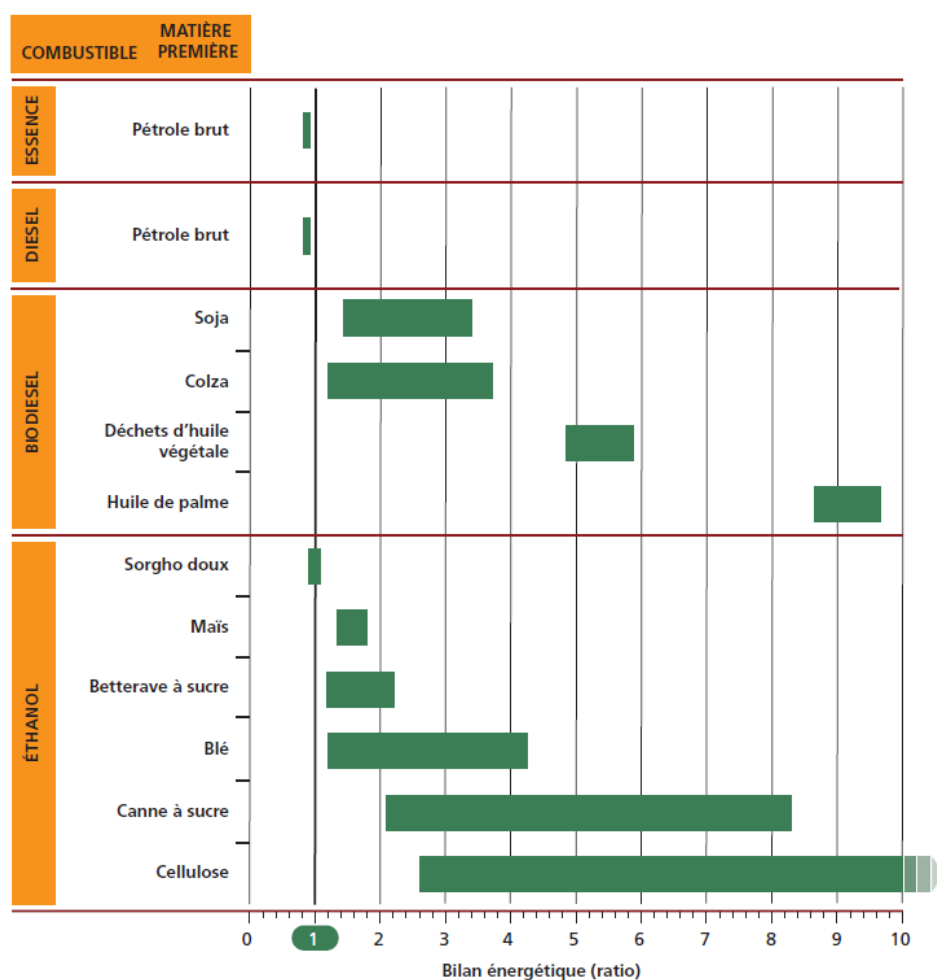
L'Union Européenne, par la directive sur la promotion des biocarburants (2003/30/CE), a fixé pour objectif d'atteindre un taux d'incorporation des biocarburants pour le transport routier de 5.75% dans les carburants distribués à la pompe en 2010. La France s'est quant à elle fixé pour objectif d'atteindre les 7% d'incorporation en 2010.

Il existe deux types de biocarburants (Figure 6):

- l'ester méthylique d'huile végétale (EMHV) est obtenu à la suite d'une transestérification des huiles issues de plantes oléagineuses (colza, tournesol, soja, palme, jatropha) avec du méthanol (Figure 7). Ce procédé consiste à éliminer l'eau et les polluants par filtration puis à mélanger le filtrat avec du méthanol et un catalyseur (Hydroxyde de sodium ou de potassium). Les triglycérides présents dans les huiles se recombinaient en ester et en glycérol qui sont ensuite séparés et purifiés. Cet EMHV, utilisable en mélange avec du gazole, est appelé biodiesel. L'incorporation de l'EMHV à la pompe est limitée en France à un taux maximal de 5%. L'incorporation est possible jusqu'à un taux de 30% sans difficulté technique.
- l'éthanol est produit à partir de la fermentation d'un substrat riche en sucre par la levure (Figure 8). Ces sucres proviennent de plantes sucrières (betterave, canne à sucre), de plantes amylacées (maïs et blé), ou encore de cellulose ou de lignocellulose (résidu de productions agricoles, miscanthus, ...). Cependant, les processus de transformations des matières

**Tableau 1.** Caractéristiques énergétiques des carburants fossiles et des biocarburants (source ENERS energy concept).

Carburant	Densité kg/l	Pouvoir Calorifique Inférieur (PCI)			
		MJ/l	MJ/kg	tep/1000l	tep/1000kg
Bioéthanol	0.790	21.2	26.8	0.508	0.643
Biodiesel	0.888	33.0	37.2	0.792	0.892
Essence	0.750	31.9	42.5	0.765	1.020
Diesel	0.840	36.0	42.8	0.862	1.027



**Figure 9.** Bilan énergétique des carburants fossiles et des biocarburants (FAO, 2008 ; d'après Rajagopal et Zilberman, 2007).



cellulosiques ne sont pas encore économiquement viables et sont toujours à l'état de développement dans des usines pilotes. A la pompe, l'éthanol se trouve actuellement en mélange SP95 et 10% éthanol sous la dénomination SP95-E10 ou en mélange éthanol à hauteur de 85% avec de l'essence (Superéthanol 85). Ce dernier carburant nécessite cependant une adaptation des moteurs pour pouvoir être utilisé.

L'éthanol peut aussi être utilisé sous forme d'ETBE (éthyle tertio butyl ether) qui est un produit résultant de l'addition catalytique de l'éthanol avec l'isobutylène. L'éthanol dans l'ETBE entre à hauteur de 47% en volume.

D'un point de vue énergétique, ces biocarburants présentent des caractéristiques particulières (Tableau 1). En effet, le bioéthanol possède un pouvoir calorifique (21.2MJ/l) bien inférieur à celui de l'essence (31.9MJ/l) alors que celui du biodiesel (33MJ/l) est sensiblement identique à celui du diesel (36MJ/l). Dans le cas d'un biocarburant de type E10-SP95, la différence de consommation des véhicules ne sera pas notable et restera comparable à une surconsommation fréquemment constatée lors d'un sous gonflage de pneumatique. Par contre, pour des carburants de type Superéthanol E85 (composé à 85% d'éthanol), la consommation des véhicules sera augmentée.

Concernant le rendement énergétique de la production des biocarburants (rapport entre l'énergie restituée et l'énergie non renouvelable mobilisée) (Figure 9), il est à noter que les rendements énergétiques moyens pour l'éthanol (2.05) et pour le biodiesel (3.3) sont très nettement supérieurs à celui de l'essence (0.87). La filière éthanol produit globalement deux fois plus et celle du biodiesel 3.3 fois plus d'énergie que celle qui a été nécessaire pour sa production (ADEME/DIREM/PriceWaterHouseCooper, 2002 ; FAO, 2008).

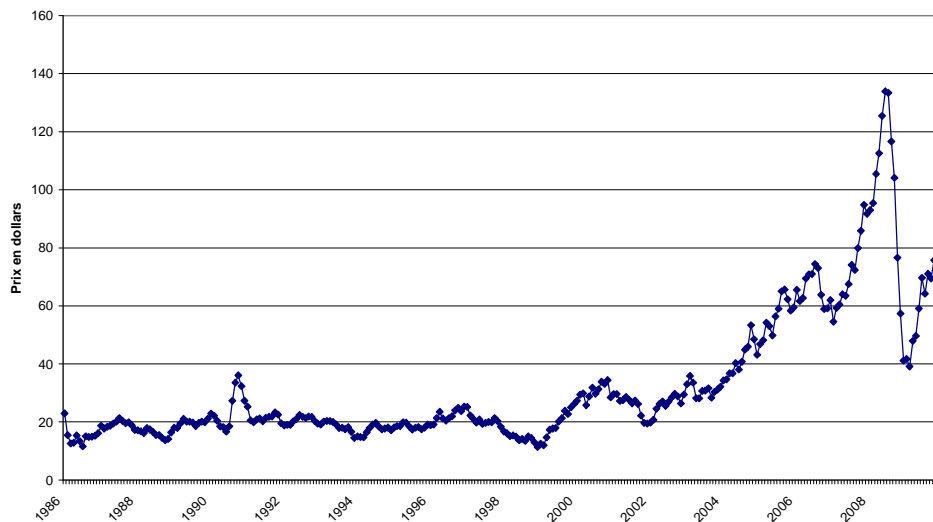
## **2. Les enjeux du développement des biocarburants**

Le développement des biocarburants répond à trois enjeux majeurs :

- Se conformer aux exigences du protocole de Kyoto sur la réduction des gaz à effet de serre (GES)
- Diminuer la dépendance énergétique de l'Union Européenne
- Développer de nouveaux débouchés pour la filière agroindustrielle

### **2.1 Les exigences du protocole de Kyoto**

Les engagements pris lors du protocole de Kyoto sur la réduction des émissions de GES visent à les diminuer de 8% sur la période 2008-2012 par rapport aux émissions



**Figure 10.** Evolution du prix du baril de pétrole brut WTI (World Texas Intermediate) en dollars depuis 1986 (NYMEX).

**Tableau 2.** Prix de revient des biocarburants et carburants fossiles hors toute taxe.

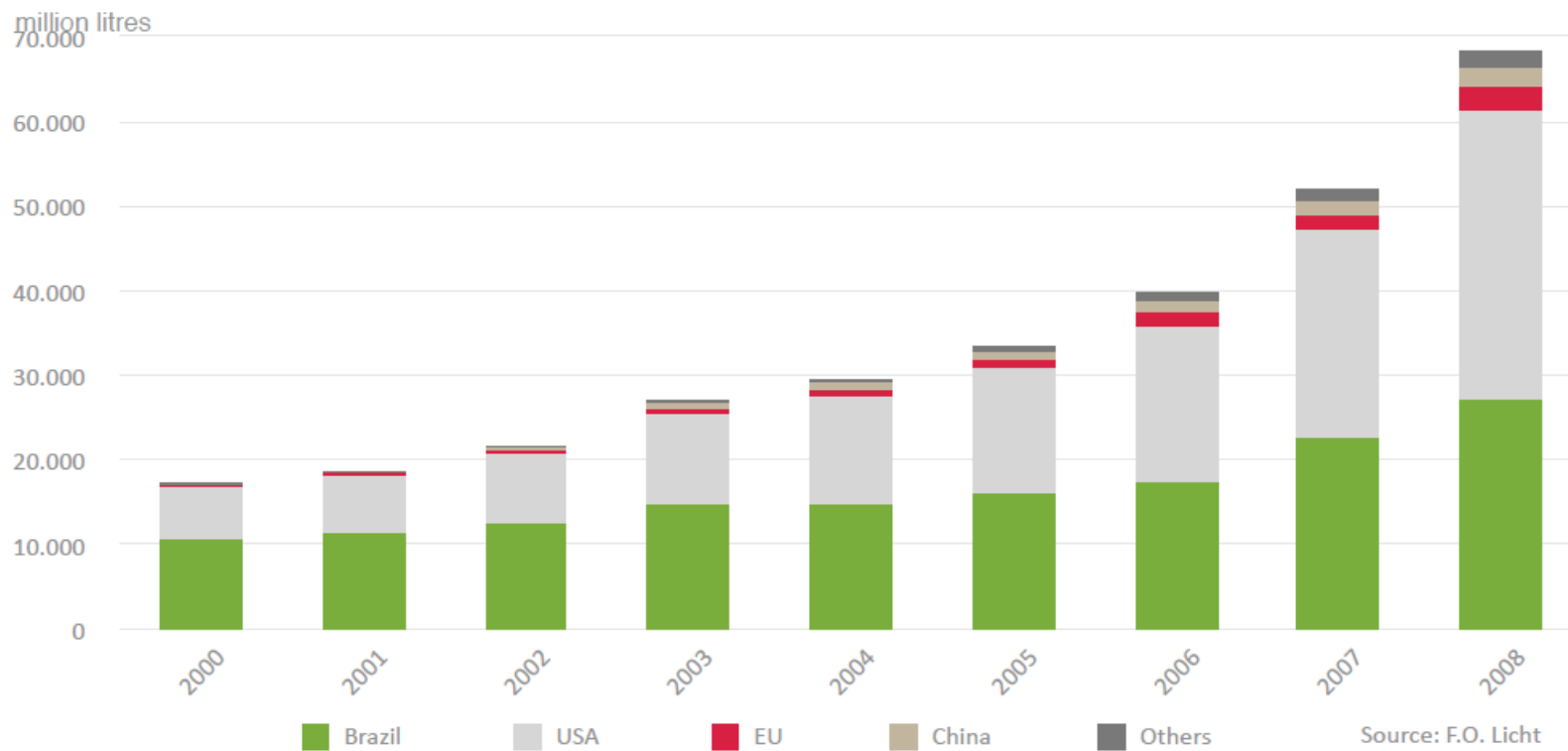
<b>EtOH Europe</b>	<b>EtOH Brésil</b>	<b>EtOH USA</b>	<b>EMHV Europe</b>	<b>Essence 60\$/baril*</b>	<b>Gazole 60\$/baril*</b>
0.4-0.6€/l	0.2\$/l	0.3\$/l	0.35-0.65€/l	0.32€/l	0.36€/l
19-29€/GJ	10\$/GJ	14\$/GJ	10.5-20€/GJ	9€/GJ	10€/GJ

\* prix des carburants pour la France hors toute taxe, Décembre 2006

de 1990 dans l'Union européenne. En 2008, la CITEPA, lors d'une étude sur les émissions des GES, a montré que tous les secteurs d'activités ont diminué leurs émissions sauf le secteur des transports (+26%). Le transport en France est responsable aujourd'hui de 31% des émissions de CO<sub>2</sub> et le transport routier représente 85% de ces émissions. Depuis 2004, une inversion de la tendance s'observe avec une diminution des émissions pour ce secteur de 1% par an. La réduction des émissions de GES est réelle et est en partie due à l'utilisation des biocarburants. Cependant, mesurer l'impact des biocarburants sur cette réduction en faisant un bilan carbone est bien souvent difficile car les observations faites sur cette filière diffèrent selon les études. En effet, beaucoup de paramètres fluctuent en fonction des méthodes de productions, de la valorisation des coproduits et du pays de production ce qui a un effet direct sur le bilan carbone des biocarburants. Ainsi, une forte variation peut être observée notamment pour le cas du blé où une étude réalisée par JRC (Joint Research Center) en 2008 a montré une réduction d'émission de CO<sub>2</sub> par joule comprise entre 14% et 45% selon les méthodes de production. L'ADEME en 2010 a relevé une réduction de 46% des émissions nettes de CO<sub>2</sub> pour le bioéthanol produit à partir de blé ce qui répond aux critères de durabilité fixés par la directive européenne 2009/28/CE (réduction des GES de 35% par rapport au produit pétrolier).

## 2.2 La dépendance énergétique

L'Union européenne dépend à 50% des importations pour ses besoins en énergie et à 80% pour le pétrole qui est en grande partie utilisé dans le secteur transport. En France, le transport routier dépend à 97% des importations pétrolières ce qui en fait le secteur le plus touché par les hausses du prix du pétrole. Le développement des biocarburants et l'incorporation de ceux-ci à l'essence permettent d'atténuer les fluctuations de prix du baril de pétrole qui a connu ces dernières années des pics importants proches de 145\$ le baril (Figure 10). Cependant, en comparant à pouvoir calorifique égal les prix de revient hors taxe des différents types de biocarburants à celui de l'essence, il est clair que les biocarburants ont un coût bien supérieur (Tableau 2). Ce coût provient essentiellement du prix des matières premières utilisées qui, dans le cas du biodiesel produit à partir de colza, représente entre 50 et 90% du prix de revient final (Les cahiers de global chance, 2007). La production de biocarburant est donc compétitive lorsque le prix du baril de pétrole est élevé. Actuellement, la production de biocarburant est soutenue par l'union européenne grâce à la directive 2003/96/CE qui permet une exonération totale ou partielle des taxes sur ces produits. Ainsi, en France, les biocarburants bénéficient d'une exonération partielle de la Taxe Intérieure sur



**Figure 11.** Production de bioéthanol dans le monde depuis 2000 en millions de litres (Source Ebio, 2009a d'après F.O. Licht).

les Produits Pétroliers (TIPP) dans la limite des agréments de productions et une augmentation de la Taxe Générale sur les Activités Polluantes (TGAP) pour les distributeurs qui n'atteindraient pas les objectifs annuels d'incorporation.

### 2.3 Une nouvelle filière agroindustrielle créatrice d'emploi

La production de biocarburant est un nouveau débouché économique pour l'agriculture qui permet de favoriser le développement rural en développant de nouvelles filières agroindustrielles. De nombreuses usines de production de bioéthanol ont été créées en Europe pour permettre d'atteindre les objectifs d'incorporation que l'Union Européenne s'est fixés. Ainsi Ebio (2009b) rapporte que l'industrie du bioéthanol dans l'Union Européenne a permis la création de 42 000 emplois. D'ici 2020 avec l'objectif de 10% d'incorporation de bioéthanol dans l'essence, Ebio a évalué le nombre d'emplois pour le secteur des biocarburants à 225 000.

## 3. La production de biocarburants dans le monde

### 3.1 La production de biodiesel

La production mondiale de biodiesel représente 16 084 MI en 2008 (ENERS Energy concept). L'Union Européenne est la première productrice avec 8 733 MI en 2008. Les Etats Unis sont le deuxième plus gros producteur avec 2650 MI, suivis de l'Argentine et du Brésil avec respectivement une production de 1205 MI et 1100 MI.

La production de biodiesel dans l'Union Européenne a augmenté de 36% entre 2007 et 2008. Les principaux producteurs sont l'Allemagne avec 3175 MI puis la France avec 2044 MI et l'Italie avec 670 MI. Cette augmentation n'est cependant pas aussi importante que celles enregistrées pour 2004/2005 et pour 2005/2006 qui étaient respectivement de 65% et 54%.

### 3.2 La production de bioéthanol (ENERS, 2009)

Le bioéthanol est le biocarburant le plus produit dans le monde. La production mondiale a dépassé les 65 000 MI en 2008 (Figure 11) ce qui représente une augmentation de la production de 27% par rapport à l'année 2007. Les Etats-Unis sont les premiers producteurs et représentent 52% de la production mondiale avec 34 000 MI produits en 2008. L'éthanol aux Etats-Unis est principalement produit à partir de maïs. Le second producteur est le Brésil et représente 37% de la production mondiale avec 24 500 MI dont 4 000 MI sont destinés à l'exportation. L'éthanol au Brésil est principalement obtenu à partir de canne à sucre. L'Union Européenne est quant à elle le troisième producteur mondial

**Tableau 3.** Production de bioéthanol dans l'Union européenne depuis 2004 en millions de litres (Source Ebio, 2010).

Country	2009*	2008	2007	2006	2005	2004
France	1,250	1,000	539	293	144	101
Germany	750	568	394	431	165	25
Spain	465	317	348	402	303	254
Austria	180	89	15	0	0	0
Sweden	175	78	120	140	153	71
Poland	165.5	200	155	120	64	48
Hungary	150	150	30	34	35	0
Belgium	143.2	n.a.	0	0	0	0
Slovakia	118	94	30	0	0	0
Czech Republic	112.5	76	33	15	0	0
Italy	72	60	60	128	8	0
UK	70	75	20	0	0	0
Lithuania	30	20	20	18	8	0
Latvia	15	20	18	12	12	12
Finland	4	50	0	0	13	3
Ireland	1,6	10	7	0	0	0
Netherlands	0	9	14	15	8	14
<b>Total</b>	3,701.8	2,816	1,803	1,608	913	528

*In million litres. \* Provisional data.*

avec une production bien inférieure de 2 816 Ml produits en 2008. Les premiers pays producteurs européens de bioéthanol sont la France (1 000 Ml) suivie de l'Allemagne (568 Ml) et de l'Espagne (317 Ml). Récemment, la Chine, la Thaïlande et l'Inde ont aussi commencé la production de bioéthanol carburant à échelle industrielle. Ainsi la Chine a atteint les 1900 Ml en 2008 et se place au quatrième rang mondial derrière l'Union Européenne avec un fort potentiel de développement.

La production de bioéthanol dans l'Union Européenne a fortement augmenté en 2008 avec une hausse de la production de 56% par rapport à 2007 (Tableau 3). Ceci est dû en grande partie à la production française qui a presque doublé en l'espace d'une année. Cependant, cette forte augmentation de production a été concomitante à une augmentation des importations d'éthanol qui a été estimée à 1,9 milliards de litres soit 400 millions de plus qu'en 2007. Les importations proviennent essentiellement du Brésil (75%) et sont à destination de la Suède, du Royaume-Uni, des Pays-Bas et, dans une plus faible proportion, du Danemark et de l'Allemagne.

#### **4. Processus de fabrication du bioéthanol**

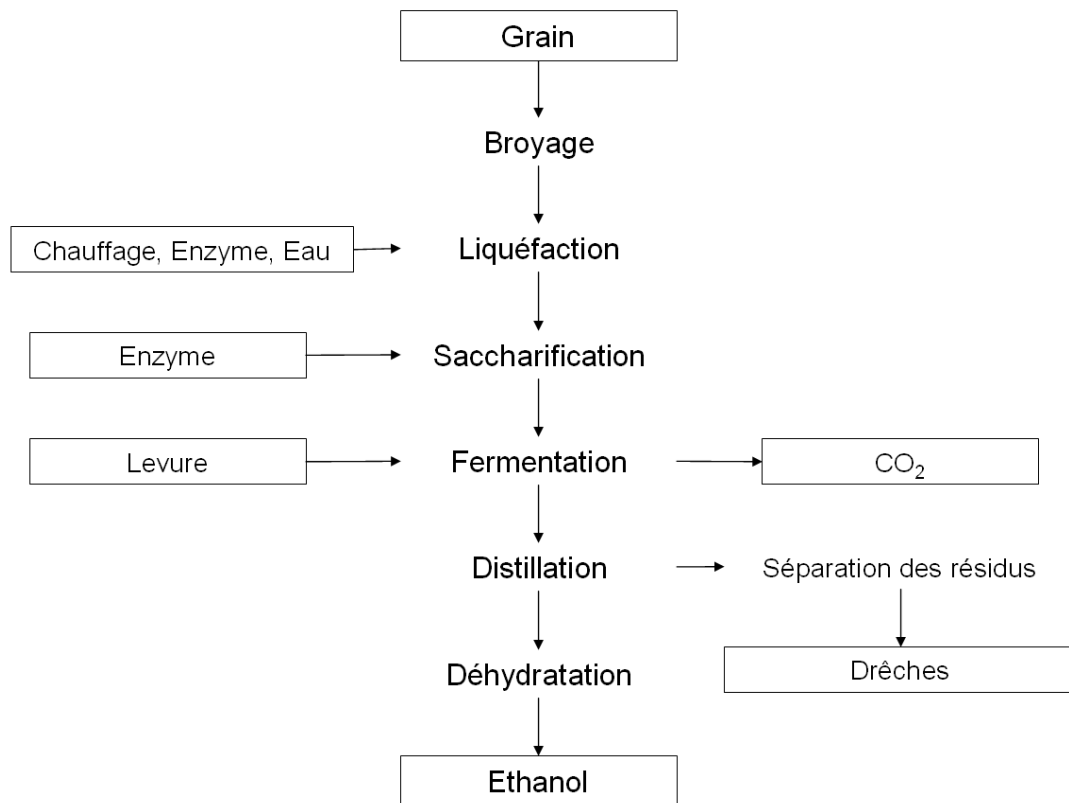
L'éthanol peut être fabriqué à partir de n'importe quelle substance possédant des sucres fermentescibles. Ces sucres peuvent être simples (canne à sucre et betterave), sous forme d'amidon (blé, maïs) ou encore sous forme de lignocellulose (bois, miscanthus). Alors que les sucres simples peuvent être fermentés directement, l'amidon nécessite un prétraitement faisant intervenir une hydrolyse enzymatique à l'aide de l'alpha amylase et de l'amyloglucosidase pour obtenir des sucres fermentescibles. Pour la lignocellulose, un autre prétraitement plus important faisant intervenir une hydrolyse chimique sous haute pression et haute température est nécessaire afin de libérer la cellulose et l'hémicellulose pour que celles-ci soient accessibles aux cellulases qui les dégradent en molécules de glucose.

La fabrication de bioéthanol à partir de plantes amylacées nécessite plusieurs étapes de transformation (Figure 12).

##### **4.1 Le broyage**

Le broyage des grains est nécessaire pour améliorer l'étape de gélatinisation et liquéfaction de l'amidon. Il va permettre une meilleure imbibition et cuisson de celui-ci ce qui facilitera son hydrolyse enzymatique.

Il existe deux types de broyages : le broyage sec et le broyage humide.



**Figure 12.** Principales étapes de production du bioéthanol.



Le broyage sec consiste à broyer le grain sans chercher à séparer les différents constituants du grain. Afin d'améliorer le rendement, une étape permettant de séparer les enveloppes du grain par utilisation de bande abrasive peut être effectuée permettant une élimination de la majorité des fibres qui sont inutiles à la fabrication de bioéthanol (Sosulski et Sosulski, 1994 ; Wang et al., 1997).

Lors d'un broyage humide pour le blé, la mouture est imbibée d'eau et pétrie afin de former une pâte qui sera lavée plusieurs fois pour séparer le gluten des granules d'amidon. Le gluten, insoluble, est ainsi isolé des granules d'amidon et peut être récupéré en tant que coproduit utilisable dans l'alimentation animale car riche en protéines. Bien que ce processus nécessite plus d'énergie et soit donc plus coûteux, il permet, par la concentration de l'amidon et la séparation du gluten, d'améliorer les étapes de liquéfaction et de fermentation tout en permettant la valorisation d'un coproduit.

#### 4.2 Gélatinisation et liquéfaction

L'amidon présent sous forme de granules dans le grain de blé doit être gélatinisé afin de permettre une bonne hydrolyse par les enzymes. Cette étape de gélatinisation se fait sous des conditions de hautes températures (120-150°C) et de fortes pressions qui vont faire éclater les granules d'amidon.

Cette étape est très contrôlée afin d'éviter une perte de rendement en alcool due à une cuisson trop longue ou à une trop haute température qui induirait un brunissement et une augmentation de la viscosité (Agu et al., 2008).

Dans un souci d'économie d'énergie lors de la production de bioéthanol, plusieurs études ont porté sur la réduction de la température de cuisson de l'amidon tout en conservant le rendement en alcool (Park et Rivera, 1982 ; Textor et al., 1998 ; Lang et al., 2001). Cependant, cette économie d'énergie peut être source de problèmes car le rendement d'hydrolyse est souvent moins bon. De plus, pour obtenir une hydrolyse équivalente, il est nécessaire de broyer plus finement les grains. Par ailleurs, à température réduite, des infections microbiennes peuvent apparaître ce qui a un effet négatif sur la production de bioéthanol.

#### 4.3 La saccharification

Après la cuisson de l'amidon, le moût est refroidi à une température comprise entre 90 et 100°C et l' $\alpha$ -amylase thermostable ainsi que la pullulanase sont ajoutées. L' $\alpha$ -amylase va rompre les liaisons  $\alpha$ -1,4 glycosidiques des molécules d'amylose et d'amylopectine et

la pullulanase va rompre les liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine. Après une seconde diminution de la température (80-90°C), l'amyloglucosidase est ajoutée et va enlever successivement les molécules glucoses à la fin du polymère d'amidon.

#### 4.4 La fermentation

La levure, dans des conditions anaérobiques, produit de l'éthanol et du dioxyde de carbone à partir de sucres simples. Cette fermentation est réalisée à une température de 35°C et la concentration en alcool dans le moût est comprise entre 8-12% suivant la quantité de glucose, de levure et le niveau de contamination bactérienne. La fermentation dure entre 48 et 72 heures. Après avoir consommé la majeure partie du glucose, la levure va consommer l'éthanol qu'elle a produit pour se développer. Un contrôle régulier du niveau de fermentation est réalisé afin de stopper la réaction lorsque la levure commence à consommer l'éthanol.

#### 4.5 La distillation et la déshydratation

La distillation va permettre de séparer l'éthanol de l'eau et des autres impuretés présentes dans le moût. Elle va permettre d'atteindre un mélange azéotrope de 95% d'éthanol et de 5% d'eau.

Après la distillation, les résidus sont pressés afin de récupérer les particules solides et sont ensuite séchés. Pour une tonne de blé, 305 kg de drêches sont produites. Ces drêches sont riches en protéines et en fibres et peuvent être utilisées dans l'alimentation animale comme c'est déjà le cas pour le tourteau de soja. L'éthanol est ensuite déshydraté par pervaporation sur membranes céramiques afin d'obtenir de l'éthanol anhydre.

### **5. Développement et limite de la production de bioéthanol**

La rentabilité [énergie produite]/[énergie dépensée] est le principal objet de recherche des industriels. L'augmentation de l'énergie produite passe par une amélioration de la qualité des matières premières utilisées pour la fabrication du bioéthanol mais aussi par une amélioration du processus de transformation (Schulze et al., 2005). Ainsi la viscosité du moût et les résidus solides interviennent physiquement sur l'énergie nécessaire à la transformation du bioéthanol. Plus la matière est visqueuse, plus la quantité d'énergie nécessaire pour la chauffer est importante et, plus la quantité de résidus est importante, plus l'énergie nécessaire pour la distillation et le séchage des drêches sera élevé. Il est donc nécessaire d'étudier précisément la nature des matières premières et d'améliorer leur qualité intrinsèque afin d'obtenir le meilleur rendement.

	Amidon		Sucre		Ethanol	+	Dioxyde de carbone
	$(C_6H_{10}O_5)_n$	→	$C_6H_{12}O_6$	→	$2CH_2H_5OH$	+	$2CO_2$
Poids moléculaire	$(162)_n$	18	180		92		88
Poids	1000 kg	111 kg	1111 kg		568 kg (720 l)		543 kg
Avec un grain de blé composé de 69% d'amidon et 3% de sucre	720 kg	77 kg	800kg		409 kg (518 l)		391 kg

**Figure 13.** Production d'éthanol théorique avec un rendement maximal pour un blé constitué à 69% d'amidon et 3% de sucre (poids sec).

## C. QUEL BLÉ POUR LA PRODUCTION DE BIOÉTHANOL ?

Le blé a été longtemps sélectionné afin d'améliorer sa qualité boulangère et biscuitière. Cette sélection s'est essentiellement faite sur les protéines et l'augmentation de leur quantité dans le grain.

A ce jour, peu d'études ont été réalisées dans le but d'améliorer le blé en vue de produire du bioéthanol ou de l'alcool (whisky, ...). L'amidon étant la principale réserve de sucres fermentescibles (68% à 75% de la masse du grain), il semble évident que les variétés possédant une quantité d'amidon élevée et par conséquent un contenu en protéines faible, sont souhaitables pour la production de bioéthanol.

Le rendement alcoolique dépend de plusieurs facteurs :

- la quantité d'amidon présente dans le grain,
- l'efficacité de la conversion de l'amidon en sucres simples fermentescibles,
- l'efficacité de la fermentation de ces sucres par la levure.

Le rendement théorique de la conversion totale de l'amidon en éthanol a été étudié sur des blés anglais par Smith et al., en 2006. Ces auteurs rapportent que pour une tonne de blé (composée à 69% d'amidon et 3% de sucres), 518 L d'éthanol pouvaient être obtenus si l'efficacité de transformation à toutes les étapes du processus était maximale (Figure 13). En se basant sur ces chiffres, l'augmentation d'un point de la quantité d'amidon dans le grain aboutirait à une augmentation de 7.2 L d'éthanol après transformation. L'amidon semble donc être le premier paramètre à améliorer chez le blé en termes de quantité mais aussi de qualité afin d'avoir l'hydrolyse la plus complète possible (Smith, 2008).

### **1. L'amidon et le taux de protéines : deux paramètres fortement corrélés au rendement en bioéthanol**

#### 1.1 L'amidon et les sucres

Tout semble indiquer que la quantité d'amidon est le meilleur paramètre permettant de prédire la quantité de bioéthanol pouvant être produite pour une variété donnée. Cependant, la quantification seule de l'amidon n'est pas suffisante (Riffkin et al., 1990 ; Swanston et al., 2005). En effet, d'autres sucres comme les sucres libres et les sucres provenant des polysaccharides autres que l'amidon (NSP) peuvent avoir un effet sur la production d'éthanol. L'amidon est accumulé durant le développement du grain. Les grains bien remplis contiennent donc plus d'amidon et produisent potentiellement plus d'éthanol. De ce fait, les

paramètres permettant de caractériser les grains tels que le poids de mille grains, le poids spécifique et la taille du grain sont des indicateurs potentiellement intéressants. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence une faible corrélation de ces caractéristiques avec le rendement en bioéthanol (Taylor et Roscrow, 1990 ; Swanston et al., 2005 ; et Smith et al., 2006). Par ailleurs, quelques variétés s'écartent de cette relation. Ainsi la variété Glasgow, dont la qualité dans l'industrie de la distillerie est bien connue, possède de petits grains et la variété Deben qui a de gros grains présente un faible rendement alcoolique (Swanston et al., 2005). Ces caractéristiques du grain sont donc des indicateurs mais ne sont pas fortement corrélées avec le rendement en éthanol comme peuvent l'être la quantité d'amidon et le taux de protéines.

### 1.2 Le taux de protéines

L'analyse des corrélations entre les mesures de rendement en éthanol avec la quantité d'amidon d'une part et le taux de protéines d'autre part, fait apparaître que cette dernière a un coefficient plus important (Smith et al., 2006 ; Kindred et al., 2008). Ainsi, moins il y a de protéines, plus la quantité d'éthanol produite est importante.

La mesure du taux de protéines est donc un meilleur prédicteur du potentiel éthanol des variétés de blé.

## **2. Les paramètres du grain pouvant avoir un effet sur la production de bioéthanol**

### 2.1 La composition de l'amidon

L'amidon est composé de deux macromolécules aux propriétés différentes : l'amylose et l'amylopectine. Quelques études se sont intéressées à l'effet de la composition de l'amidon sur le rendement en éthanol. Ainsi des blés riches en amylose possèdent une viscosité faible et, de ce fait, la température de gélatinisation se trouve augmentée (>100°C) par rapport à l'amidon normal (60-70°C). L'amylose, pourtant plus facilement hydrolysable, n'est pas économiquement intéressante du fait de la quantité d'énergie nécessaire pour gélatiniser son amidon (Smith et al., 2006).

L'amidon des blés riches en amylopectine, comme celui des blés waxy (possédant les trois allèles nuls pour les gènes *waxy*) est presque totalement dépourvu d'amylose et se gélatinise mieux que l'amidon normal à une température donnée. Il se disperse plus facilement en solution rendant ce type d'amidon plus intéressant pour la production de bioéthanol. Cependant, le rendement de ces variétés à l'hectare a souvent été rapporté comme

étant plus faible que celui des variétés normales. Les économies réalisées grâce à une température de gélatinisation plus faible pour ces amidons riches en amylopectine ne permettent pas de compenser la diminution de rendement à l'hectare. Les variétés waxy ne sont donc pas encore utilisées pour la production de bioéthanol (Smith et al 2006).

## 2.2 La dureté et la distribution de la taille des granules d'amidon.

L'amidon est constitué de granules de tailles différentes : les granules A ( $>10\mu\text{m}$ ) et les granules B et C ( $<10\mu\text{m}$  et  $<2\mu\text{m}$  respectivement). La distribution de la taille des granules est corrélée à la dureté du grain (Raeker et al., 1998 ; Capouchova et al., 2003). Un blé soft possède une forte proportion de grosses granules (type A) et une quantité d'amylose légèrement supérieure à celle observée chez les blés durs (Raeker et al., 1998).

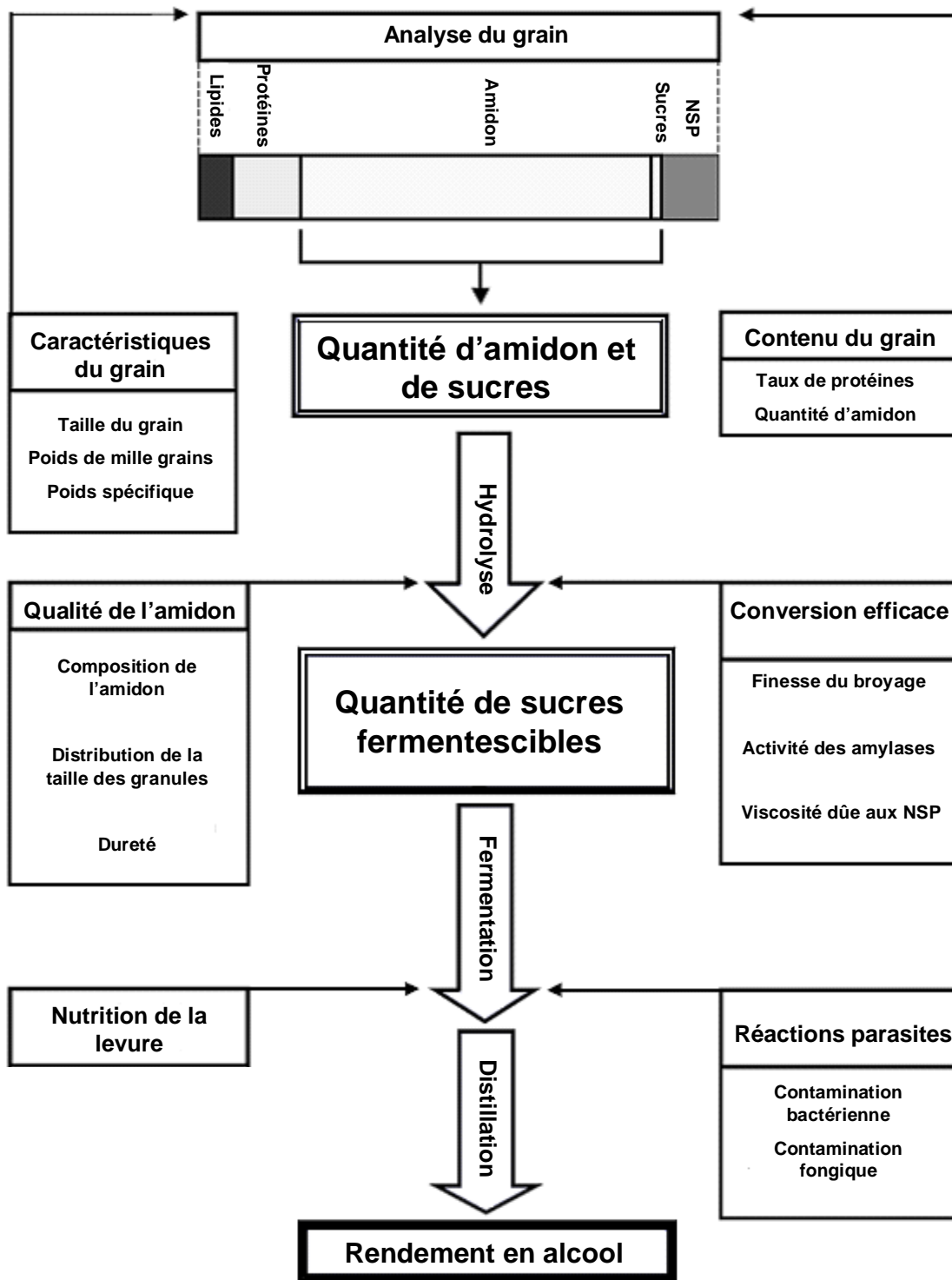
La distribution de la taille des granules d'amidon a été rapportée comme ayant un effet faible sur la production de bioéthanol, cet effet est moins important que celui de la quantité totale d'amidon (Brosnan et al., 1998)

## 2.3 L'activité alpha amylasique

L'activité des  $\alpha$ -amylases, mesurée par le temps de chute de Hagberg, est augmentée lors de la germination sur pied. Ces enzymes participent à la dégradation de l'amidon et pourraient faciliter l'hydrolyse complète de l'amidon. Cependant, la quantité d'amidon chez les grains en cours de germination diminue induisant donc une quantité d'amidon moins importante pour la conversion en éthanol. La corrélation entre le temps de chute et le rendement alcoolique n'a pas encore été étudiée précisément.

## 2.4 Les polyssacharides autres que l'amidon (NSP)

Le contenu en NSP tels que les arabinoxylanes (pentosanes) peut avoir un effet sur le rendement de la production de bioéthanol. Ces NSP ont la capacité de capter l'eau et ont pour effet d'augmenter la viscosité. Le moût lors du processus de transformation sera d'autant plus visqueux que la quantité de NSP sera importante. Ceci induit des difficultés de circulation du moût lors du processus de transformation et une augmentation de la température requise lors de l'étape de liquéfaction de l'amidon. De plus, la valorisation des coproduits tels que les drêches est plus difficile et coûteuse car l'énergie nécessaire pour les sécher est augmentée. Chez le blé, le contenu en NSP varie en fonction des variétés (Saulnier et al., 1995) et des QTL pour la viscosité ont été mis en évidence (Saulnier et al., 2007). De plus, les blés possédant la translocation 1BL/1RS ont tendance à avoir une viscosité élevée



**Figure 14.** Processus de fabrication du bioéthanol et paramètres ayant un effet sur le rendement en alcool (Smith et al., 2006).

(Weighman et al., 2001) mais des exceptions existent.

Les problèmes de viscosité pourraient être palliés par l'ajout d'eau mais ceci induit des coûts supplémentaires. Les enzymes de dégradation de ces NSP tels que les xylanases pourraient être utilisées pour la production de bioéthanol mais engendrent elles aussi un coût supplémentaire et ne sont pas utilisables pour la production d'alcool à boire.

La corrélation entre le rendement en éthanol et la viscosité n'a pas encore été étudiée mais il semble que, dans des conditions de production industrielle, les blés à forte teneur en NSP soient à éviter.

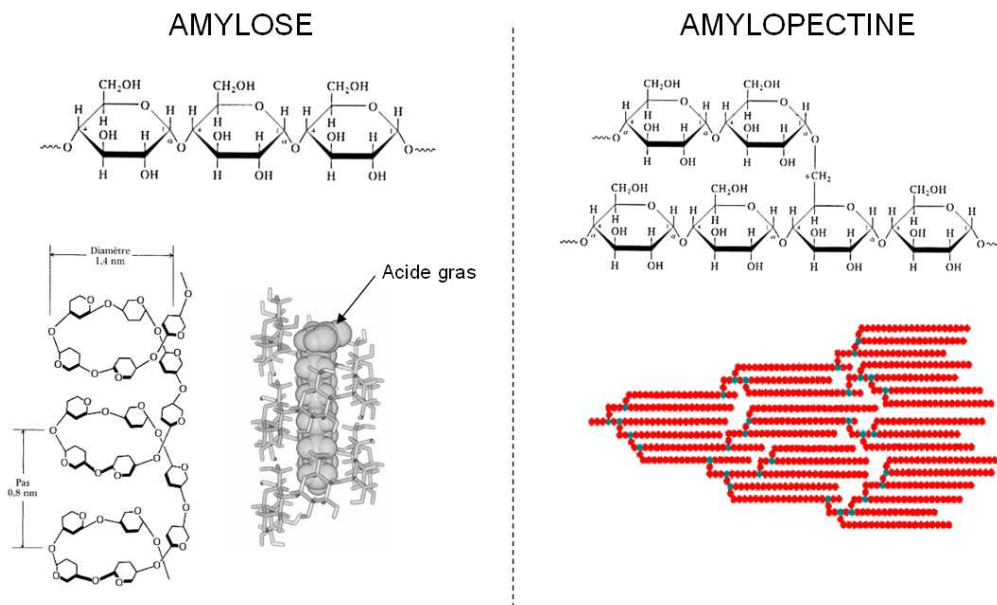
La sélection des variétés de blés pour la production de bioéthanol en est à ses débuts et les effets des différentes caractéristiques du grain sont à étudier plus largement afin d'apporter des outils de prédictions du rendement en éthanol.

Le paramètre ayant le plus d'impact sur la production d'éthanol est avec la quantité d'amidon présent dans le grain, le taux de protéines. Cependant, de nombreux autres facteurs ont aussi un effet sur le rendement en éthanol et sont à améliorer en vue d'obtenir un rendement optimal de transformation (Figure 14).



**Tableau 4.** Caractéristiques morphologiques des granules et contenu en amylose chez les plantes (d'après Buléon et al., 1998).

Source	Contenu en amylose (% amidon total)	Type de granule	Taille moyenne ( $\mu\text{m}$ )	Forme
Orge normal	21-24	Granule A	20	arrondie
		Granule B	2	arrondie
Blé normal	25-29	Granule A	30	lenticulaire
		Granule B	8	sphérique
		Granule C	<2	sphérique
Maïs normal	25-28	Taille unique	30	arrondie et polyédrique
Maïs waxy	0.5	Taille unique	15	arrondie et polyédrique
Maïs amylose rich	60-73	Taille unique	5-25	très allongée et irrégulière
Pomme de terre	18-21	Taille unique	40	ovale
Pois	33-36	Taille unique	30	ovale



**Figure 15.** Structure des molécules d'amylose et d'amylopectine.

## D. STRUCTURE ET COMPOSITION DE L'AMIDON

### 1. Composition de l'amidon

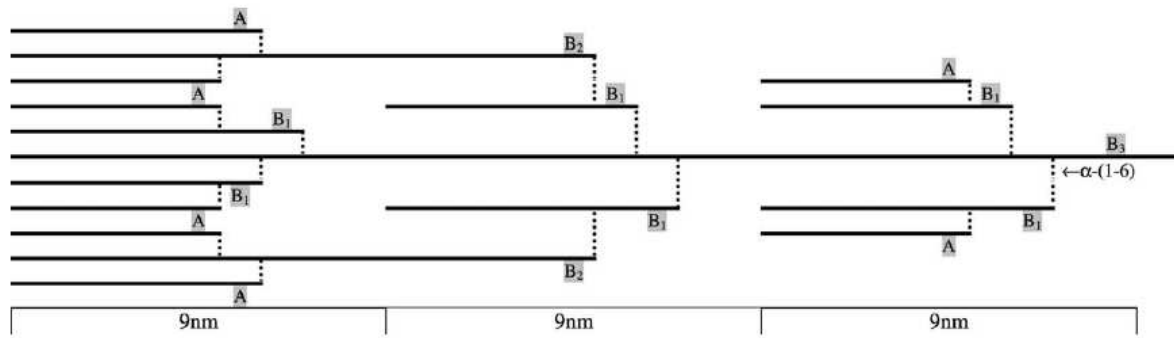
L'amidon constitue la réserve de glucides chez les plantes supérieures. Il est composé de deux types de polymères de glucose, l'amylose et l'amylopectine qui représentent approximativement 98 à 99% du poids sec. L'amidon chez les céréales contient des lysophospholipides et des acides gras libres dont la présence est fortement corrélée à la quantité d'amylose. L'amidon est stocké dans des granules mesurant de 1 à 100  $\mu\text{m}$  et dont la forme et la composition sont variables suivant les espèces (Buléon et al., 1998 ; Tableau 4). Ainsi la teneur en amylose est en moyenne comprise entre 18 et 35% mais peut, dans le cas des amidons totalement waxys, être de l'ordre de 1% ou, au contraire, dans les amidons riches en amylose proche de 60%.

#### 1.1 L'amylose

L'amylose est un long polymère linéaire d'unités de D-glucopyranosyl majoritairement liées en  $\alpha$ -1,4 (99%) qui peut aussi posséder quelques ramifications avec des liaisons  $\alpha$ -1,6 (25-55% des molécules d'amylose) (Figure 15). Ces branchements sont le plus souvent localisés près de la partie réductrice terminale de la molécule d'amylose et sont d'autant plus importants que la masse moléculaire est élevée. L'amylose possède un poids moléculaire compris entre  $10^5$  et  $10^6$   $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et un degré de polymérisation compris entre 324 et 4920 unités avec 9 à 20 points de branchement (Hizukuri et al., 1981 ; Hizukuri, 1993 ; Mua et Jackson, 1997 ; Yoshimoto et al., 2000). La molécule d'amylose de par sa structure linéaire a la capacité de s'enrouler de manière hélicoïdale autour d'acides gras libres, d'alcools ou d'iode.

#### 1.2 L'amylopectine

L'amylopectine est le polymère hautement ramifié de l'amidon (Figure 15). L'amylopectine possède un poids moléculaire compris entre  $10^7$  et  $10^9$   $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ce qui est beaucoup plus important que celui de l'amylose. Elle est formée de chaînes d' $\alpha$ -D-glucopyranosyl liées en  $\alpha$ -1,4 mais avec 5 à 6% de liaisons  $\alpha$ -1,6 aux niveaux des embranchements. Le degré de polymérisation est compris entre 9600 et 15900 unités (Buléon et al., 1998 ; Takeda et al., 2003). Globalement, la longueur des chaînes de ramifications est beaucoup plus courte que celles de l'amylose. Elles font en moyenne 18 à 25 unités de long.



**Figure 16.** Représentation schématique de l'amylopectine. Les ramifications (A, B1-B3) constituées d'unités de glucose liées en  $\alpha$ -1,4 sont branchées par des liaisons  $\alpha$ -1,6 (Source : Tester et al., 2004).

La structure de l'amylopectine définie par Peat et al. en 1952 décrit l'organisation des ramifications en terme de chaînes A, B et C. Les chaînes latérales A sont reliées par leur extrémité réductrice au carbone 6 d'un résidu de glucose des chaînes internes B qui selon leur longueur sont nommées B1, B2, B3 et B4. L'unique chaîne C porte les autres chaînes et possède la seule extrémité réductrice libre de la molécule d'amylopectine.

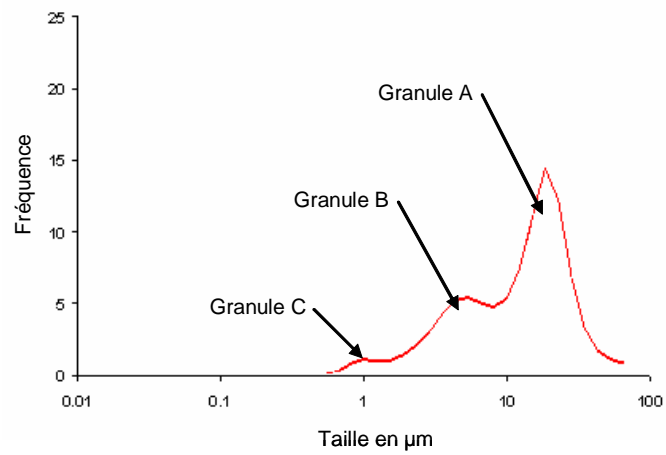
La structure en grappe de l'amylopectine (Figure 16) proposée par Robin et al. en 1974 et 1975 a été déduite de l'étude des chaînes qui la composent. L'utilisation d'enzymes de débranchement telles que l'isoamylase et la pullulanase qui hydrolysent spécifiquement les liaisons entre ramifications, a permis d'identifier trois groupes de chaînes par chromatographie (Hizukuri, 1986 ; Wang et White, 1994 ; Mua et Jackson, 1997) :

- Des chaînes courtes (S) composées des chaînes externes A et des chaînes internes B1 possédant un degré de polymérisation de 12-16 et de 20-24 unités de glucose respectivement.
- Des chaînes longues (L) composées des chaînes internes B2 d'un degré de polymérisation compris entre 42 et 48 unités de glucose.
- Quelques chaînes de type B3 et B4 possédant un degré de polymérisation supérieur à 60 unités de glucose (69-75 et 101-119).

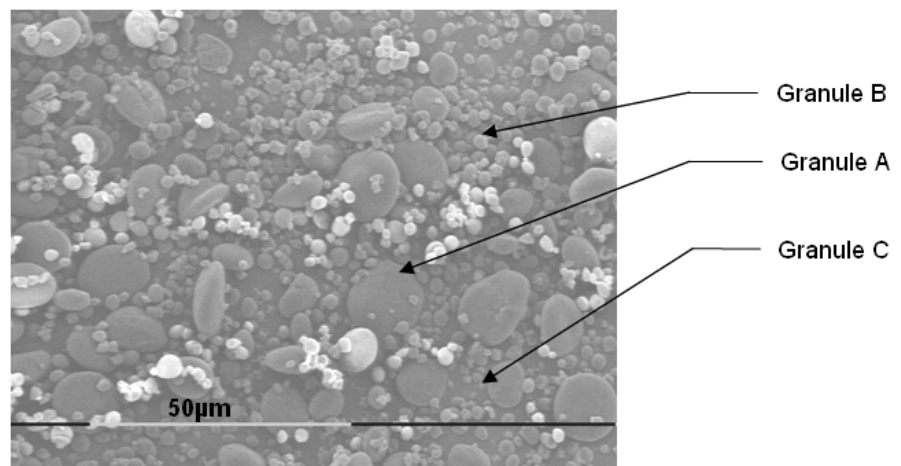
Contrairement à l'amylose, l'amylopectine composée de chaînes ramifiées et courtes présente une faible capacité d'interaction avec l'iode.

### 1.3 Les composés minoritaires de l'amidon

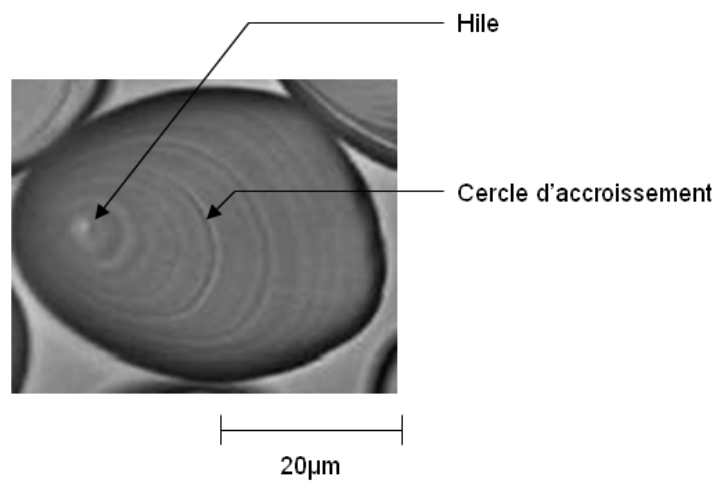
En dehors de l'amylose et de l'amylopectine, quelques composés minoritaires existent dans l'amidon et sont essentiellement des lipides et des protéines. En moyenne, l'amidon des céréales contient jusqu'à 1% de lipides et environ 0.25% de protéines (Baldwin, 2001 ; Swinkels, 1985) du poids sec de l'amidon. Les lipides ont un effet sur les propriétés fonctionnelles de l'amidon (Tester et Morrisson, 1990) et les protéines présentes dans l'amidon sont des protéines de réserves ou des enzymes de dégradation et de biosynthèse de celui-ci (Baldwin, 2001). Les protéines de réserves sont situées dans la matrice protéique qui entoure les granules d'amidon. Les enzymes de dégradation et de biosynthèse sont situées à l'intérieur et à la surface des granules d'amidon (Denyer et al., 1995b). Mis à part les lipides et les protéines, l'amidon contient aussi de faibles quantités (<0.4%) de minéraux (calcium, magnésium, phosphore, potassium et sodium).



**Figure 17.** Distribution de la taille des granules d'amidon chez le blé tendre.



**Figure 18.** Observation en microscopie électronique à balayage de granules d'amidon de blé.



**Figure 19.** Observation en microscopie optique d'un granule d'amidon de pomme de terre.

## 2. Structure de l'amidon

### 2.1 A l'échelle 1-100 $\mu\text{m}$ : le granule d'amidon

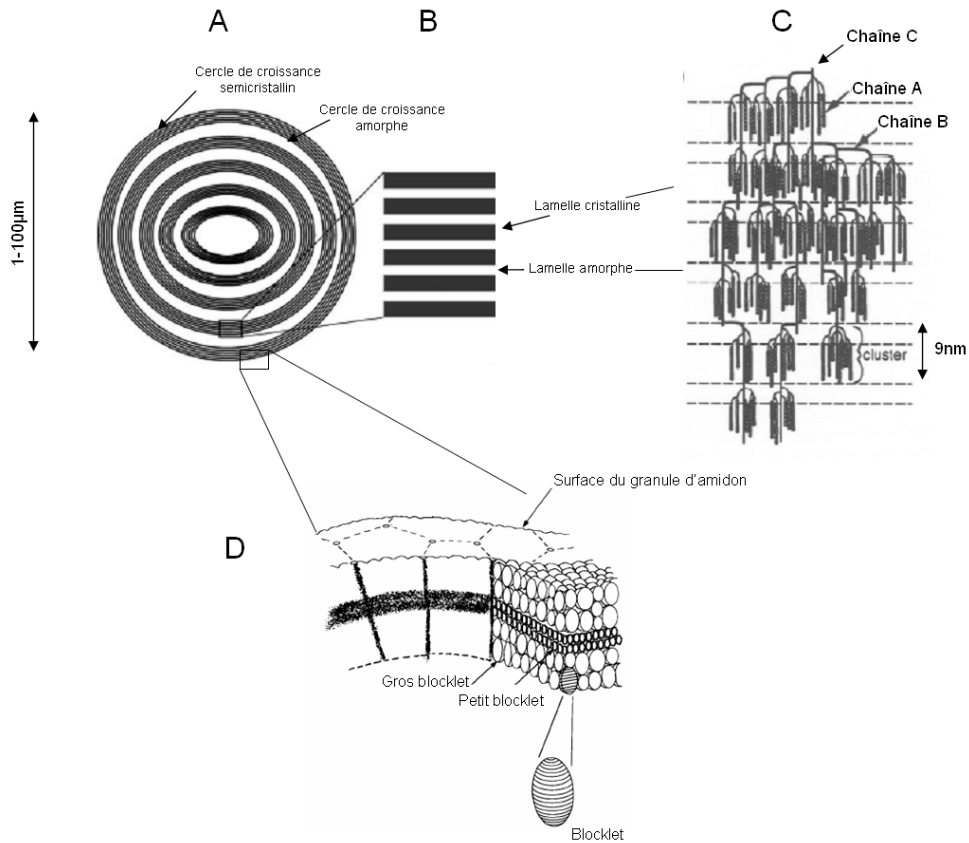
L'amidon est stocké sous forme de granules. La morphologie des granules d'amidon est très différente suivant l'origine botanique. Ainsi, on trouve des granules de formes sphérique, lenticulaire ou encore polyédrique dont la taille varie entre 1 et 100 $\mu\text{m}$ . Leur distribution peut être unimodale, bimodale ou trimodale (Figure 17).

Chez le blé, la distribution est bimodale et on distingue trois types de granules (Bechtel et al., 1990 ; Raeker et al., 1998 ; Stoddard, 1999) (Figure 18):

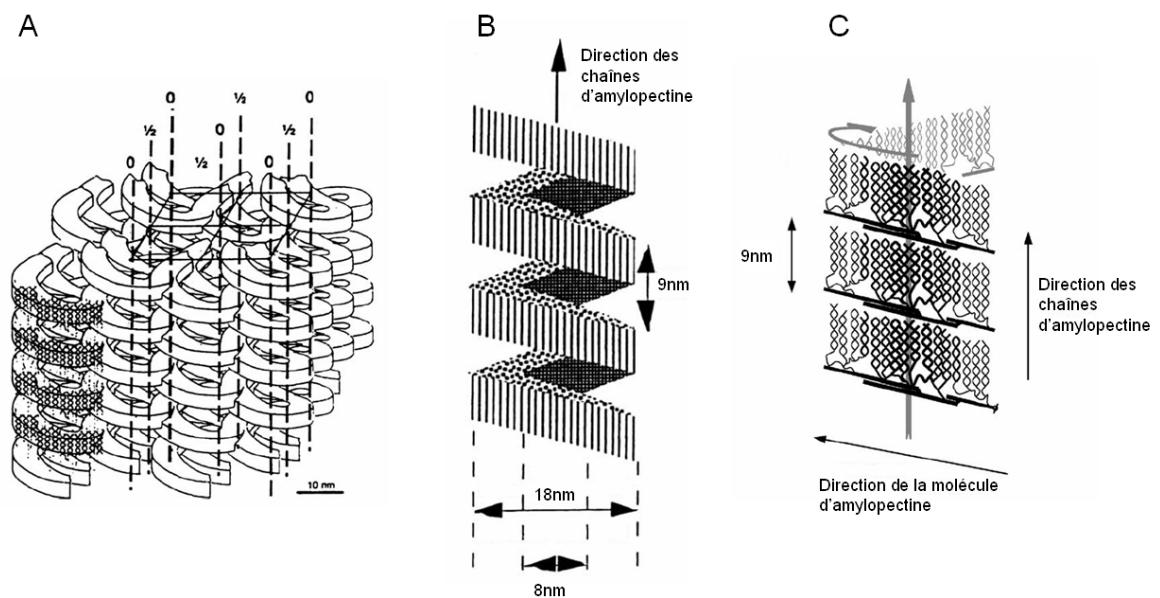
- les granules de type A, de forme lenticulaire et dont la taille est supérieure à 10 $\mu\text{m}$ .
- les granules de type B de forme sphérique et dont la taille est comprise entre 5 et 10 $\mu\text{m}$ .
- les granules de type C dont la taille est inférieure à 5 $\mu\text{m}$  et qui sont sphériques comme les granules de type B.

L'initiation des granules d'amidon se déroule en trois phases chez le blé (Briarty et al., 1979 ; Bechtel et al., 1990). Les granules de type A sont synthétisés entre 3 et 7 jours après l'anthèse. La formation des granules semble ensuite s'arrêter jusqu'à la moitié du développement de l'albumen où une nouvelle formation plus importante de granules va avoir lieu et donner les granules de type B. Une troisième phase d'initiation a aussi pu être observée et donne les granules de type C (Bechtel et al., 1990).

Les granules d'amidon observés par microscopie sous lumière polarisée montrent une croix sombre biréfringente appelée croix de Malte. Cette croix est caractéristique des structures cristallines. En microscopie optique les granules apparaissent translucides. Après une hydrolyse acide qui permet la coupure des liaisons entre les molécules de glucose, l'eau entre dans le granule et il est alors possible de distinguer des cercles concentriques dont le centre est appelé hile (Figure 19). Ces cercles correspondent à une alternance de zones cristallines et de zones amorphes (lamelles amorphes) dont la succession correspond à l'accumulation de l'amidon selon un rythme nyctéméral (French, 1972 ; Robin et al., 1974). Les parties cristallines représentent entre 15 et 45% des granules d'amidon et sont constituées de chaînes d'amylopectine condensées tandis que les zones amorphes sont plus désordonnées (Jenkins et Donald, 1995 ; Gallant et al., 1997).



**Figure 20.** Structure et organisation de l'amidon. (A) un granule d'amidon constitué de cercles de croissance concentriques alternativement semi cristallin et amorphe; (B) structure lamellaire des couches semi cristallines; (C) relation avec la structure moléculaire de l'amylopectine. (Jenkins et al., 1994). (D) Modèle d'organisation en blocklets de l'amidon (Gallant et al., 1997).



**Figure 21.** Organisation superhelicoidale des lamelles cristallines (Oostergetel et Van Bruggen, 1993). (A) Agencement des superhélices (diamètre 18nm, pas 9nm). (B) Représentation du modèle superhelicoidal (Waigh et al., 1999). (C) Organisation de la molécule d'amylopectine dans la superhélice (Bertoft, 2004).

## 2.2 A l'échelle 120-500 nm : les cercles de croissance

Les granules sont constitués d'une alternance d'anneaux de croissance de structure semi cristalline et amorphe. (French, 1984 ; Jenkins et Donald, 1995). Le nombre de cercles de croissance dépend de l'origine botanique de l'amidon et de la quantité de sucre disponible au moment de la biosynthèse. Ces cercles de croissance sont d'une épaisseur comprise entre 120 et 400 nm (French, 1984) (Figure 20).

## 2.3 A l'échelle 20-500 nm : les blocklets

Un modèle d'organisation de l'amidon décrit par Gallant et al. en 1997 présente une organisation de celui-ci en blocklets. Ces blocklets constituent les anneaux de croissance semi cristallins et amorphes et sont subdivisés en deux tailles. Les gros mesurent entre 80 et 120 nm de diamètre chez le blé et les petits mesurent 25 nm de diamètre. Ces blocklets possèdent une structure en lamelles qui sont comme pour les anneaux de croissance soit cristallines soit amorphes (Figure 20D).

## 2.4 A l'échelle 9 nm : les lamelles amorphes et cristallines

Les anneaux semi cristallins consistent en l'empilement de 16 lamelles alternativement amorphes et cristallines. Les lamelles cristallines possèdent une épaisseur comprise entre 5 et 6 nm et les lamelles amorphes une épaisseur comprise entre 2 et 5 nm. La distance entre les lamelles est d'environ 9nm (Oostergetel et Van Bruggen, 1989).

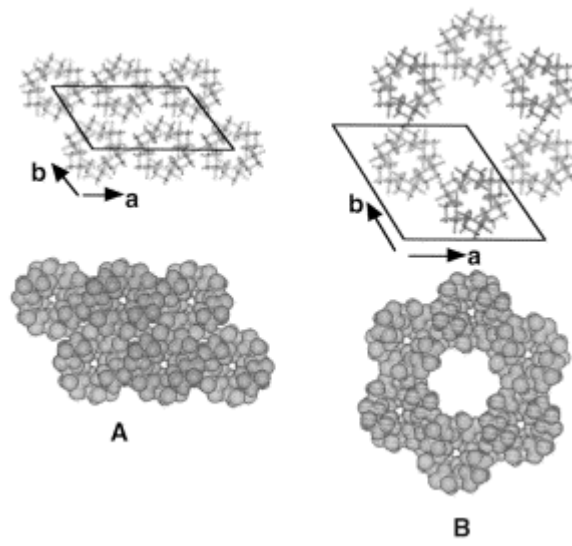
Les lamelles amorphes contiennent les points de branchement des chaînes latérales d'amylopectine et d'amylose alors que les lamelles semi cristallines sont constituées de doubles hélices d'amylopectine. Oostergetel et Van Bruggen en 1993 ont proposé un modèle d'organisation des lamelles cristallines en super hélices qui fut repris par Waigh et al. en 1999 et Bertoft en 2004. Ce modèle consiste en l'organisation des hélices d'amylopectine en blocs de 4 à 5 hélices de largeur qui vont former des superhélices (Figure 21).

## 3. La structure semi-cristalline

### 3.1 La phase cristalline

Les études conduites par diffraction des rayons X ont mis en évidence deux principaux types de cristallins : le type A et le type B. Un troisième, le type C, a été aussi observé chez les légumineuses et correspond à un mélange de cristallins A et B.





**Figure 22.** Agencement des doubles hélices d'amylose pour le cristallin de type A (A) et pour le cristallin de type B (B). Les structure cristallines sont projetées sur un plan  $(a, b)$ .

Ces deux cristallins sont constitués d'un assemblage de doubles hélices, elles-mêmes formées de chaînes de glucose (Figure 22). Chaque tour de double hélice est constitué de 2 fois 6 unités de glucose. Les différences entre ces deux cristallins possédant les mêmes structures hélicoïdales, sont basées sur la configuration des doubles hélices entre elles et sur le contenu en eau (Gidley et Bociek, 1985 ; Imberty et al., 1991). Leur structure est le résultat de l'appariement de doubles hélices stabilisées par des liaisons de type Van der Waals et hydrogène.

Le cristallin de type A, observé principalement chez les céréales, est un réseau de mailles condensées monocliniques où les doubles hélices ont 6 voisins et sont capables de retenir 4 molécules d'eau (Gidley et Bociek, 1985 ; Gidley et Bulpin, 1987 ; Zobel, 1988 ; Popov et al., 2009).

Le cristallin de type B que l'on retrouve le plus souvent chez l'amidon des tubercules possède une structure plus ouverte et de symétrie hexagonale. L'espace entre les doubles hélices de ce cristallin est occupé par 36 molécules d'eau.

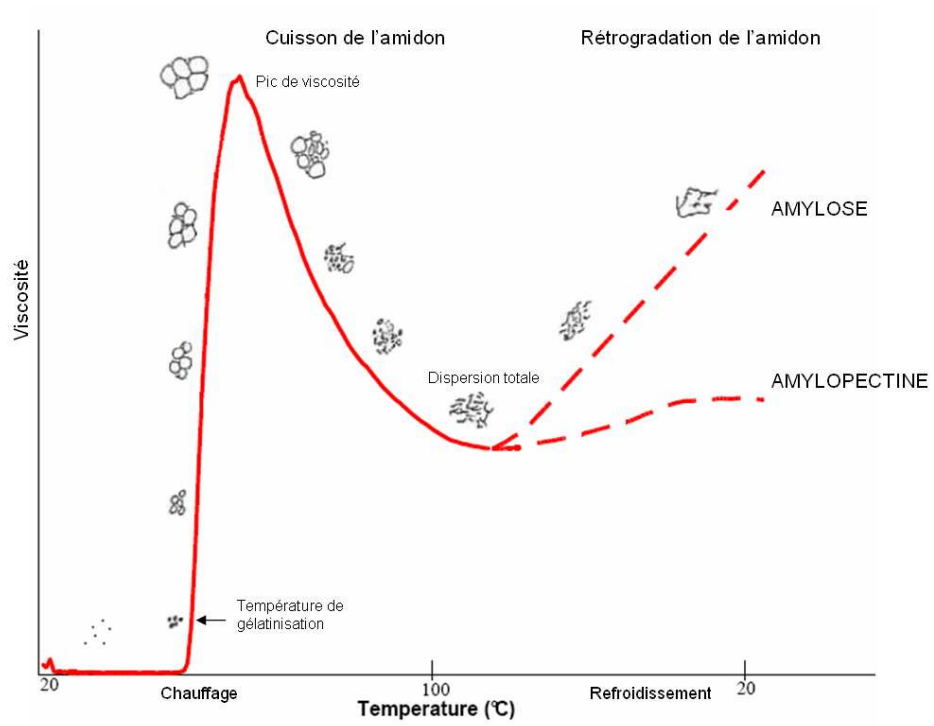
La structure cristalline de type A et B dépend des conditions de stockage. Ainsi l'humidité et la température peuvent changer la structure des phases cristallines et transformer un cristallin de type B en type A. Les doubles hélices se réarrangent et se densifient, empêchant ainsi à l'eau de pénétrer dans la structure. Cette modification physique de l'état de cristallinité de l'amidon est appelée « annealing » (Jayakody et Hoover, 2008).

### 3.2 La phase amorphe

La phase amorphe est peu connue malgré sa prépondérance dans la structure semi-cristalline. Il semble que l'absorption d'eau se fasse au niveau des parties amorphes plutôt qu'au niveau des cristallins.

## **4. Changement d'état de l'amidon en fonction de la température et de l'humidité**

L'amidon est insoluble dans l'eau à température ambiante. Cependant dans des conditions de températures supérieures à 60°C, les granules d'amidon en milieu aqueux absorbent l'eau ; l'amidon gonfle et forme un empois rendant le milieu visqueux. Cette transformation est irréversible et correspond à la gélatinisation. L'empois formé va ensuite subir un phénomène de rétrogradation lors du refroidissement et former un gel.



**Figure 23.** Viscoalvéogramme et états de l'amidon en présence d'eau.

La viscosité lors des changements d'état de l'amidon peut être mesurée grâce à un visco analyseur (Figure 23). En élevant la température, la viscosité va augmenter, former un pic et ensuite diminuer. Cette diminution s'explique principalement par la perte de la structure granulaire de l'amidon et par la solubilisation des polymères le composant. Lors du refroidissement de la solution, la viscosité va augmenter à nouveau du fait de la réassociation des macromolécules qui vont former un gel. Le gel se durcit et va adopter une structure qui tend à expulser l'eau présente entre les polymères. Ce phénomène est appelé synérèse.

#### 4.1 La gélatinisation

Lorsque la température augmente, les granules d'amidon gonflent et les macromolécules d'amylose sortent. Les granules continuent de gonfler jusqu'à atteindre un équilibre. Si la température augmente encore, les granules finissent par éclater et les macromolécules se solubilisent. La gélatinisation correspond à cette transition irréversible d'un état organisé (structure granulaire de l'amidon) à un état désorganisé (solubilisation des macromolécules).

La gélatinisation de l'amidon dans des conditions limitées d'hydratation présente deux endothermes distincts. Donovan en 1979 a montré que ces endothermes étaient dûs au niveau d'hydratation des régions cristallines. La température de transition élevée est due à la fusion des cristallins sans une hydratation correcte. Lorsque l'eau est en quantité suffisante, cette température de transition élevée disparaît et l'on a alors qu'un seul endotherme.

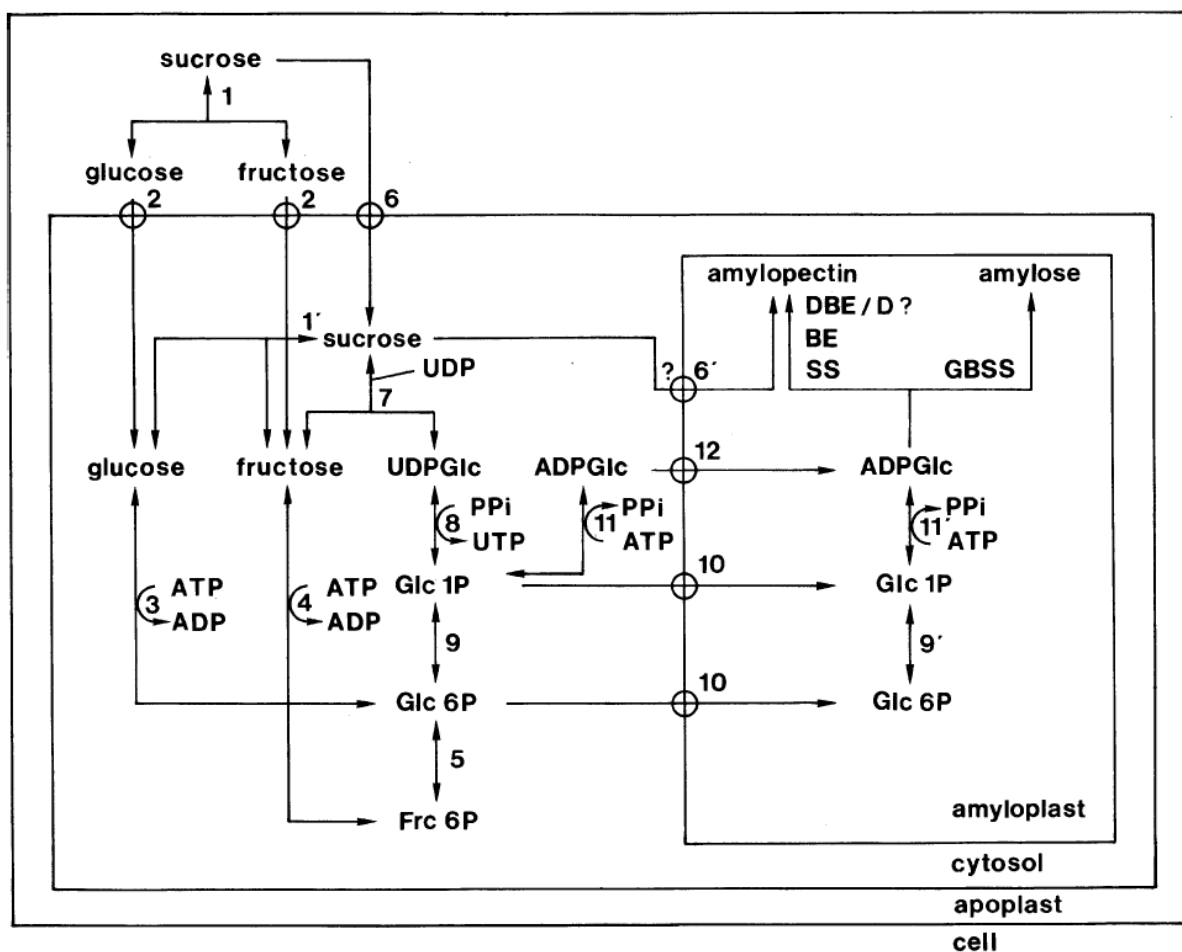
De nombreuses études ont montré que la gélatinisation de l'amidon est due au réarrangement des polymères présents dans les granules (Gallant et al., 1997 ; Atkin et al., 1998 ; Srichuwong et al., 2005). Cependant la manière dont se produit cette gélatinisation est encore sujette à discussion. Une partie de la communauté scientifique pense que la gélatinisation résulte de la dissociation des parties cristallines qui favorise les interactions entre l'eau et l'amidon (Srichuwong et al., 2005 ; Ratnayake et Jackson, 2007) et une autre partie pense que ce phénomène provient de l'absorption d'eau par les régions amorphes (Gallant et al., 1997 ; Karapantsios et al., 2002). Ces deux phénomènes sont certainement simultanés (Evans and Haisman, 1982 ; Ratnayake et Jackson, 2007) et dépendent de la cristallinité de l'amidon, de l'agencement des macromolécules et du niveau d'hydratation des granules.

Chez les céréales, deux endothermes sont observables lorsque l'amidon est suffisamment hydraté. Ceci est dû à la quantité de lipides présente dans l'amidon des céréales. Ces lipides sont en partie complexés par l'amylose et donnent un deuxième

endotherme à une température de 100°C environ qui correspond à la fusion de ces complexes.

#### 4.2 La rétrogradation

Après la gélatinisation et le refroidissement de l'empois d'amidon, un gel opaque se forme. Les macromolécules d'amylose et d'amylopectine solubilisées lors de la gélatinisation se réagencent sous l'effet du refroidissement et forment un réseau qui a tendance à expulser les molécules d'eau. Le gel est composé d'une matrice formée d'amylose qui renferme des molécules d'amylopectine (Miles et al., 1985).



**Figure 24.** Voie métabolique de la biosynthèse de l'amidon dans les cellules non photosynthétiques. (1) invertase apoplastique (EC 3.2.1.26), (1') invertase cytoplasmique (EC 3.2.1.26), (2) transporteur d'hexoses, (3) hexokinase (EC 2.7.1.1), (4) fructokinase (EC 2.7.1.4), (5) glucose phosphate isomerase (EC 5.3.1.9), (6) transporteur de saccharose, (6') transporteur de saccharose, (7) sucrose synthase (Susy) (EC 2.4.1.13), (8) uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase (UGPase) (EC 2.7.7.9), (9) phosphoglucomutase (PGM) cytosolique (EC 2.7.5.1), (9') phosphoglucomutase amyloplastique (EC 2.7.5.1), (10) Transporteur de phosphate, (11) adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase cytosolique (AGPase) (EC 2.7.7.27), (11') adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase amyloplastique (EC 2.7.7.27), (12) Transporteur d'adenosine diphosphate glucose. (Vandeputte et Delcour, 2004)

ADP, adenosine diphosphate; ADPGlc, adenosine diphosphate glucose; ATP, adenosine triphosphate; BE, branching enzyme (EC 2.4.1.18); D, disproportionating enzyme (D-enzyme) (EC 2.4.1.25); DBE, debranching enzyme [isoamylase (EC 3.2.1.68); pullulanase (EC 3.2.1.41)]; Frc 6P, fructose 6 phosphate; GBSS, granule bound starch synthase (EC 2.4.1.21); Glc 1P, glucose 1 phosphate; Glc 6P, glucose 6 phosphate; PPi, inorganic pyrophosphate; SS, starch synthase (EC 2.4.1.21); UDP, uridine diphosphate; UDPGlc, uridine diphosphate glucose; UTP, uridine triphosphate.

**Tableau 5.** Mutations des principaux isoformes des enzymes de la biosynthèse de l'amidon chez les plantes (d'après Jeon et al., 2010 ; Grimaud., 2008)

Enzyme	Plante	Mutant	Distribution des longueurs de chaînes		Reference
			Augmentation	Diminution	
PGM	Arabidopsis thaliana	ND (deficient)	ND	ND	Caspar et al., 1985
	Tabac	ND (deficient)	ND	ND	Hanson et McHale, 1988
	Pois	ND (deficient)	ND	ND	Harrison et al., 1998
AGPase (petite sous unité)	Riz	<i>osagps2</i>	ND	ND	Lee et al., 2007
	Orge	<i>riso16</i>	ND	ND	Thorbjørnsen et al., 1996 ; Johnson et al., 2003
	Maïs	<i>shrunken2 (shr2)</i>	ND	ND	Tsai et Nelson, 1966 ; Preiss et al., 1991 ; Greene et al., 1998 ; Kossman et Lloyd, 2000
AGPase (Grosse sous unité)	Riz	<i>osagpl2</i>	ND	ND	Lee et al., 2007
	Maïs	<i>brittle2 (bt2)</i>	ND	ND	Tsai et Nelson, 1966 ; Preiss et al., 1991 ; Greene et al., 1998 ; Kossman et Lloyd, 2000
	Arabidopsis thaliana	<i>Adg2</i>	ND	ND	Lin et al., 1988
AGPase (petite et grosse sous unités)	Arabidopsis thaliana	<i>Adg1</i>	ND	ND	Lin et al., 1988
Transporteur d'ADP-Glc	Maïs	<i>brittle1</i>	ND	ND	Sullivan et al., 1991 ; Tobias et al., 1992
	Orge	<i>Lys5</i>	ND	ND	Doan et al., 1999 ; Patron et al., 2004
	Orge	<i>waxy</i>	ND	ND	Sano et al., 1984
GBSS	Orge	<i>waxy</i>	ND	ND	Eriksson 1962 ; Patron et al., 2002
	Maïs	<i>waxy</i>	ND	ND	Tsai et al., 1974
	Blé	<i>waxy</i>	ND	ND	Nakamura et al., 1995 ; Fujita et al., 2001
	Pomme de terre	<i>amf</i>	ND	ND	Hovenkamp-Hermelink et al., 1987
	Pois	<i>Lam</i>	ND	ND	Venderleij et al., 1991 ; Denyer et al., 1995
SSI	Riz	<i>ssl</i>	DP 6-7 DP 16-19	DP 8-12	Fujita et al., 2006
	Arabidopsis thaliana	ND (deficient)	DP 17-20	DP 8-12	Delvallé et al., 2005
SSIIa	Riz	la plupart des <i>japonica</i>	DP ≤ 11	DP 12-25	Umemoto et al., 2002
	Orge	<i>sex6</i>	DP 6-11	DP 12-30 DP 31-60	Morell et al., 2003
	Maïs	<i>sugary2 (su2)</i>	DP 6-11	DP 13-20 DP 40-60	Zhang et al., 2004
	Blé	<i>sgp1</i>	DP 6-11	DP 11-25	Yamamori et al., 2000
	Arabidopsis thaliana		ND	ND	Zhang et al., 2008
SSIIIa	Pois	<i>rug5</i>	ND	ND	Craig et al., 1998
	Pomme de terre	ND (deficient)	ND	ND	Edwards et al., 1999
	Riz	<i>flo5</i>	DP 9-15 DP 22-29	DP 6-8 DP 16-20	Isshiki et al., 2000 ; Fujita et al., 2007 ; Ryoo et al., 2007
	Maïs	<i>dull1</i>	ND	ND	Mangelsdorf 1947 ; Gao et al., 1998
	Arabidopsis thaliana	ND (deficient)	ND	ND	Zhang et al., 2005
SSIV	Arabidopsis thaliana	ND (deficient)	ND	ND	Roldan et al., 2007
BEI	Riz	<i>starch branching enzyme1 (sbe1)</i>	DP ≤ 10 DP 24-34	DP ≥ 37 DP 12-21	Satoh et al., 2003
	Riz	<i>bella</i>	DP 14-23 (changement mineur)	DP 7-12 (changement mineur)	Nakamura et al., 2002
BEIIa	Riz	<i>amylose extender (ae)</i>	DP ≥ 18	DP 8-12	Mizuno et al., 1993 ; Nishi et al., 2001
BEIIb	Maïs	<i>amylose extender (ae)</i>	ND	ND	Boyer et Preiss, 1978 ; Stinard et al., 1993 ; Yun et al., 1993
ISA	Riz	<i>sugary1 (su1)</i>	DP ≤ 12	DP ≥ 40	Kubo et al., 1999 ; Kubo et al., 2005 ; Nakamura et al., 2002 ; Wong et al., 2003
	Orge	<i>isa-1</i>	DP 10-13	Pas de changement	Burton et al., 2002
	Maïs	<i>sugary1 (su1)</i>	ND	ND	Pan et Nelson, 1984 ; James et al., 1995
PUL	Riz	<i>pul</i>	DP ≤ 12	DP 13-20	Fujita et al., 2009
	Maïs	<i>zpu1</i>	Pas de changement	Pas de changement	Dinges et al., 2003
Pho1	Riz	<i>pho1</i>	DP ≤ 11	DP 13-21	Satoh et al., 2008

## E. LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE L'AMIDON

L'amidon chez les plantes peut être de deux types suivant sa localisation et son utilisation :

- L'amidon transitoire synthétisé dans les feuilles sert de réserve temporaire de sucres. Il s'accumule dans les chloroplastes pendant la journée et est ensuite dégradé la nuit pour fournir une source de carbone pour la synthèse de saccharose cytosolique. Ce saccharose peut ensuite être transporté au niveau des organes de réserves.
- L'amidon de réserve est stocké dans des organes de réserves. Il pourra ainsi être remobilisé en fonction des conditions climatiques ou être utilisé dans le cas de l'amidon de l'albumen lors du processus de la germination.

La synthèse de l'amidon est un processus complexe et largement étudié (Figure 24 et Tableau 5) dont la principale matière première est le glucose-6-phosphate (Glc-6P). Ce Glc-6P est synthétisé à partir des molécules de trioses phosphates produites lors des réactions claires de la photosynthèse. A la lumière, des molécules d'ATP et NADPH, H<sup>+</sup> sont formées au niveau des thylacoïdes et alimentent le cycle de Calvin en molécules riches en énergie. Ce cycle va capter le carbone atmosphérique (CO<sub>2</sub>) et former des trioses phosphates. Ces trioses phosphates peuvent être transformés dans le stroma en Glc-6P. Celui-ci sera utilisé pour former de l'amidon transitoire ou être exporté dans le cytosol afin d'être converti en saccharose. Le saccharose est ensuite transporté jusqu'aux organes de réserve où il sera dégradé afin d'obtenir du glucose-1-phosphate (Glc-1P) nécessaire à la synthèse d'amidon de réserve.

Le saccharose est dégradé par deux enzymes différentes : la sucrose invertase EC 3.2.1.26 et la sucrose synthase (Susy) EC 2.4.1.13. La sucrose invertase catalyse la transformation irréversible du saccharose en glucose et fructose et participe peu, par comparaison à la Susy, à la synthèse de l'amidon pendant le développement de l'albumen. La Susy catalyse la transformation réversible du saccharose et de l'NDP en D-fructose et NDP-glucose. Cette enzyme possède une affinité plus forte pour l'UDP qui est principalement utilisé lors de la synthèse de l'amidon. L'UDP-glucose formé est ensuite converti par l'UDP glucose pyrophosphorylase (UGPase) en Glc-1P qui sera soit transporté directement dans l'amyloplaste par un transporteur phosphate (Tetlow et al., 1996), soit converti en Glc-6P par la phosphoglucomutase (PGM). L'étude de mutants chez *Arabidopsis thaliana* (Caspar et al., 1985), le tabac (Hanson et McHale, 1988), et le pois (Harrison et al., 1998)



pour l'activité de la PGM a montré son importance dans la synthèse de l'amidon. Une mutation du gène codant pour la PGM induit une forte baisse de la quantité d'amidon synthétisé.

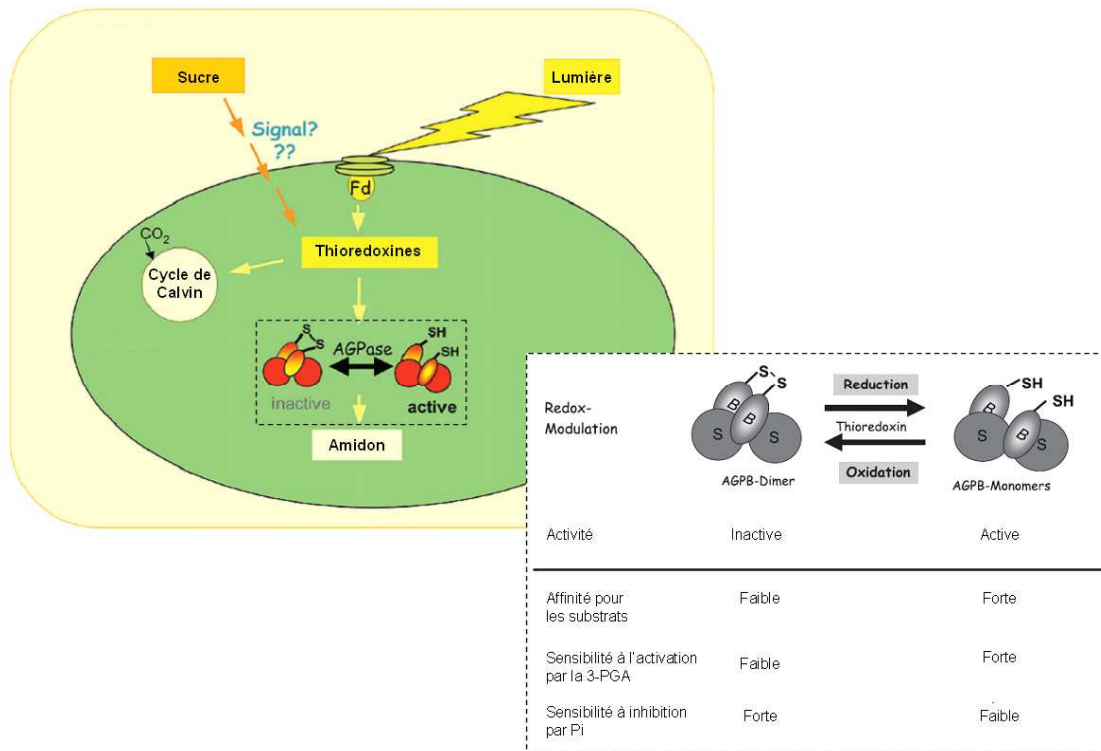
## 1. L'ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase)

### 1.1 Généralités

L'AGPase EC 2.7.7.27 catalyse la transformation du glucose-1-P et de l'ATP en ADP-glucose et en phosphate inorganique (Pi). L'ADP-glucose ainsi formé est utilisé pour la synthèse de l'amidon. Chez les bactéries, l'AGPase est un homotétramère (Haugen et al., 1976 ; Ballicora et al., 2003) tandis que chez les plantes, elle est hétérotétramérique, constituée de deux petites sous unités de 52kDa et de deux grosses sous unités de 53kDa (Okita et al., 1990 ; Gomez-Casati et Iglesias, 2002). D'une manière générale, les petites sous unités sont considérées comme responsables de l'activité catalytique de l'enzyme et les grosses sous unités comme régulatrices de l'activité de l'enzyme (Okita et al., 1990 ; Villand et al., 1993 ; Ballicora et al., 1995). Cross et al., en 2004 ont montré que les grosses sous unités possèdent aussi une action catalytique.

Les séquences nucléiques de la petite sous unité sont plus conservées chez les plantes que ne le sont celles de la grosse sous unité. Chez les céréales, cette enzyme a la particularité de posséder une forme cytosolique et une forme plastidiale alors que chez les plantes autres que graminées cette enzyme est exclusivement plastidiale (Thorbjornsen et al., 1996 ; Beckles et al., 2001). Dans l'albumen, la forme cytosolique est prédominante et représente 85 à 95% de la quantité d'AGPase dans le grain.

Chez le riz, six gènes codent pour les sous unités de l'AGPase. Deux codent pour la petite sous unité (*OsAGPS1* et *OsAGPS2*) et quatre codent pour la grosse sous unité (*OsAGPL1*, *OsAGPL2*, *OsAGPL3*, *OsAGPL4*). *OsAGPS2* possède deux transcrits *OsAGPS2a* et *OsAGPS2b* dont le premier est localisé dans les feuilles et le second dans l'albumen. La localisation de ces enzymes par méthode GFP (Green fluorescent protein) a mis en évidence qu'*OsAGPS2a*, *OsAGPS1*, *OsAGPL1*, *OsAGPL3* et *OsAGPL4* sont des isoformes localisées dans les plastides. Les transcrits *OsAGPS2b* et *OsAGPL2* ont été localisés dans le cytosol (Lee et al., 2007). Chez le blé, l'orge et le maïs deux gènes orthologues des petites sous unités ont été identifiés (Rösti et al., 2006). Chez l'orge, Thorbjornsen et al., en 1996 ont démontré que le gène *AGPS1* codait pour deux transcrits dont la localisation cellulaire



**Figure 25.** Modèle d'activation de l'activité de l'AGPase. Les thioredoxines activent ou inactivent l'enzyme qui sera plus ou moins sensible aux régulations allostériques par le 3-PGA et le Pi (Geigenberger et al., 2005).

était différente et dépendait du premier exon qui dans un cas possède l'information pour l'adressage de la protéine dans les plastes.

## 1.2 Rôle de l'AGPase

L'AGPase est une enzyme limitante de la synthèse de l'amidon. Les approches de transgénèse ont permis de mettre en évidence son importance.

Chez *Arabidopsis thaliana*, Lin et al., en 1988 ont isolé deux mutants aux loci *Adg1* et *Adg2* ayant une quantité d'amidon et une activité de l'AGPase beaucoup plus faible. Les plantes *adg1* ne possédaient ni la grosse sous unité ni la petite sous unité de l'AGPase et produisaient très peu d'amidon. Les plantes *adg2* ne possédaient pas la grosse sous unité de l'AGPase et produisaient environ 40% d'amidon par rapport aux individus normaux. Chez le maïs, la mutation des gènes codant pour la petite ou la grande sous unité cytosolique de l'AGPase (*Shrunken2* et *Brittle2* respectivement) conduit à une baisse de 60% de la synthèse de l'amidon (Tsai and Nelson, 1966 ; Preiss et al., 1991 ; Kossmann et Lloyd, 2000). Chez l'orge, la mutation de la petite sous unité cytosolique de l'AGPase (*Riso16*) conduit à la même diminution de la synthèse d'amidon (Johnson et al., 2003). L'utilisation de ces différents mutants a permis de mettre évidence l'importance de cette enzyme dans la synthèse de l'amidon.

Stark et al., en 1992 ont utilisé une forme mutante de l'AGPase d'*Escherichia coli* appelée *glgC-16* dans le tubercule de pomme de terre ce qui a conduit à l'augmentation de la quantité d'amidon de 35%. La même expérience dans les grains de maïs et de blé a eu pour effet d'augmenter le poids du grain (Wang et al., 2007 ; Smidansky et al., 2002).

## 1.3 Régulation de l'AGPase (Figure 25)

L'AGPase est primordiale à la synthèse de l'amidon et son activité est modulée par plusieurs types de métabolites cellulaires. L'AGPase est très sensible aux régulations allostériques ; l'acide 3 phosphoglycérique (3-PGA) l'active et le phosphate inorganique (Pi) l'inactive. Ces deux métabolites sont les principaux modulateurs de l'activité de l'AGPase (Sowokinos, 1981 ; Sikka et al., 2001) et le ratio de ces deux composés influe grandement sur l'activité de l'enzyme. Cependant la réponse varie entre les différentes céréales. Ainsi chez l'orge, l'AGPase est moins sensible à l'activation par le 3-PGA ou l'inactivation par le Pi (Kleczkowski et al., 1993). Chez le maïs en l'absence de 3-PGA, le Pi ne provoque pas une inactivation de l'enzyme tandis que chez le blé en l'absence de Pi, le 3-PGA ne provoque aucune activation de l'enzyme (Gomez-Casati et Iglesias, 2002).

Dans les feuilles, cette enzyme est aussi régulée par des mécanismes d'oxydoréduction dépendant de la lumière. Le pont di-sulfure présent entre les deux petites sous unités de l'enzyme possède un rôle de régulation dépendant de son état d'oxydation. Ainsi si celui ci est oxydé, l'affinité de l'enzyme pour ses substrats est faible, sa sensibilité à l'activation par le 3-PGA est faible et l'inactivation par le Pi est haute (Fu et al., 1998 ; Ballicora et al., 2000 ; Tiessen et al., 2002).

L'activité de l'AGPase est aussi modulée par les thioredoxines *f* et *m* qui ont la capacité *in vitro* selon leur état d'oxydation de réduire les ponts di-sulfures. Ainsi, les formes réduites des thioredoxines activent l'AGPase (Ballicora et al., 2000, Hendriks et al., 2003) et les formes oxydées l'inactivent (Tiessen et al., 2002). Dans les chloroplastes, la lumière va agir sur le complexe Ferrédoxine/Thioredoxine et changer le niveau d'oxydation de ces dernières ce qui aura pour effet d'activer ou d'inactiver l'AGPase. *In vivo*, les isoformes responsables de la régulation de l'AGPase ne sont pas connues et restent à étudier pour connaître leurs rôles respectifs.

Par ailleurs, l'expression de l'AGPase est aussi modifiée par plusieurs molécules. Elle est augmentée en présence de saccharose chez le tubercule de pomme de terre (Müller-Röber et al., 1990 ; Sokolov et al., 1998) et diminuée par les nitrates (Scheible et al., 1997) et le phosphate (Nielsen et al., 1998).

#### 1.4 Le transporteur de l'ADP-glucose à travers la membrane du plastide chez les céréales

L'ADP-glucose formé dans le cytosol des céréales par l'AGPase est transporté dans l'amylopaste par l'intermédiaire d'un transporteur. Chez le maïs, la mutation *brittle-1* induit un dysfonctionnement du transporteur provoquant une augmentation de la quantité d'ADP-glucose dans le cytosol ainsi qu'une diminution de la quantité d'amidon produite (Sullivan et al., 1991 ; Tobias et al., 1992). Le même comportement est observé chez les mutants *Lys5* de l'orge (Doan et al., 1999, Patron et al., 2004). Ce transporteur peut être inactivé par de longues chaînes d'acétyl coA (Fox et al., 2001).

Les mutations des gènes codant pour l'AGPase cytosolique (*shrunken2*, *brittle2*) ou pour le transporteur d'ADP-glucose (*brittle1*, *lys5*) induisent donc une forte baisse de la quantité d'amidon (60%) (Preiss et al., 1991). Cependant la quantité d'amidon n'est jamais nulle ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes permettant de produire de l'amidon. Plusieurs voies de substitutions ont été suggérées. La plus probable est celle de l'existence de transporteurs de Glucose-1P et Glucose-6P sur la membrane de l'amyloplaste permettant ainsi

à l'AGPase plastidiale de produire de l'ADP-Glucose (Okita, 1992 ; Vandeputte et Delcour, 2004). D'autres voies faisant intervenir le saccharose directement ou indirectement dans la synthèse de l'amidon ont aussi été énoncées notamment par Mukerjea et Robyt en 2003. Ces auteurs ont proposé que le saccharose pourrait être immédiatement utilisé par le complexe de starch synthase et de starch branching enzyme pour former de l'amidon. Il a été aussi montré que, dans les tissus hétérotrophes, la sucrose synthase utilisait aussi l'ADP comme substrat permettant ainsi la formation d'ADP-glucose (Baroja-Fernandez et al., 2003 ; Munoz et al., 2005).

## 2. Les starch synthases

L'ADP-glucose dans l'amyloplaste va pouvoir être utilisé par les starch synthases (SS) EC 2.4.1.21 et EC 2.4.1.242 qui catalysent le transfert d'une molécule de glucose à l'extrémité non réductrice d'une chaîne de glucose liée en  $\alpha$ -1,4. Les starch synthases peuvent être divisées en deux groupes : les starch synthases solubles (SSS) et les starch synthases liées aux granules d'amidon (granule bound starch synthases, GBSS). Les SSS ont une affinité pour l'ADP-glucose plus importante que les GBSS et sont principalement responsables de l'élongation de l'amylopectine tandis que les GBSS allongent les molécules d'amylose. Il existe cinq classes de starch synthases chez les plantes : GBSS, SSI, SSII, SSIII, SSIV (Li et al., 2003) dont le nombre d'isoformes recensées est de 10 actuellement (Fujita et al., 2006 ; Hirose et Terao, 2004). Ces différentes isoformes provenant essentiellement de gènes dupliqués sont notées avec le suffixe « a », « b » ou « c ». Le suffixe est attribué en fonction de l'organe dans lequel le gène est exprimé ; « a » pour les organes de réserves, « b » et « c » pour les tissus végétatifs.

Le séquençage du génome de l'algue verte unicellulaire a montré que la plupart des classes de SS trouvées chez les plantes supérieures sont aussi présentes chez les algues (Ral et al., 2004), suggérant que les événements de duplication qui ont abouti aux cinq groupes de SS ont eu lieu avant l'évolution vers les plantes supérieures.

L'activité métabolique des SSS et des GBSS provient des domaines communs entre ces différentes enzymes ; ces domaines sont très conservés d'un point de vue évolutif. Corpet et al., en 1999 ont montré que tous les isoformes de SS possèdent trois domaines homologues (I, II, III). Le domaine I se trouve uniquement chez les starch synthases alors que le domaine II est aussi trouvé par exemple chez l' $\alpha$ -amylase de la levure. Le domaine III est aussi présent chez les protéines transférant des nucléosides (UDP, ADP, GDP...) sur un

substrat comme par exemple la sucrose synthase. Les différences entre les isoformes de SS se trouvent essentiellement au niveau de la région N-terminale située en amont du domaine I.

Dans le domaine I des SS, Furukawa et al., en 1990 et 1993 ont mis en évidence par mutagenèse dirigée un motif KTGGL où la lysine fait partie d'un site de fixation de l'ADP-glucose. Ce motif, très conservé, est trouvé à la fois chez les glycogène synthases et les starch synthases. Par la même approche, Zhong et al., en 2000 ont mis en évidence dans le domaine III de la SSIIa un motif très similaire (STGGLV) qui est aussi très conservé chez les starch synthases des plantes.

## 2.1 GBSS

### a) Généralités

La GBSS est le produit du gène *waxy* (*wx*) et est contrairement aux autres isoformes de SS seulement présente dans les granules et liée à ceux-ci. Cette enzyme possède un poids moléculaire d'environ 60kDa. Chez *Arabidopsis thaliana* un seul gène code pour la GBSS. Chez le blé, deux isoformes (GBSSI et GBSSII) ont été identifiées (Vrinten et Nakamura, 2000). Ces isoformes sont exprimées dans l'albumen pour la GBSSI et dans les tissus verts tels que les feuilles et le péricarpe pour la GBSSII (Vrinten et Nakamura, 2000). Trois gènes codent pour les GBSSI chez le blé tendre. Ces gènes appelés *waxy* sont situés aux loci *wx-A1* ; *wx-B1* et *wx-D1*. Ces loci se trouvent sur le bras court du chromosome 7A, le bras long du chromosome 4A et le bras court du chromosome 7D respectivement (Yamamori et al., 1994). Cette enzyme est principalement responsable de la synthèse de l'amylose.

Des mutants pour les gènes *wx* aboutissant à l'inactivité de la GBSSI ont été trouvés chez plusieurs espèces végétales. Ainsi chez le maïs, un mutant *waxy* décrit par Tsai, en 1974 produit une quantité d'amidon proche de celle observée chez les individus normaux mais possède une quantité d'amylose très réduite et proche de 0. D'autres mutants concernant l'expression des GBSS ont été rapportés chez la pomme de terre avec le mutant *anf* (Hovenkamp-Hermelink et al., 1987), le pois avec le mutant *lam*, (Vanderleij et al., 1991 ; Denyer et al., 1995a), le maïs *waxy* (Tsai, 1974), le riz *waxy* (Sano, 1984), l'orge *waxy* (Eriksson, 1962), le blé (*Triticum aestivum*) *waxy* (Nakamura et al., 1995), et *Triticum monococcum waxy* (Fujita et al, 2001). Dans le cas du blé, des mutants pour chacun des trois gènes *wx* ont permis d'étudier les effets des différents allèles avec des blés possédant un, deux ou trois allèles nuls (Miura et al., 1994, 1999 ; Miura et Sagawara, 1996). Lorsqu'un seul des

trois gènes de GBSS est inactif, une faible diminution (1 à 2%) du contenu en amylose est observée. Lorsque deux des trois gènes sont inactifs, la diminution est plus conséquente et la quantité d'amylose n'est plus que de 18-20%. Lorsque les trois allèles sont nuls alors la quantité d'amylose n'est pas nulle mais très faible (1%) ce qui laisse penser que d'autres mécanismes permettent la synthèse de l'amylose.

#### *b) Propriétés de l'enzyme*

Les expériences *in vitro* conduites chez le pois, chez la pomme de terre (Denyer et al., 1996a, 1996b), chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas* (Van de Wal et al., 1998) ont montré que la synthèse d'amylose était stimulée en présence d'oligosaccharides de maltose (2-7 molécules de glucose) (MOS) et que ces derniers servaient d'initiateurs de la synthèse d'amylose. Ces expériences ont mis en évidence d'une part que les MOS pouvait rentrer dans les granules d'amidon et d'autre part que la GBSSI avait la capacité de continuer l'élongation de ces sucres pour former de l'amylose.

Chez le pois, l'étude de mutants produisant une GBSSI soluble chez *E. coli* a montré que contrairement à la forme liée aux granules, cette enzyme soluble possède une faible affinité pour les MOS et ne réalise pas leur élongation afin de produire de l'amylose (Denyer et al., 1999a). Cependant lorsqu'une faible quantité d'amylopectine est ajoutée, l'affinité de la GBSS pour les MOS augmente et l'enzyme fonctionne. Cette expérience a montré que la capacité de la GBSS à produire de l'amylose résultait de son aptitude à se lier avec l'amylopectine.

Par ailleurs chez *Chlamydomonas*, d'autres études ont mis en évidence que la GBSSI possède aussi la capacité d'incorporer les molécules de glucose dans les chaînes les plus longues d'amylopectine (Van de Wal et al., 1998 ; Ral et al., 2006). Des extraits purifiés de granules mis en présence d'ADP glucose radiomarqué ont montré que la GBSSI incorporait le glucose et allongeait les ramifications de l'amylopectine. En effet, après 6 heures d'incubation, le marquage se trouve aussi dans une fraction dont la structure et le poids moléculaire est similaire à celui de l'amylose. Cette expérience chez *Chlamydomonas* met en évidence la capacité de la GBSSI à réaliser l'élongation de la molécule d'amylopectine dont les très longues chaînes ainsi produites pourraient être clivées par une hydrolase et aboutir à la formation de molécules similaires à l'amylose. Chez le pois, comme chez les plantes supérieures, un tel transfert des molécules de glucose marquées de l'amylopectine à l'amylose n'a pas été observé (Denyer et al., 1999b). Il en résulte que la GBSSI chez *Chlamydomonas*, peut générer l'amylose *in vitro* grâce à deux mécanismes différents tandis

que chez les plantes supérieures, la synthèse d'amylose à partir des MOS est le seul mécanisme de synthèse démontré. Cependant plusieurs autres expériences laissent penser que la GBSS est impliquée dans la synthèse des longues chaînes de l'amylopectine. (Denyer et al., 1996a). Ainsi l'étude des mutants *wx* chez le riz a montré que l'amylopectine était dépourvue des chaînes longues (Hizukuri et al., 1989) et par ailleurs les variétés riches en amylose possédaient une proportion plus importante de ces longues chaînes (Takeda et al., 1987).

## 2.2 Les starch synthases SSI

### a) Généralités

Chez les plantes, la SSI contrairement à toutes les autres SS ne possède pas d'isoforme. Elle est codée par un seul gène, et est exprimée à la fois dans les feuilles et dans l'albumen. Chez le blé la SGP-3 est l'enzyme homologue de la SSI du maïs (Knight et al., 1998). Trois gènes homéologues codent pour la SGP-3 chez le blé et sont situés sur les bras courts des chromosomes 7A, 7B et 7D. La protéine SSI possède un poids moléculaire de 75 kDa et est présente à la fois dans les granules et la fraction soluble (Li et al., 1999). Mu-Forster et al., en 1996 ont rapporté que plus de 85% de la SSI présente dans l'albumen du maïs était associée aux granules d'amidon.

### b) Propriétés

Guan et Keeling en 1998 ont analysé la longueur des chaînes de glucose synthétisées par des SS de maïs et des isoformes de branching enzymes de maïs introduites dans *E. coli*. Ils ont ainsi montré que les SSI synthétisaient préférentiellement des chaînes courtes (DP 6-15). Commuri et Keeling en 2001 ont mis en évidence que la SSI du maïs, malgré son affinité plus importante pour les chaînes longues de sucres (DP>20), catalyse l'élongation des courtes chaînes de glucose dont le DP est inférieur à 10. L'activité de l'enzyme est diminuée à mesure que la chaîne de sucres s'allonge. Cette enzyme allonge les chaînes courtes A et B1 lors de la synthèse de l'amidon.

L'étude de mutants déficients en SSI chez *Arabidopsis thaliana* (Delvallé et al., 2005) a montré que cette mutation induisait une modification de la distribution des tailles de chaînes d'amylopectine se traduisant par une diminution des chaînes de DP 8 à 12 et une augmentation des chaînes de DP 17 à 20. Fujita et al., en 2006 ont effectué la même étude chez des mutants de la SSI du riz et ont confirmé ces observations.



La SSI catalyse l'élongation de courtes chaînes (DP 8 à 12) de l'amylopectine à partir des chaînes plus courtes.

### 2.3 Les starch synthases SSII

#### a) Généralités

Trois isoformes ont été détectés pour les SSII : SSIIa, SSIIb et SSIIc. Ces isoformes ont différentes localisations. SSIIa est principalement exprimé dans l'albumen, SSIIb dans les feuilles et SSIIc dans les deux (Hirose et Terao, 2004). Ces isoformes possèdent des poids moléculaires de 100, 108 et 115 kDa (Denyer et al. 1995b ; Li et al., 1999).

Chez le blé, la SGP-1 est un homologue de la SSII et est plus proche de l'isoforme SSIIa (Li et al., 1999). Il existe trois isoformes de la SGP-1 : SGP-A1, SGP-B1 et SGP-D1. Ces gènes sont localisés sur les bras courts des chromosomes 7A, 7B et 7D respectivement (Yamamori et Endo, 1996).

#### b) Propriétés

Plusieurs mutants de la SSIIa ont été décrits chez de nombreux organismes : *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2008), le pois mutant *rug5* (Craig et al., 1998), la pomme de terre (Edwards et al., 1999), l'orge mutant *sex6* (Morell et al., 2003), le maïs mutant *sugary2* (Zhang et al., 2004), le riz (Umemoto et al., 2002) et le blé (Yamamori et al., 2000). Ces différents génotypes possèdent une modification de la structure de l'amylopectine. En effet la distribution des longueurs de chaînes de l'amylopectine chez les individus déficients en SSII est changée, il y a davantage de chaînes de DP 6 à 11 que de chaînes de DP 11 à 25 (Hanashiro et al., 1996). La SGP-1 synthétiserait donc des chaînes de longueurs intermédiaires à partir de chaînes courtes.

Cependant, plusieurs différences concernant l'amidon ont pu être observées entre les différents mutants sus cités. Ainsi les mutants du pois *rug5* et le mutant SGP-1 nul chez le blé ont leur contenu en amidon diminué d'environ 30-40% par rapport aux individus normaux (Craig et al., 1998, Yamamori et al., 2000). Par ailleurs, le mutant *rug5* et SGP-1 nul chez le blé possède un contenu en amylose plus important que la normale ce qui n'est pas le cas chez la pomme de terre (Edwards et al., 1995, 1999). Chez le blé SGP-1 nul, une diminution de l'expression des SGP-2 (homologue de la branching enzyme IIb du maïs) et SGP-3 (homologue de la SSI du maïs) a été observée (Yamamori et al., 2000). Ces différences entre espèces laissent penser que l'absence de la SSII a un effet sur les autres enzymes de la synthèse de l'amidon.

## 2.4 Les starch synthases SSIII

### a) Généralités

Deux gènes *SSIII* sont présents chez le riz : *SSIIIa* (*SSIII-2*) et *SSIIIb* (*SSIII-1*). Chez le riz, ces gènes sont exprimés dans l'albumen en développement et les feuilles respectivement (Hirose et Terao, 2004 ; Dian et al., 2005 ; Ohdan et al., 2005).

L'étude par immunoblot utilisant un antiserum anti *SSIII* du maïs a permis de révéler sur SDS-PAGE une protéine d'un poids moléculaire de 230 kDa dans l'albumen du riz en développement (Dian et al., 2005). L'étude de cette protéine a mis en évidence la présence d'un peptide « transitoire » dans la partie N-terminale, un domaine C-terminal catalytique commun aux *SS* et un domaine central spécifique des *SSIII* contenant des motifs observés aussi chez le maïs et le blé (Gao et al., 1998 ; Li et al., 2000). Chez le blé, un homologue du gène *SSIII* du maïs a été cloné et caractérisé. Ce gène a été assigné au chromosome 1 (Li et al., 2000).

### b) Propriétés

L'isoforme *SSIIIa* est, en terme d'activité, le deuxième plus actif après la *SSI* dans l'albumen en développement chez le maïs (Cao et al., 1999). Des mutants pour cette enzyme ont été isolés et caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2005), chez le riz (Isshiki et al., 2000 ; Fujita et al., 2007) et chez le maïs (mutant *dull-1*) (Mangelsdorf, 1947 ; Gao et al., 1998).

Chez le mutant *dull-1* du maïs, le contenu apparent en amylose dans l'albumen est plus élevé que chez les individus normaux (Yeh et al., 1981 ; Wang et al., 1993). Par ailleurs, l'activité des autres *SSS* dans le mutant est augmentée (Cao et al., 1999) et un accroissement de la quantité de *SSI* est aussi observée. L'étude de *SSIII* purifiée a mis en évidence une plus forte affinité de cette enzyme pour l'amylopectine que pour l'amylose suggérant une fonction d'élongation des longues chaînes de glucose. L'étude de la distribution des longueurs de chaînes a révélé que le nombre de chaînes de DP 6 à 8 et DP 16 à 20 est réduit, que le nombre de chaînes d'un DP 9 à 15 et 22 à 29 est augmenté et que celui des longues chaînes d'amylopectine (DP>30) est fortement réduit (Inouchi et al., 1983 ; Wang et al., 1993).

La *SSIII* est donc vraisemblablement responsable de l'élongation des chaînes d'amylopectine les plus longues. Cependant chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant pour la *SSIII* possède un excès d'amidon dans les feuilles mais la structure de l'amylopectine n'est pas changé (Zhang et al., 2005). Cet excès d'amidon est dû à une augmentation de la synthèse

de celui-ci, suggérant un effet régulateur négatif de la SSIII sur la biosynthèse de l'amidon transitoire (Zhang et al., 2005). La SSIII possède donc des effets spécifiques selon les espèces considérées qui peuvent s'expliquer soit par des effets pléiotropiques qui ont déjà pu être observés chez le riz (Fujita et al., 2007) soit par des phénomènes de compensation des autres gènes de SS propres à chaque espèce.

## 2.5 La starch synthase SSIV

### a) Généralités

La SSIV possède une région C-terminal très proche de celle des autres SS avec un domaine catalytique et un domaine de liaison à l'amidon (Cao et al., 1999). Cependant la partie N terminale de la SSIV est différente des autres isoformes. Hirose et Terao en 2004 ont montré que deux gènes de SSIV étaient présents chez le riz : SSIVa (SSIV-1) et SSIVb (SSIV-2). SSIVa est exprimé à la fois dans les feuilles et dans l'albumen et SSIVb uniquement dans les feuilles. La SSIV est exprimée à un niveau constant durant toute la période de remplissage du grain.

### b) Propriétés

Des mutants déficients pour la SSIV ont été observés chez *Arabidopsis thaliana* (Roldan et al., 2007). Ces mutants ont montré une baisse faible mais significative du contenu en amidon. Contrairement aux autres mutants des SS, les mutants de SSIV présentent un phénotype avec d'importants problèmes de croissance, avec peu ou pas de modification dans la composition des granules d'amidon ou la distribution des longueurs de chaînes de l'amidon. Cependant ces mutants montrent une diminution très importante du nombre de granules d'amidon synthétisés dans les plastides et une augmentation de la taille de ces derniers. Ainsi seul un gros granule d'amidon est présent dans les chloroplastes au lieu de 4-5 en moyenne. Ces différents résultats ont permis de suggérer que la SSIV est impliquée dans l'initiation des granules d'amidon mais n'est certainement pas la seule enzyme possédant une telle fonction puisqu'un granule d'amidon est présent chez les mutants déficients en SSIV (Roldan et al., 2007 ; Szydlowski et al., 2009).

## 3. Les branching enzymes

Après l'élongation de la chaîne de glucose par les starch synthases, les starch branching enzymes (SBE) EC 2.4.1.18 ou Q enzymes catalysent l'hydrolyse d'une liaison  $\alpha$ -1,4 et le

transfert d'une unité C<sub>6</sub>-glucosyl sur cette fin réductrice par l'intermédiaire d'une liaison  $\alpha$ -1,6.

### 3.1 Généralités

Il existe deux groupes de SBE (SBEI et SBEII) qui diffèrent par les longueurs de chaînes transférées *in vitro*. La SBEII transfère des chaînes plus courtes que la SBEI (Takeda et al., 1993 ; Guan et Preiss, 1993 ; Rydberg et al., 2001). Chez les céréales la SBEII possède deux formes proches en structure (SBEIIa et SBEIIb) (Mizuno et al., 2001, Rahman et al., 2001) qui diffèrent *in vitro* par la longueur des chaînes qu'elles transfèrent dans des conditions d'incubation prolongée. Ainsi la SBEIIb transfère des chaînes plus courtes que la SBEIIa.

Les isoformes de SBE sont exprimées dans des tissus différents à des temps différents. SBEI et SBEIIa sont exprimées dans l'albumen et dans plusieurs autres tissus (feuilles, embryon) chez les céréales tandis que la SBEIIb est exclusivement exprimée dans l'albumen et les tissus reproducteurs. Chez le riz l'expression de la SBEIIa a été détectée au plus tôt 3 jours après la floraison (DAF) et au plus tard 5 à 7 DAF (Mizuno et al., 2001). L'expression de la SBEIIa atteint un pic au milieu du développement des grains de blé (Rahman et al., 2001). Les transcrits de la SBEI et de la SBEIIb sont plus abondants plus tardivement soit à partir de 7 à 10 DAP chez le riz (Rahman et al., 2001).

### 3.2 Propriétés

L'étude de mutants des différents isoformes de SBE a permis d'identifier leur rôle dans la synthèse de l'amidon. Les mutants de la SBEI chez le riz ont montré une diminution du nombre de chaînes de DP 12 à 21 et DP>37, une augmentation de celles de DP<10 et une légère augmentation de celles de DP 24 à 34 (Sato et al., 2003). La SBEI possède donc un rôle important dans la synthèse des chaînes B1, B2 et B3 de l'amylopectine (Nakamura, 2002 ; Sato et al., 2003).

Chez les riz mutants ne possédant pas l'enzyme SBEIIa, les changements de structure de l'amylopectine sont mineurs suggérant pour cet enzyme un rôle de compensation des autres isoformes SBEIIb et SBEI (Nakamura, 2002). Les mutants amylose extender (*ae*) sont déficients en SBEIIb. Ces mutants existent chez le maïs (Boyer et Preiss, 1978) et le riz (Mizuno et al., 1993 ; Nishi et al., 2001).

Chez le riz, plusieurs effets de ces mutations sur l'amidon ont été mis en évidence: une diminution du niveau des chaînes d'amylopectine dont le DP est inférieur à 17 avec la plus forte baisse pour celles dont le DP est compris entre 8 et 12 ; une augmentation du nombre de chaînes intermédiaires (DP 18 à 36) et longues (DP>38) et un contenu en amylose apparent élevé causé par une structure anormale de l'amylopectine (Nishi et al., 2001). Par ailleurs, la mutation *ae* diminue l'activité de la SSI et suggère donc que la SBEIIb a un rôle de transfert de chaînes courtes qui sont le plus probablement ensuite allongées par la SSI pour former des chaînes A et B1 chez le riz (Nishi et al., 2001).

#### 4. Les starch debranching enzymes

La manière dont l'amidon insoluble est dégradé en molécules de glucose dans l'albumen des céréales est connue. Lors de la germination, la dégradation de l'amidon est initiée par les  $\alpha$ -amylases présentes dans l'albumen amylicé (Fincher, 1989). Cette enzyme possède une action endoamylolytique et forme un mélange d'oligosaccharides ramifiés et linéaires qui sont ensuite utilisés par d'autres hydrolases dont les enzymes de débranchement et les exoamylases ( $\beta$ -amylase).

Dans les tissus possédant des cellules vivantes (les feuilles par exemple), un mécanisme différent dégrade l'amidon à l'intérieur des plastides. *Arabidopsis thaliana* possède trois isoamylases différentes (ISA1, ISA2, ISA3) et une pullulanase (PU1). Des mutants ne possédant pas les 3  $\alpha$ -amylases ne présentent aucun changement concernant la dégradation de l'amidon dans les feuilles (Yu et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que la dégradation de l'amidon chez les plantes nécessitait l'intervention d'une ou plusieurs enzymes appartenant à la famille des « glucane water dikinases » qui peuvent catalyser la phosphorylation d'un résidu de glucose dans la macromolécule d'amylopectine (Lorberth et al., 1998 ; Yu et al., 2001 ; Kötting et al., 2005).

##### 4.1 Généralités

Les starch debranching enzymes EC 3.2.1.10 catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,6. Deux types de DBE possédant des substrats spécifiques ont pu être observés : l'isoamylase EC 3.2.1.68 et la pullulanase (aussi appelé limit dextrinase) EC 3.2.1.41. Les isoamylases possèdent la capacité de débrancher à la fois le glycogène, le phytoglycogène et l'amylopectine mais ne sont pas capables de dégrader le pullulane (Nakamura, 1996). La pullulanase est quand à elle capable de catalyser l'hydrolyse du pullulane et de l'amylopectine mais pas du glycogène et du phytoglycogène.

## 4.2 Propriétés

Ces enzymes ont longtemps été considérées comme des enzymes de dégradation de l'amidon. Cependant plusieurs études ont montré que ces enzymes avaient aussi un rôle dans la biosynthèse de l'amidon. ISA1 et ISA2 participent à la formation d'un complexe enzymatique, nécessaire à la biosynthèse de l'amidon (Myers et al., 2000 ; Bustos et al., 2004 ; Delatte et al., 2005). La mutation d'un de ces deux gènes chez *Arabidopsis* conduit à l'accumulation de glucanes possédant un modèle de branchements différent de celui des individus normaux avec une accumulation sous forme de phytoglycogène soluble. Ceci a aussi pu être observé chez les mutants *sugary-1* du maïs (Pan et Nelson, 1984 ; James et al., 1995) et *isa-1* chez l'orge (Burton et al., 2002). Zeeman et al., en 1998, ont montré que les glucanes ainsi accumulés par ces mutants sont dégradés pendant la nuit suggérant que ISA1/ISA2 ne sont pas les uniques enzymes responsables de la dégradation de l'amidon.

L'étude des mutants *sugary-1* (Kubo et al., 1999 ; Wong et al., 2003) et *isoamylase-1* (Fujita et al., 2003) chez le riz a montré que les deux DBE avaient un rôle dans la synthèse de l'amylopectine dans l'albumen (Fujita et al., 2003 ; Kubo et al., 1999 ; Nakamura, 1996 ; Wong et al., 2003). Le mutant *sugary-1* dont l'activité des isoamylases et de la pullulanase est très réduite voire inexistante, possède dans son amylopectine plus de chaînes courtes DP<12 et moins de chaînes de DP 13 à 24 que l'amylopectine des individus normaux. Par contre le phytoglycogène est hautement ramifié dans les mutants par rapport aux individus normaux. Par ailleurs, chez les mutants *isoamylase1* qui sont déficients en isoamylase mais possèdent une pullulanase fonctionnelle, une modification importante de l'amylopectine insoluble avec des chaînes courtes DP 5 à 12 par rapport à l'individu normal a été observée. Le mutant *pul*, déficient en pullulanase possède aussi plus de chaînes courtes DP<13. Le double mutant *pul/sugary-1* possède une quantité de chaînes de DP<8 encore plus importante que le mutant *sugary-1* (Fujita et al., 2009).

L'étude de mutants pour ISA3 et PU1 chez *Arabidopsis thaliana* (Hussain et al., 2003 ; Wattebled et al., 2005) a montré que ces enzymes avaient un rôle dans la dégradation de l'amidon. Ainsi ISA1 et ISA2 possèdent à la fois un rôle dans la biosynthèse de l'amidon et dans sa dégradation tandis que les enzymes ISA3 et PU1 possèdent essentiellement un rôle dans la dégradation.

## 5. Les autres enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon

D'autres enzymes dont le rôle est encore mal connu ont été étudiées afin de déterminer leur implication dans la biosynthèse de l'amidon.

### 5.1 La starch phosphorylase

La starch phosphorylase catalyse le transfert réversible d'un phosphate inorganique lié en  $\alpha$ -1,4 à une unité de glucose de la fin non réductrice des chaînes externes pour former du glucose-1P. Cette enzyme possède deux isoformes PHO-L et PHO-H dont la localisation cellulaire est différente (Conrads et al., 1986). La PHO-L est située dans les plastides et la PHO-H dans le cytosol. Chez le blé, la forme plastidiale a récemment été caractérisé (Tickle et al., 2009).

La forme PHO-H possède une affinité forte pour le glycogène et faible pour les MOS (Shimomura et al., 1982). L'activité de cette forme a été diminuée chez la pomme de terre par l'introduction d'un ARN antisens (Duwenig et al., 1997). Ces mutants ont montré peu de différences du point de vue du métabolisme des sucres. Il en a été de même pour les mutants constitués pour la forme plastidiale de cette enzyme dans les feuilles de la pomme de terre (Sonnewald et al., 1995). Chez le riz, le mutant *pho1* présente une accumulation de petits granules d'amidon, avec un albumen au phénotype de type « shrunken » (Sato et al., 2008). Ces mutants ont un amidon possédant une plus grande proportion de chaînes courtes DP<12 et moins de chaînes intermédiaire de DP 13-21.

Plusieurs autres études ont montré que cette enzyme avait un effet sur la voie de biosynthèse de l'amidon. Ainsi la faible concentration en Glucose-1P observée et le ratio Pi/G1P dans les tissus produisant de l'amidon suggère que la starch phosphorylase possède un rôle dans la dégradation plutôt que dans la voie de biosynthèse de l'amidon (Smith et al., 1997 ; Yu et al., 2001). Plusieurs études ont malgré tout montré que l'activité de la starch phosphorylase est fortement corrélée à l'accumulation de l'amidon dans l'albumen en développement chez le blé (Schupp et Ziegler, 2004).

Par ailleurs, la starch phosphorylase est capable de s'associer avec la BE1 et la BEIIb (Tetlow et al., 2004) pour former un complexe dans l'albumen du blé suggérant une activité coordonnée de ces deux enzymes de branchements pendant la synthèse de l'amidon.

## 5.2 La glucane water dikinase

La phosphorylation de l'amidon intervient durant toutes les réactions de biosynthèse. Cependant les enzymes responsables de cet état de phosphorylation sont encore mal connues. Une protéine possédant un poids moléculaire de 160kDa appelée R1 et attachée au granule d'amidon chez la pomme de terre semble être en partie responsable de la phosphorylation de l'amidon (Lorberth et al., 1998). Une déficience en cette enzyme induit une diminution de la phosphorylation de l'amidon (Ritte et al., 2002). Cette enzyme phosphoryle les chaînes de glucose par une réaction de type dikinase dans laquelle le  $\beta$  phosphate de l'ATP est transféré sur les positions C6 ou C3 des résidus de glucose de l'amylopectine et le  $\gamma$ -phosphate dans l'eau. Cette protéine est une  $\alpha$ -glucan water dikinase (GWD) EC 2.7.9.4 (Ritte et al., 2002). La GWD possède une faible affinité pour l'amylose (Ritte et al., 2002 ; Ritte et al., 2006). L'étude de mutants déficients pour la GWD chez la pomme de terre et *Arabidopsis thaliana* a montré une accumulation plus importante de l'amidon transitoire (Lorberth et al., 1998 ; Yu et al., 2001). Il semble donc que la GWD possède un rôle dans la dégradation de l'amidon. Une protéine similaire ayant les mêmes propriétés a été mise en évidence par Kötting et al., en 2005 : la phosphoglucan water dikinase (PWD) EC 2.7.9.5.

Ces deux enzymes interviennent dans la dégradation de l'amidon et semblent participer à l'augmentation de l'activité de la  $\beta$ -amylase. La GWD interviendrait au niveau de la structure de l'amidon en ouvrant la structure en double hélice rendant ainsi les chaînes de glucose accessibles à la  $\beta$ -amylase (Edner et al., 2007).

## 5.3 La D-enzyme

La D-enzyme EC 2.4.1.25 est une  $\alpha$ -glucanotransferase qui assure le transfert des groupes MOS, non branchés d'un donneur  $\alpha$ -1,4 glucan possédant au moins 3 résidus de glucose (Maltotriose), sur la fin non réductrice d'un oligosaccharide en libérant une molécule de glucose ou une chaîne de glucose plus courte selon le site de coupure (Peat et al., 1956 ; Takaha et al., 1998 ; Takaha et Smith, 1999). Chez *Arabidopsis thaliana* et la pomme de terre une seconde isoforme a pu être identifiée et caractérisée (DPE2) (Chia et al., 2004 ; Lloyd et al., 2004). Chez le blé, l'homéoforme du génome B de la D-enzyme a été localisée sur la partie distale du bras court du chromosome 2B (Bresolin et al., 2006). Cette enzyme assure la conversion de courtes chaînes de glucose pour former des oligosaccharides plus longs afin de faciliter leur dégradation par les phosphorylases ou les hydrolases (Boos et Schuman, 1998).



L'étude du mutant *stall-1* chez *Chlamydomonas reinhardtii* déficient pour la D-enzyme a permis de connaître l'effet de cette enzyme sur l'amidon. Ce mutant possède moins d'amidon, la structure et la taille des granules sont fortement dégradées (granules déformés). Le contenu en amylose est augmenté chez les mutants, la structure de l'amylopectine est modifiée avec une augmentation à la fois du nombre de chaînes courtes et de la quantité d'oligosaccharides non branchés (Colleoni et al., 1999). La D-enzyme possède un rôle important dans la synthèse de l'amidon avec la capacité de transférer des chaînes d'oligosaccharides sur les chaînes d'amylopectine. Ceci a pu aussi être observé *in vitro* chez le blé (Bresolin et al., 2006).

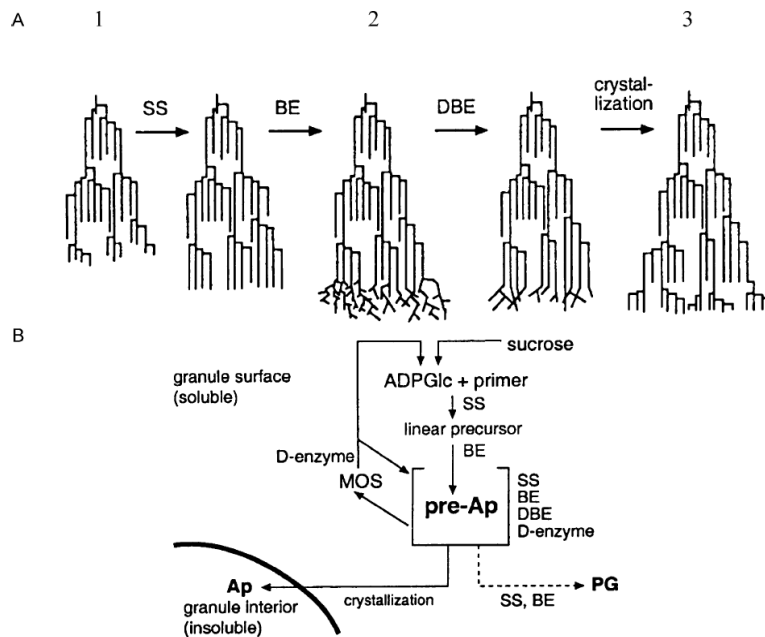
Cependant l'étude de mutants KO pour cette même enzyme chez *Arabidopsis thaliana* n'a pas confirmé toutes les observations faites chez l'algue unicellulaire. Ainsi, la perte de l'activité de la D-enzyme n'affecte pas la synthèse de l'amidon mais la dégradation de l'amidon est modifiée indiquant que l'enzyme est aussi impliquée dans ce processus (Critchley et al., 2001). Les propriétés de cette enzyme sont encore sujettes à discussion et ses rôles dans la biosynthèse et la dégradation de l'amidon restent encore à être confirmés.

#### 5.4 L'amylogénine, un homologue de la glycogénine

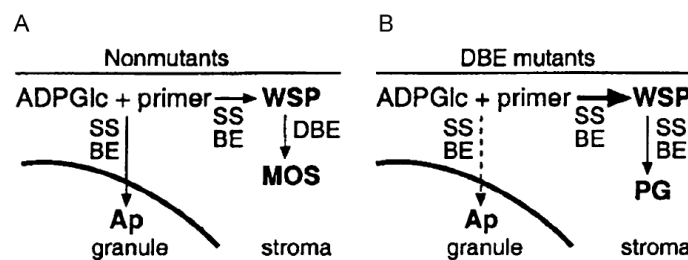
Chez les animaux la glycogénine est bien caractérisée. Elle catalyse l'addition de 10 résidus de glucose sur elle-même au niveau des résidus tyrosine et est responsable de l'initiation de la synthèse de glycogène qui est ensuite allongé par les glycogènes synthases (Roach et Skurat, 1997). Chez la levure, deux gènes de glycogénine ont pu être identifiés : *Glg1* et *Glg2* qui sont nécessaires pour la biosynthèse du glycogène (Cheng et al., 1995).

Chez les plantes l'initiation de la synthèse de l'amidon est encore sujette à discussion. Les SSI sont capables d'allonger les chaînes de polysaccharides mais ont besoin d'une amorce pour effectuer cette synthèse. Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'une molécule capable de s'auto-glycosyler et qui serait responsable de la synthèse de l'amidon chez les plantes. Cette protéine a été appelée amylogénine. Cependant cette protéine, homologue d'un polypeptide glycosylé (RGP1), semble être impliquée dans la synthèse de la paroi (Dhugga et al., 1997).

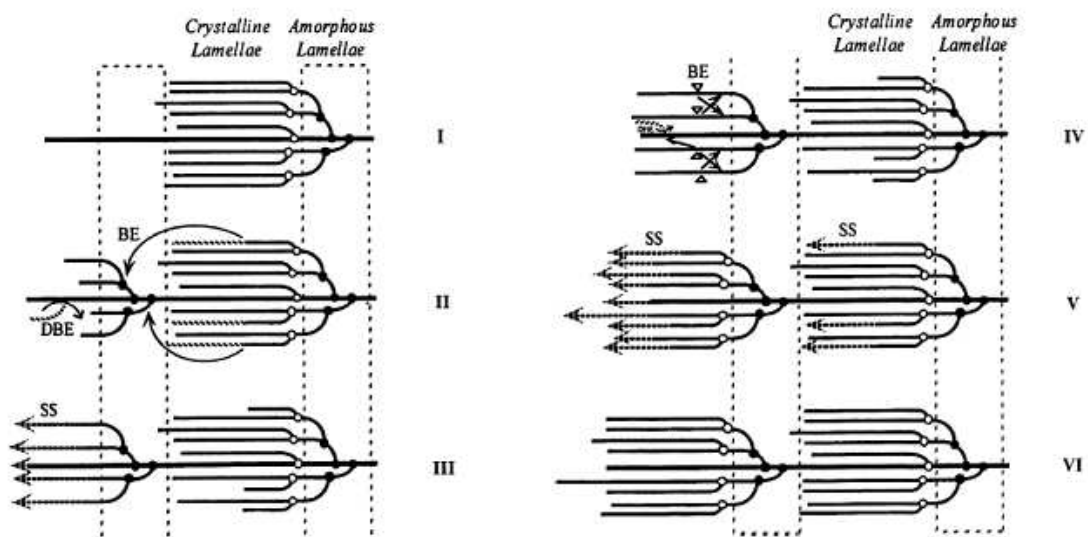
Chez *Arabidopsis thaliana*, l'étude de mutants KO pour des gènes proches en structure de la glycogénine a mis en évidence une réduction de l'amidon indiquant que ces protéines pourraient avoir un rôle dans l'initiation de la synthèse de l'amidon. Ces gènes sont au nombre de 6 chez *Arabidopsis* et le produit de leur expression a été appelé Plant glycogenin like starch initiation protein 1 (PGSIP1) (Chatterjee et al., 2005).



**Figure 26.** « Glucan trimming model » : modèle de biosynthèse de l'amylopectine proposé par Ball et al., 1996.



**Figure 27.** « Water soluble polysaccharide clearing model » pour la biosynthèse de l'amylopectine proposé par Smith, 2001 et Zeeman et al., 1998. (Myers et al. 2000)



**Figure 28.** Modèle de biosynthèse de l'amylopectine en cluster dans l'albumen du riz (Nakamura, 2002). BE, branching enzyme : principalement BEI et dans une moindre mesure BEIIa et BEIIb à l'étape (II). A l'étape IV principalement BEIIb. DBE, debranching enzyme ; SS, starch synthase : principalement SSIII avec une action possible de la SSI et SSIIa à l'étape (III). A l'étape (V), les SSIIa assure l'élongation des chaînes du nouveau cluster (gauche) tandis que la SSI assure l'élongation des chaînes de l'ancien cluster (droite).

Cette protéine semble donc avoir un rôle dans l'initiation de la synthèse de l'amidon mais ce mécanisme n'est pas encore totalement compris et semble faire aussi intervenir d'autres protéines comme la SSIV (Roldan et al., 2007).

## 6. Modèle de synthèse de l'amylopectine et de l'amylose

### 6.1 La synthèse de l'amylopectine

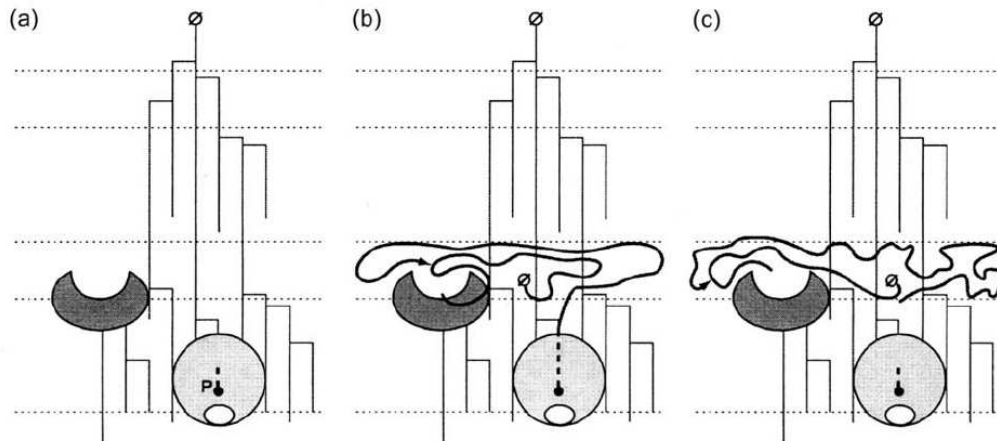
L'élongation de l'amylopectine a lieu au niveau de la surface des granules d'amidon avec la fin réductrice dirigée vers le hile des granules. La synthèse de cette macromolécule nécessite l'intervention de plusieurs enzymes ayant de multiples interactions entre elles et s'associant en complexe enzymatique. Les SS catalysent l'élongation des chaînes d'amylopectine, les BE forment des branchements par l'intermédiaire de liaisons  $\alpha$ -1,6 et les DBE catalysent l'hydrolyse de certaines de ces liaisons dans la molécule d'amylopectine.

Trois modèles de synthèse de l'amylopectine ont été décrits.

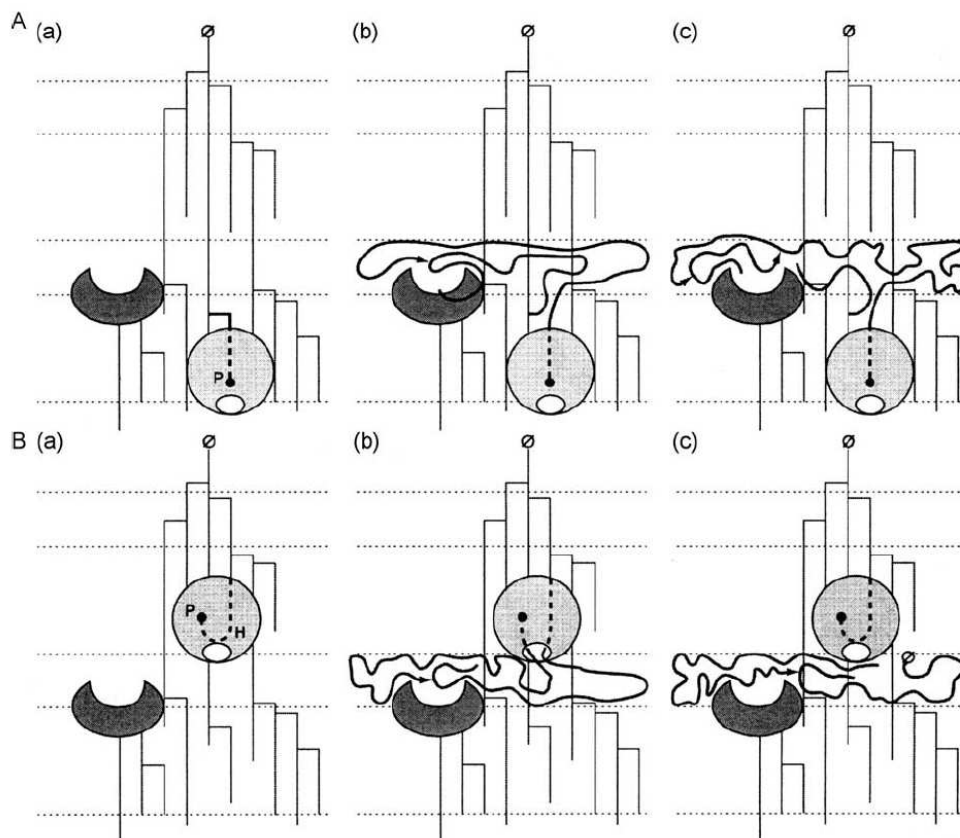
Le premier : « glucan trimming model » fut décrit par Ball et al. en 1996 (Figure 26). Dans ce modèle, les DBE ont un rôle prépondérant dans la synthèse de l'amidon. Ce modèle part du principe que les lamelles amorphes et cristallines sont synthétisées de manière discontinue. Une fois l'initiation de la molécule d'amylopectine réalisée, les SS vont allonger les très courtes chaînes de glucose dans la lamelle amorphe afin d'atteindre la longueur normale des ramifications. Les BE réalisent ensuite de nombreux branchements aboutissant à la formation d'une macromolécule appelée préamylopectine. Celle-ci va ensuite subir l'action des DBE qui vont couper une partie des ramifications formées. Enfin, la cristallisation de la macromolécule permet la formation de l'amylopectine.

Le second modèle appelé : « water soluble polysaccharide clearing model » (Zeeman et al., 1998 ; Smith, 2001 ; Myers et al., 2000) est basé sur le fait que l'isoamylase et les autres DBE sont impliquées indirectement dans la synthèse d'amylopectine (Figure 27). Ce modèle s'appuie sur l'étude de mutants déficients en DBE. Chez ces mutants, les chaînes de glucoses solubles formées par les SS et les BE servent à la synthèse de phytyloglycogène par ces mêmes enzymes. Chez les individus normaux, les DBE empêcheraient la formation de MOS par phénomène de compétition, contribuant ainsi indirectement à la synthèse préférentielle de l'amylopectine par les SS et BE.

Le troisième modèle avancé par Nakamura en 2002 chez le riz est appelé « two-step branching and improper branch clearing model » (Figure 28). La première étape de synthèse



**Figure 29.** Biosynthèse de l'amylose initié par un MOS (Zeeman et al., 1998 ; Ball et al., 1998). (a) Un MOS (petit trait pointillé) atteint la GBSS (cercle) possédant son site catalytique P dans la matrice de l'amylopectine. La structure en croissant correspond à une branching enzyme (BE). (b) La GBSS allonge la chaîne en la poussant à l'intérieur du granule. Une collision aléatoire avec une BE durant l'allongement de la chaîne d'amylose aboutit au branchement de la molécule sur la fin réductrice (indiqué par une flèche). (c) Un nouveau MOS atteint le site catalytique qui relâche la molécule d'amylose. ●, fin non réductrice ; ∅, fin réductrice.



**Figure 30.** (A-B) Biosynthèse de l'amylose initié par une molécule d'amylopectine (Ball et al., 1998 ; Van de Wal et al., 1998). (A) : (a) La GBSS (cercle) présente dans la matrice de l'amylopectine se fixe sur une chaîne latérale de la molécule d'amylopectine (trait pointillé) afin de démarrer la synthèse de l'amylose. La forme en croissant correspond à une BE. (b) La GBSS allonge la chaîne d'amylose en la poussant à l'intérieur du granule d'amidon. Une collision avec une BE lors de l'allongement de la molécule d'amylose aboutit au branchement de la molécule (indiqué par une flèche). (c) La BE assure la coupure de la molécule d'amylose. Le début d'une autre synthèse dépend de la présence d'une autre fin non réductrice. (B) : Les étapes (a) et (b) sont similaires à celles de (A). (c) L'action d'une hydrolase au niveau de la GBSS aboutit à la formation de la molécule d'amylose. ●, fin non réductrice ; ∅, fin réductrice.

est une étape de ramification de la molécule d'amylopectine dans la lamelle amorphe. Les BE catalysent le transfert de chaînes provenant de chaînes plus longues d'un cluster situé en amont de la macromolécule. Ces chaînes sont ensuite allongées par les SS. Les DBE interviennent pour retirer des ramifications qui auraient été mal branchées (James et al., 2003). Quand les chaînes nouvellement branchées atteignent un DP d'environ 12 unités de glucose, une seconde étape de ramification a lieu. Cette étape correspond au branchement de chaînes dans la lamelle cristalline. Les BE vont dédoubler les chaînes en les coupant et ramifiant en amont de la chaîne coupée. Les SS effectuent alors l'allongement des chaînes nouvellement créées.

## 6.2 La synthèse de l'amylose

La biosynthèse de l'amylose a été décrite dans trois modèles différents.

Le premier modèle a été énoncé par Zeeman et al., en 1998 et Smith en 2001 (Figure 29). Dans ce modèle, la GBSS utilise les MOS comme substrat qui diffuse jusqu'au site catalytique à travers la matrice d'amylopectine. La GBSS allonge la chaîne progressivement à l'intérieur des granules d'amidon. Les branchements observés sur la molécule d'amylose seraient dûs à des collisions aléatoires avec des enzymes de branchements. Ensuite, une autre molécule MOS atteint le site catalytique de la GBSS ce qui a pour effet de relâcher la molécule d'amylose et d'initier la synthèse d'une nouvelle molécule.

Le second modèle avancé par Van de Wal et al., 1998 et Ball et al., 1998 met en avant l'utilisation d'une chaîne de la molécule d'amylopectine en tant qu'amorce de la synthèse d'amylose (Figure 30 A). La fin de la synthèse de la molécule est déterminée par la GBSS. Elle serait activée par un encombrement stérique lors de l'allongement de la chaîne de l'amylopectine.

Le troisième modèle avancé par ces mêmes auteurs utilise également une chaîne d'amylopectine comme amorce (Figure 30 B). Cependant dans celui-ci, c'est une BE ou une hydrolase présente à l'intérieur du granule d'amidon qui est responsable de la fin de la synthèse de l'amylose. Ensuite, la GBSS va se fixer sur une autre chaîne de l'amylopectine et répéter le processus.

## **II. PROBLÉMATIQUE DE LA THÈSE**

La France est aujourd'hui le premier producteur européen de bioéthanol obtenu principalement à partir de betteraves et d'amidon de blé ou de maïs. Les variétés de blé jusqu'alors sélectionnées pour la qualité boulangère et biscuitière ne sont pas encore adaptées à la production d'éthanol.

L'objectif de cette thèse est de déterminer les caractéristiques physicochimiques, technologiques et génétiques du grain qui sont corrélées au rendement en bioéthanol.

Cette problématique est abordée selon les deux axes d'étude suivants, permettant de définir un type de blé idéal destiné à la production de bioéthanol :

- une description d'un groupe de 30 variétés de blé tendre cultivées dans des essais multilocaux pour déterminer quelles sont les caractéristiques physicochimiques et technologiques du grain favorablement corrélées à la production de bioéthanol
- une analyse des protéines responsables de la composition de l'amidon et leurs effets sur la production de bioéthanol.

La première partie de la thèse s'intéresse aux caractéristiques techniques du grain et à leur éventuel effet sur le rendement en bioéthanol. Cette étude se base sur plusieurs travaux qui ont déjà démontré une forte corrélation entre la quantité de protéines présentes dans le grain de blé et le rendement en éthanol. Cette étude conduite sur 30 variétés de blé tendre, expérimentées pendant trois années et dans 4 lieux a permis de préciser ces corrélations et de déterminer quelles sont les autres caractéristiques permettant d'obtenir un meilleur rendement en éthanol. Ainsi l'étude du poids de mille grains, de la dureté, du taux de protéines, du temps de chute de Hagberg, de la viscosité potentielle et de la taille des granules d'amidon apporte de nouvelles informations quant aux corrélations entre ces caractéristiques et le rendement en éthanol.

La deuxième partie de l'étude s'intéresse quant à elle aux mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans la composition des granules d'amidon. Huit lignées isogéniques créées par backcross chez le cultivar Trémie et possédant les allèles nuls à un, deux ou trois loci *waxy* ont été analysées par approche protéomique. Ces lignées sont dépourvues d'une, deux ou trois enzymes granule bound starch synthase (GBSS) responsables de la formation d'amylose dans le grain et possèdent donc un contenu en amylose très différent. L'analyse par

approche protéomique classique des albumines globulines, des protéines amphiphiles et des enzymes associées aux granules d'amidon permet d'appréhender les changements génétiques sur le métabolisme de l'amidon et potentiellement sur le rendement en bioéthanol.

Les deux approches précédemment proposées vont permettre de définir les caractéristiques techniques et génétiques du grain de blé favorablement associées à la production de bioéthanol. Les sélectionneurs auront ainsi une indication sur les caractères à prendre en considération pour créer des cultivars mieux adaptés à cette nouvelle utilisation du blé tendre.

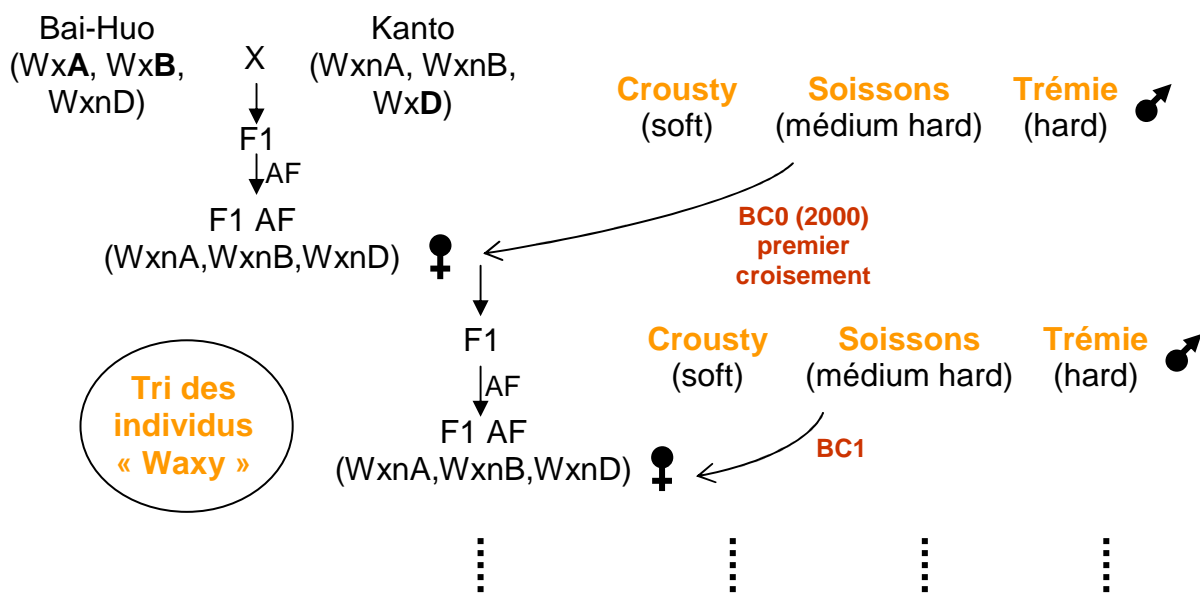


## Brève présentation de la première étude

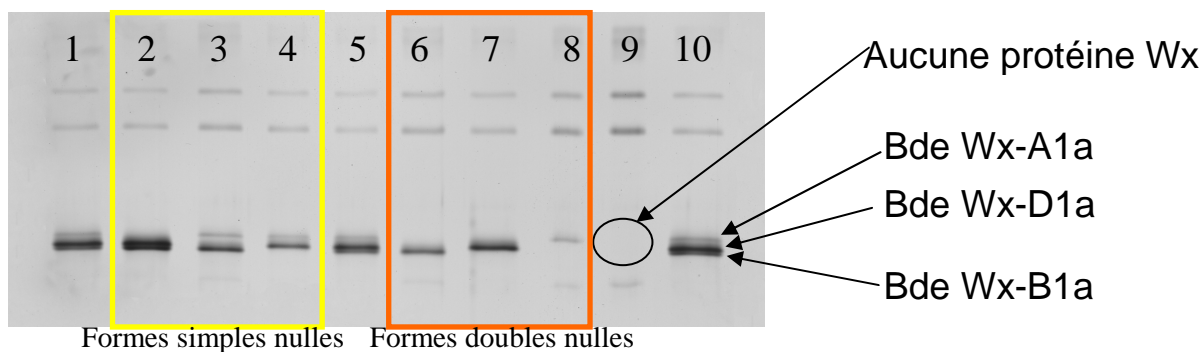
De nombreuses études ont montré que la quantité d'amidon est le principal facteur corrélé au rendement en éthanol. Ce constituant du grain est généralement mesuré indirectement par l'observation du taux de protéines qui est l'autre composant complémentaire du grain de blé. Cependant les autres caractéristiques technologiques du grain et leur effet sur le rendement en éthanol sont encore méconnus. La connaissance des caractéristiques favorablement corrélées au rendement en éthanol est aujourd'hui un objectif majeur qui permettra de définir s'il existe d'autres cibles que la quantité d'amidon pour ce nouvel usage.

L'étude suivante présente les résultats d'un essai de 30 variétés de blé français implantées dans 4 lieux durant 3 années consécutives ainsi que de 8 lignées isogéniques pour les trois gènes *waxy* de trois variétés françaises (Trémie, Soissons, et Crousty) implantées une année dans trois lieux. Ces lignées isogéniques possèdent des taux d'amylose différents ce qui permet d'observer l'effet de la composition de l'amidon sur le rendement en éthanol. Ces variétés et lignées isogéniques ont été caractérisées selon leur poids de mille grains, leur poids spécifique, leur dureté, leur taux de protéines, leur composition allélique en gluténines de haut et faible poids moléculaire, leur viscosité, leur distribution de la taille des granules d'amidon, leur temps de chute de Hagberg ainsi que leur rendement en glucose et éthanol. L'étude de ces caractéristiques technologiques du grain a permis de mettre en évidence une relation entre la dureté et la distribution de la taille des granules d'amidon chez les variétés françaises. En effet, plus les variétés sont dures plus la quantité de petites granules (type B et type C) est importante. Pour les lignées isogéniques *waxy*, une forte différence pour la distribution des granules d'amidon a pu être observée. Les lignées triples nulles possèdent plus de petits granules que les formes normales et possèdent aussi un temps de chute de Hagberg très faible.

Concernant les rendements en glucose et éthanol, le taux de protéines est le paramètre le plus fortement corrélé négativement. Ensuite la quantité de granules d'amidon de type B est corrélée positivement aux rendements en glucose et éthanol. Enfin le poids spécifique est corrélé quant à lui négativement. Les lignées isogéniques *waxy* triples nulles (totalement dépourvues d'amylose) ont quant à elles été montrées comme ayant un rendement éthanol plus faible que la forme normale. Idéalement, les variétés possédant un faible taux de protéines, une quantité de petits granules d'amidon élevée, ainsi qu'une faible dureté et un poids spécifique faible seraient à sélectionner pour ce nouvel usage.



**Figure 31.** Conversion d'un blé français en un blé de type « waxy ».



**Figure 32.** SDS-PAGE des huit formes isogéniques pour les 3 gènes *wx*. Les pistes sont référencées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 6.** Composition allélique des 8 formes isogéniques pour les 3 gènes *wx*.

	Name	Piste	Composition allélique		
			Wx-A1	Wx-B1	Wx-D1
Forme normale	ABD	1 ; 5 ; 10	a (+)	a (+)	a (+)
Forme simple nulle	DB nA	2	b (-)	a (+)	a (+)
	AB nD	3	a (+)	a (+)	b (-)
	AD nB	4	a (+)	b (-)	a (+)
Forme double nulle	B nAnD	6	b (-)	a (+)	b (-)
	D nAnB	7	b (-)	b (-)	a (+)
	A nBnD	8	a (+)	b (-)	b (-)
Forme Waxy	nAnBnD	9	b (-)	b (-)	b (-)

## Obtention des lignées isogéniques waxy

Chez le blé tendre (AABBDD), il existe trois gènes homéologues *waxy* (*Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*) codant pour la Granule Bound Starch Synthase I (GBSSI). Cette enzyme a pour fonction principale d'allonger les molécules d'amylose. Les gènes *wx* appartiennent au génome A, B et D (Chao et al., 1989) et sont localisés sur le bras court du chromosome 7A, le bras long du chromosome 4A et le bras court du chromosome 7D (Yamamori et al., 1994).

L'analyse des protéines *waxy* par électrophorèse bidimensionnelle a permis de mettre en évidence un polymorphisme concernant le point isoélectrique mais aussi le poids moléculaire de ces protéines (Nakamura et al. 1993). Les allèles *Wx-A1a*, *Wx-B1a* and *Wx-D1a* correspondent aux allèles normaux tandis que les allèles *b* correspondent aux formes nulles ne produisant pas de GBSS fonctionnelles (Nakamura et al., 1993). Ces allèles nuls sont présents naturellement chez certaines variétés de blé qui ont été utilisées pour créer un blé possédant les allèles nuls à chacun des trois loci (Nakamura et al., 1995).

Ainsi, à l'INRA de Clermont Ferrand, Bai Huo (*Wx-A1a*, *Wx-B1a*, *Wx-D1b*) et Kanto 107 (*Wx-A1b*, *Wx-B1b*, *Wx-D1a*) ont été croisés (Figure 31) afin d'obtenir une F1 qui a ensuite été autofécondée (AF). Les grains F1 AF ont été étudiés par SDS-PAGE afin de visualiser la présence ou l'absence des protéines Waxy (Figure 32).

L'individu triple nul a ensuite été utilisé en tant que femelle et croisé avec trois variétés de blé françaises (Crousty, Soissons et Trémie). Les individus F1 ont ensuite été autofécondés puis leurs protéines *waxy* extraites des demi grains (partie albumen) ont été visualisées sur SDS-PAGE. Ceci a permis d'obtenir les huit formes isogéniques (Tableau 6) pour chacune des variétés. Ensuite ces formes isogéniques ont été respectivement backcrossées (BC) avec le parent récurrent Crousty, Soissons ou Tremie puis autofécondées et triées par SDS-PAGE.

A chaque étape de BC une sélection assistée par marqueurs SSR (simple sequence repeats) (pour BC1 et BC2) ou marqueurs DArT (Diversity Array Technology) (pour BC3) a été effectuée afin de retenir les individus ayant le plus d'identité avec le parent récurrent. Ainsi, au stade BC3 AF, les formes isogéniques pour la variété Tremie avaient au minimum 96% de ses marqueurs communs avec la forme normale sur un total de 952 marqueurs DArT.

Seules les huit formes isogéniques BC3 AF de Trémie ont été étudiées par approche protéomique afin de déterminer les effets des allèles nuls sur le métabolisme des sucres. Toutes les formes des trois variétés ont quant à elles été utilisées dans l'essai multilocal pluriannuel abordé au chapitre précédent.

### **III. DÉTERMINATION D'UN IDÉOTYPE DE BLÉ DESTINÉ À LA PRODUCTION DE BIOÉTHANOL**

## A. INTRODUCTION

L'épuisement des ressources fossiles apporte un regain d'intérêt pour les carburants produits à partir de biomasse. Le bioéthanol, produit de la fermentation de sucres d'origine végétale est un carburant pouvant être utilisé en remplacement de l'essence. Les Etats-Unis sont les premiers producteurs mondiaux de bioéthanol (34 000 Ml en 2008) et l'obtiennent à partir de maïs. Le Brésil, second producteur mondial (24 500 Ml en 2008), produit le bioéthanol à partir de canne à sucre. En Europe, le bioéthanol est produit principalement à partir de blé. La France est le premier producteur européen avec un volume de production de 1000 Ml en 2008. Cette production a augmenté de plus de 85% entre 2007 et 2008 ([www.ebio.org](http://www.ebio.org) ; [www.plateforme-biocarburants.ch](http://www.plateforme-biocarburants.ch)).

Globalement le processus de fabrication du bioéthanol est très proche de celui de la distillation du whisky mais n'est pas sujet aux mêmes contraintes propres à l'agroalimentaire. Les améliorations de rendement sur les étapes de la fabrication du bioéthanol ont déjà été entreprises mais peu d'études se sont intéressées à l'amélioration des variétés de blé destinées à la production d'éthanol. En effet, le blé a été essentiellement amélioré pour des usages alimentaires dont la cible principale est l'augmentation du taux de protéines et l'amélioration de la composition en protéines de réserves.

Concernant l'amélioration du blé pour la fabrication du bioéthanol plusieurs caractéristiques du grain ont été corrélées avec un bon rendement en éthanol. L'éthanol étant le résultat de la fermentation des sucres, il paraît évident que le contenu en amidon est le principal paramètre à améliorer. Cependant, Swanston et al., en 2005, ont montré que pour la prédiction du rendement en bioéthanol, ce seul critère n'est pas suffisant. Ainsi la qualité de l'amidon aurait aussi un rôle important sur le rendement. La distribution de la taille des granules d'amidon et par conséquent leur accessibilité lors de l'hydrolyse enzymatique fut

révélée faiblement corrélée avec le rendement en éthanol (Smith et al., 2006). Le contenu en amylose possède aussi un effet sur la dégradation de l'amidon. Les blés complètement *waxy* (dépourvus presque totalement d'amylose) sont plus facilement gélatinisés et hydrolysés et seraient donc plus intéressants pour la production de bioéthanol (Barredo-Moguel et al., 2001 ; Wu et al., 2006 ; Zhao et al., 2009).

D'autres caractéristiques technologiques du grain ont aussi été étudiées telles que (1) la dureté du grain qui a un effet sur la finesse du broyage de la farine et sur l'accessibilité de l'amidon lors de l'hydrolyse enzymatique (Koliatsou et Palmer, 2003), (2) le taux de protéines qui possède une corrélation négative avec le rendement en éthanol et le rapport longueur/largeur des grains (Kindred et al., 2008 ; Swanston et al., 2007).

La présente étude s'intéresse d'une part à la description d'un ensemble de 30 variétés françaises implantées en 4 lieux en 2007 et 4 autres lieux en 2008 et d'autre part à un groupe de variétés françaises (Crousty, Soissons et Trémie) et leurs lignées isogéniques pour les trois gènes *waxy* implantées dans 3 lieux en 2009. Ces lignées possèdent un, deux ou trois allèles nuls (notés *b*) pour chacun des gènes *waxy* (*Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*) codant pour les enzymes Granule Bound Starch Synthase (GBSS) qui sont responsables de la formation de l'amylose. Ces lignées isogéniques possèdent des quantités d'amylose différentes dans le grain comprises entre 1-2% pour les lignées triples nulles et 26-28% pour les lignées normales.

L'étude de la composition alléliques des gluténines de haut et faible poids moléculaire, du poids de mille grains, du poids spécifique, de la dureté, du taux de protéines, de la viscosité des arabinoxylanes, de la distribution de la taille des granules d'amidon, du temps de chute de Hagberg, et des rendements en glucose et éthanol permet de déterminer quels sont les caractéristiques de composition du grain et de propriétés technologiques à sélectionner afin d'améliorer le rendement en éthanol du blé tendre.

**Tableau 7.** Essai multilocal et pluriannuel pour les variétés françaises. Trente variétés ont été implantées durant les deux premières années (A) et un sous ensemble (22) de ces trente variétés a été implanté en 2009 dans 3 lieux (B).

A

Variétés		Lieux de récolte	Traitements
Ambrosia	Mendel	Saaten Union Recherche (60) Secobra Recherche (78) R2N (28) Lemaire Deffontaines (59)	1 Répétition avec fertilisation normale 1 Répétition sans 3ème apport d'azote
Andalou	Paledor		
Arack	Perfactor		
Astuce	Premio		
Bagou	Québon <sup>b</sup>		
Calisto	Robigus		
Caphorn	Rosario	INRA Clermont-Ferrand (63) Unisigma (60) Caussade (28) Momont (59)	1 Répétition avec fertilisation normale 1 Répétition sans 3ème apport d'azote
CF01085	Rytmic		
Crousty	Sankara		
Dinosor	Sogood		
Ephoros <sup>a</sup>	Soissons		
Farandole	Tapidor		
Garcia	Timber		
Glasgow	Tremie		
Koreli	Voltige <sup>a</sup>		
Maxyl	Lignée 10-10-13-2-4H <sup>b</sup>		
	Lignée 10-10-13-2-1S <sup>b</sup>		

a : Variété cultivée uniquement en 2007

b : Variété cultivée uniquement en 2008

B

Variétés		Lieux de récolte	Traitements
Andalou	Premio	INRA Clermont-Ferrand (63) Secobra Recherche (78) Momont (59)	1 Répétition avec fertilisation normale 1 Répétition sans 3ème apport d'azote
Astuce	Québon		
Bagou	Robigus		
Caphorn	Rytmic		
Crousty	Sankara		
Dinosor	Sogood		
Farandole	Soissons		
Glasgow	Tapidor		
Koreli	Tremie		
Mendel	Lignée 10-10-13-2-4H		
Paledor	Lignée 10-10-13-2-1S		

## B. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal et dispositif expérimental

Trente variétés de blé tendre ont été implantées en quatre lieux en 2007 et en 2008 (Tableau 7A). Les variétés Ephoros et Voltige ont été récoltées seulement en 2007 et remplacées par Québon, et deux lignées isogéniques Hard/Soft (lignées INRA Clermont-Ferrand 10-10-13-2-1S et 10-10-13-2-4H) pour la récolte 2008. Un sous ensemble de ces variétés a aussi été implanté en 2009 dans trois lieux (Tableau 7B). Ces variétés ont été choisies par les établissements de sélection partenaires du projet de manière à avoir un ensemble de cultivars ayant des différences importantes concernant les principales caractéristiques de composition du grain. Les lignées isogéniques BC3 *waxy* des variétés Crousty, Soissons et Trémie créées par l'INRA de Clermont-Ferrand, possédant un deux ou trois allèles nuls ont été implantées dans trois lieux en 2009 (Tableau 8). L'obtention de ces lignées est décrite dans le chapitre matériel de la seconde partie de ce mémoire.

Toutes ces variétés et lignées isogéniques ont été semées en parcelles de 12m<sup>2</sup> et protégées par traitement phytosanitaire contre les maladies cryptogamiques. Deux parcelles par variété ont été étudiées dans chaque lieu. Ces deux parcelles ont reçu une fertilisation azotée différente. Une parcelle a reçu une fertilisation normale (Traitement N) tandis que l'autre fut sans dernier apport d'azote (Traitement n-).

### 2. Caractérisation des grains de blé

Poids de mille grains, poids spécifique, temps de chute de Hagberg et viscosité.

Chaque caractéristique du grain de blé a été mesurée deux fois pour chacun des traitements azotés. Le poids de mille grain a été déterminé selon la norme NF V 03-702, le poids spécifique selon la norme NF V 03-719, le temps de chute de Hagberg selon la norme NF V 03-703 et la viscosité selon Carré et al., 1994.



**Tableau 8.** Essai multilocal des lignées isogéniques waxy. ABD (*Wx-A1a*, *Wx-B1a*, *Wx-D1a*) ; ABnD (*Wx-A1a*, *Wx-B1a*, *Wx-D1b*) ; ADnB (*Wx-A1a*, *Wx-B1b*, *Wx-D1a*) ; DBnA (*Wx-A1b*, *Wx-B1a*, *Wx-D1a*).

Variétés		Lieux de récolte	Traitements
Crousty ABD	Soissons ABD	2009 INRA Clermont-Ferrand (63) Secobra Recherche (78) Momont (59)	1 Répétition avec fertilisation normale
Crousty ABnD	Soissons ABnD		
Crousty ADnB	Soissons ADnB		1 Répétition sans 3ème apport d'azote
Crousty DBnA	Soissons DBnA		
Crousty AnBnD	Soissons AnBnD		
Crousty BnAnD	Soissons BnAnD		
Crousty DnAnB	Soissons DnAnB		
Crousty nAnBnD	Soissons nAnBnD		
Tremie ABD			
Tremie ABnD			
Tremie ADnB			
Tremie DBnA			
Tremie AnBnD			
Tremie BnAnD			
Tremie DnAnB			
Tremie nAnBnD			

### **3. Dureté et teneur en protéines**

La dureté et la teneur en protéines ont été déterminées respectivement selon la méthode AACC 39-70A (1999) et AACC 39-25 (1999) par réflectance dans le proche infrarouge (NIRS) de moutures complètes préparées à l'aide d'un moulin Cyclotec 14920 (Hilleröd, Denmark). La dureté reflète l'état de la texture du grain et de la cohésion des particules dans l'albumen. Selon l'état de dureté, les blés sont classés selon une échelle croissante de dureté du type soft à hard.

### **4. Composition allélique des sous unités de haut et faible poids moléculaire**

La composition allélique des sous unités de gluténines de haut et faible poids moléculaire (SG-HPM et SG-FPM) a été étudiée par l'extraction des protéines de réserves selon Singh et al., (1991), et leur séparation par SDS-PAGE (T=12,52% C=0,97%) suivi d'une coloration selon Neuhoff et al., (1988). Les allèles observés ont été nommés suivant la nomenclature de Payne et al., 1983 pour les SG-HPM et celle de Singh et al., 1991 pour les SG-FPM.

### **5. Distribution de la taille des granules d'amidon**

Les granules d'amidon ont été extraits à partir de 10 grains selon la méthode de Bancel et al., 2010. La distribution de la taille des granules d'amidon a été observée par diffraction laser à l'aide du Malvern Mastersizer 2000 E (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Au moins trois mesures indépendantes ont été réalisées pour déterminer la distribution. Cette distribution est exprimée en pourcentage du volume qu'occupent les granules en fonction de leur taille.

## **6. Rendement en éthanol et glucose (protocole et mesures réalisés par Pascale Gadonna à l'Institut Polytechnique Lasalle Beauvais)**

Seize grammes de mouture complète sont mélangés à 364g d'eau distillée bouillante.

Le moût est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes puis refroidi.

La liquéfaction de l'amidon est réalisée pendant deux heures à 82°C par l'ajout d' $\alpha$ -amylase référence A7595 (Sigma, St Louis, MO, USA) dans le moût de fermentation. Un réajustement du pH à 4.8 du moût est réalisé par l'utilisation de disulfite de potassium ( $2,75 \cdot 10^{-1}$  mol/L)

L'étape de saccharification est réalisée à 58°C pendant 2h30, par l'action de deux enzymes l'amyloglucosidase (Megazyme, Wicklow, Ireland) et la pullulanase référence P2986 (Sigma, St Louis, MO, USA). Trois prélèvements de 1mL sont effectués afin de déterminer la quantité de glucose libérée après saccharification. Le glucose est dosé à l'aide du kit Megazyme E-AMGDF (Megazyme, Wicklow, Ireland), par la lecture de la densité optique à 510nm.

Après l'étape de saccharification, la fermentation des moûts est réalisée à 30°C pendant 72h par l'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Trois prélèvements de 1mL sont effectués afin de déterminer la quantité d'éthanol présente dans le moût. L'échantillon est mélangé à 9mL d'eau osmosée puis vortexé et centrifugé. Ensuite, 100 $\mu$ L de méthanol (3%) sont ajoutés à 1mL de surnageant. Le méthanol sert de standard interne pour le dosage par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe Focus GC Thermo scientific, Austin, TX, USA). Une courbe étalon dans une gamme de 0.39g/L à 1.57g/L est obtenue pour déterminer avec précision la concentration d'éthanol présent dans l'échantillon.

## 7. Tests statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statgraphics v 5.0. Une analyse de variance utilisant la procédure General Linear Model (GLM) a été réalisée afin de déterminer quels étaient les facteurs (années, lieux, variétés, traitements azotés (N et n-) et interaction variétés\*traitements) ayant un effet significatif sur les caractéristiques du grain étudiées.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour les variétés françaises sur les différents caractères du grain étudiés y compris les rendements en glucose et éthanol. Deux autres ACP ont été effectuées pour chacun des traitements (N et n-) pour les lignées isogéniques de Soissons, Crousty et Trémie sur les caractéristiques du grain uniquement. Enfin deux dernières ACP ont été réalisées sur les traitements N et n- des lignées isogéniques de Trémie en prenant en compte les rendements en glucose et éthanol.

Une étude des corrélations (coefficient de Pearson) entre les différentes caractéristiques du grain a été réalisée afin de déterminer quelles étaient les variables associées à la production de glucose et de bioéthanol.

Elle fut suivie d'un calcul de régression multiple entre plusieurs variables de composition du grain et le rendement en glucose et en éthanol dans le but de faire apparaître les combinaisons de caractères associés à la production d'éthanol et aussi de préciser leur ordre d'importance.

**Tableau 9. Données moyennes et écart types des variétés françaises dans l'essai multiloal et pluriannuel pour chacune des variables étudiées. La valeur maximale pour la variable considérée est indiquée en gras sur fond vert et la valeur minimale en gras, italique sur fond bleu.**

VARIÉTÉS	Rdt parcellaire	PMG	PS	HAGBERG	VISCO POT	VISCO REELLE	Taux de protéines	Durété	Type C	Type B	Type A	Amylase	Rdt Glucose kg/t	Rdt Ethanol/Lt	Rdt Glucose kg/ha	Rdt Ethanol/L/ha
1010-13-21	9,6 ± 1	45,4 ± 2,3	81,1 ± 0,6	361 ± 43,2	ND	1,251 ± 0,042	11,7 ± 0,5	30 ± 8	0,5 ± 0,2	11,1 ± 1,3	88,6 ± 1,4	23,1 ± 1	726,8 ± 19,2	466 ± 11,8	6349,1 ± 456,7	4067,9 ± 244,7
1010-13-24	9,4 ± 1,1	45,1 ± 3	<b>81,9 ± 0,8</b>	381 ± 51,2	ND	1,267 ± 0,044	12 ± 0,7	74,7 ± 9,8	0,3 ± 0,1	15,3 ± 1,3	84,1 ± 2	24,7 ± 1,9	714,9 ± 6,7	461,1 ± 8,9	6058 ± 447,6	3906 ± 276,3
Ambrasia	9,4 ± 1,2	47,4 ± 5	79,2 ± 3,1	322,9 ± 90,6	2,492 ± 0,106	1,239 ± 0,076	11,4 ± 0,7	34,2 ± 11,4	0,9 ± 0,5	12,4 ± 2,5	86,7 ± 2,8	23,5 ± 0,8	728,7 ± 21,8	467,4 ± 19,7	6928,7 ± 966,4	4456,1 ± 631,6
Andalou	9,8 ± 1,1	51,4 ± 4,7	78,2 ± 3,1	303,7 ± 54,3	1,63 ± 0,034	1,16 ± 0,034	11 ± 0,6	71,6 ± 10,7	0,9 ± 0,5	20,9 ± 5,3	78,2 ± 5,7	24,2 ± 1	737,4 ± 23,5	487,1 ± 26,5	6909,7 ± 817,7	4408,1 ± 526,6
Arack	9,7 ± 1,1	47,2 ± 5,1	77,8 ± 2,8	359,4 ± 67,4	2,767 ± 0,106	1,237 ± 0,079	11,3 ± 0,7	71,9 ± 8,1	1 ± 0,5	21,2 ± 8,9	77,8 ± 5,3	24,2 ± 1,9	727,1 ± 22,9	467,9 ± 26,1	7094,9 ± 918,9	4666,3 ± 537,1
Astuce	9,5 ± 1,6	44,7 ± 3,8	75,5 ± 1,9	356,9 ± 48,5	3,576 ± 0,179	1,345 ± 0,055	11,9 ± 0,7	25,9 ± 8	0,7 ± 0,5	<b>70 ± 2,6</b>	89,3 ± 2,9	23,8 ± 1,5	697,6 ± 22,4	453,5 ± 13,5	6155,2 ± 1073,4	4007,3 ± 696
Bagou	10 ± 1,2	41,8 ± 4,8	<b>75,3 ± 3</b>	237,5 ± 44,7	2,284 ± 0,104	1,203 ± 0,058	11,5 ± 0,6	33,5 ± 9,7	0,6 ± 0,4	14,5 ± 3,4	84,8 ± 3,8	25,2 ± 1,8	728,3 ± 3,6	465,8 ± 16,7	7015 ± 901,3	4481,2 ± 512,9
Callisto	9 ± 1	45,5 ± 4,1	77,4 ± 2,8	296,1 ± 94,2	2,174 ± 0,119	1,201 ± 0,028	11,6 ± 0,6	33 ± 9,7	0,9 ± 0,4	18,3 ± 3,5	80,9 ± 4	22,9 ± 1,6	721,9 ± 32,2	461,3 ± 15,6	6607,7 ± 815,6	4201 ± 516,5
Caphorn	9,7 ± 1	46,1 ± 3,3	77,4 ± 2,4	284,1 ± 76,4	3,202 ± 0,36	1,294 ± 0,052	11,9 ± 0,9	74,7 ± 11,6	0,9 ± 0,5	21,1 ± 5,5	78 ± 5,9	22,6 ± 1,4	715,7 ± 20,6	457,2 ± 18,3	6596,9 ± 544,4	4232,2 ± 394,8
CF01085	<b>8,6 ± 1,1</b>	44,6 ± 4,5	76,1 ± 2,3	271,9 ± 99	3,351 ± 0,171	1,335 ± 0,053	12 ± 0,6	65,4 ± 8,9	1 ± 0,5	21,3 ± 4,6	77,7 ± 5	23 ± 1,8	734,5 ± 22,7	467 ± 10,1	6202,2 ± 753,3	3939,5 ± 436,2
Crousty	9,2 ± 1,1	46 ± 4,1	79,2 ± 1,7	298,8 ± 71,2	<b>1,453 ± 0,091</b>	1,149 ± 0,019	11,6 ± 0,7	33,2 ± 8	0,7 ± 0,4	14,7 ± 3,5	84,6 ± 3,9	23,3 ± 2,7	734,4 ± 34,1	471 ± 20,1	6638,1 ± 872,3	4220,2 ± 456,4
Dinosy	10,1 ± 1,6	44,5 ± 5,2	77,3 ± 3	382,7 ± 51,6	2,098 ± 0,077	1,223 ± 0,039	10,9 ± 0,7	65,2 ± 8,6	0,7 ± 0,5	14,1 ± 2,2	85,2 ± 2,7	22,9 ± 2,6	739,2 ± 22,7	464,5 ± 17,9	6986,6 ± 1326,9	4440,6 ± 797,5
Ephoros	8,9 ± 1,4	48 ± 5,8	78,5 ± 1,6	256 ± 22,3	3,042 ± 0,132	ND	10,8 ± 0,5	66,2 ± 5,8	<b>1,5 ± 0,2</b>	15 ± 1	ND	ND	710,6 ± 26,6	<b>445,9 ± 26</b>	6300,4 ± 999	3928,8 ± 420,1
Ephoros	10,1 ± 1,3	48,7 ± 4,1	76 ± 3	338,2 ± 78,1	2,885 ± 0,125	1,255 ± 0,059	12,2 ± 0,9	22,6 ± 7,4	0,4 ± 0,3	10,5 ± 1,6	89,1 ± 1,8	23,7 ± 1,4	686,2 ± 21,5	451,9 ± 12,4	6712,2 ± 854,3	4352,9 ± 515,5
Farandole	9,7 ± 1,2	52,1 ± 3,9	77 ± 2,5	254 ± 122,7	2,285 ± 0,173	1,293 ± 0,086	10,8 ± 0,6	76,3 ± 13	1,1 ± 0,6	14,6 ± 2,9	84,3 ± 3,4	22,5 ± 0,8	740,1 ± 22,2	463,7 ± 19,8	7191,6 ± 835,5	4517,8 ± 557,1
Glasgow	10,1 ± 1,5	39,6 ± 3,8	76,2 ± 2,2	245,1 ± 52,5	2,051 ± 0,107	1,195 ± 0,043	<b>10,7 ± 0,6</b>	<b>78,5 ± 9</b>	0,7 ± 0,4	12,7 ± 2,9	86,6 ± 3,2	<b>21,9 ± 1,5</b>	733,6 ± 26,5	464,4 ± 16,8	7115,9 ± 1093	4537,2 ± 662
Korell	9,5 ± 1,2	44,7 ± 3,6	75,4 ± 2,5	367,2 ± 42,7	2,863 ± 0,146	1,265 ± 0,063	11,5 ± 0,7	76,4 ± 9,2	1,2 ± 0,5	19,5 ± 4,4	79,3 ± 4,8	24 ± 1,3	710,5 ± 24,6	459,6 ± 10,6	6714,3 ± 1130,9	4332,4 ± 641,6
Maxyl	9,9 ± 1,1	<b>53,5 ± 3,6</b>	77,3 ± 1,9	338,4 ± 79,4	2,93 ± 0,321	1,299 ± 0,058	11,2 ± 0,5	72,7 ± 14,9	0,7 ± 0,4	20,2 ± 6,3	79,1 ± 6,6	23,7 ± 1,8	705,5 ± 32,9	463,2 ± 20,4	7015,1 ± 878,8	4441,8 ± 482,1
Mendel	10,1 ± 1,3	45,7 ± 3,5	78,8 ± 1,9	373,3 ± 29,5	2,463 ± 0,278	1,246 ± 0,056	11,3 ± 0,8	64 ± 8	1 ± 0,6	16,6 ± 3,7	82,4 ± 4,3	23,7 ± 2,3	737,7 ± 13,6	468,8 ± 11,6	6715,7 ± 735,2	4357,4 ± 414,9
Paleodor	9,3 ± 1,5	47,2 ± 5,1	77,8 ± 3,1	334,6 ± 82,1	2,361 ± 0,108	1,228 ± 0,041	11,5 ± 0,7	69 ± 11	1 ± 0,5	20,6 ± 3,9	78,4 ± 4,4	22,1 ± 0,9	720,3 ± 35,1	464 ± 14	6768,6 ± 1143,2	4327,1 ± 699,7
Perfector	<b>10,5 ± 1,4</b>	49,7 ± 4,4	77,5 ± 2,2	368,5 ± 48,6	2,072 ± 0,094	1,183 ± 0,055	11,4 ± 0,5	76,4 ± 10,5	0,8 ± 0,5	19,9 ± 5,5	79,3 ± 5,9	22,7 ± 1,4	736,8 ± 14,5	467,2 ± 9,3	<b>7487,3 ± 1103</b>	<b>4748,9 ± 656,3</b>
Prentio	9,6 ± 1,2	47,8 ± 3	78,7 ± 1,5	387,6 ± 66,7	ND	1,291 ± 0,074	<b>12,7 ± 0,9</b>	<b>82,1 ± 11,4</b>	0,5 ± 0,1	14,5 ± 1,2	85 ± 1,3	23,3 ± 1,8	<b>688,7 ± 19,9</b>	446,3 ± 9,8	<b>5947,6 ± 424,9</b>	<b>3651 ± 276,1</b>
Quebon	10,3 ± 1,5	39,6 ± 4,5	76,3 ± 2,5	234,8 ± 45,7	2,327 ± 0,093	1,232 ± 0,045	11 ± 0,6	31,9 ± 10,5	0,6 ± 0,4	17 ± 3,8	82,4 ± 4,1	22,6 ± 0,9	729,6 ± 34,7	466,6 ± 25,1	7337,8 ± 1132,7	4646,5 ± 720,7
Robigus	9,6 ± 1,3	47,5 ± 4,3	77,5 ± 2,8	307,1 ± 60,4	2,273 ± 0,11	1,232 ± 0,035	11,4 ± 0,8	73,2 ± 10,4	1,1 ± 0,5	22,3 ± 5,3	76,6 ± 5,8	23,5 ± 1,6	717,9 ± 14,8	459,1 ± 16,2	6920,1 ± 921,3	4438,1 ± 577,2
Ryrimc	9,5 ± 1,2	52,5 ± 4,5	76,4 ± 3,1	388,6 ± 59	2,34 ± 0,078	1,194 ± 0,037	12,2 ± 0,9	81,5 ± 9,1	0,7 ± 0,4	18,5 ± 4,2	80,7 ± 4,6	22,7 ± 1,5	707,5 ± 22,3	452,3 ± 10,7	6442 ± 785,5	4118,6 ± 494,2
Sankara	9,4 ± 1,2	42,9 ± 4,5	78,5 ± 2,4	<b>422,7 ± 29</b>	2,32 ± 0,082	1,25 ± 0,036	11,8 ± 0,8	73,3 ± 10,6	1 ± 0,6	15,7 ± 3,3	83,3 ± 3,9	22,9 ± 1,9	723,9 ± 16,8	461,6 ± 19,1	6302,4 ± 600,1	4035,3 ± 390,7
Sogood	9,8 ± 1,4	47,6 ± 4,1	77,7 ± 2,5	317,3 ± 55,8	2,259 ± 0,084	1,219 ± 0,037	11,4 ± 0,8	78,5 ± 11,9	0,8 ± 0,6	20,3 ± 5,4	76,9 ± 6	23 ± 2	715,6 ± 21,7	468 ± 12	6747,5 ± 1039,3	4395,2 ± 677,1
Soissons	10 ± 1,9	42,1 ± 2,9	79,4 ± 2	369,9 ± 31,3	1,643 ± 0,122	1,17 ± 0,02	11,9 ± 0,5	67,8 ± 9,6	0,9 ± 0,5	<b>22,8 ± 6,3</b>	<b>76,3 ± 6,8</b>	23,2 ± 1,8	738,8 ± 34,2	<b>473 ± 18,1</b>	6576,8 ± 719,7	4212,6 ± 421,8
Tapidor	10 ± 1,3	47,8 ± 2,9	78,2 ± 2,4	<b>149,1 ± 53,1</b>	<b>4,133 ± 0,324</b>	<b>1,425 ± 0,092</b>	11,1 ± 0,8	67,1 ± 9,2	1,1 ± 0,7	16,5 ± 4	82,4 ± 4,6	25,2 ± 1,1	727,7 ± 17,2	461,6 ± 19,6	6897,4 ± 722	4376,4 ± 457,2
Timber	9,7 ± 1,3	42,7 ± 4,6	77,2 ± 3,4	354,4 ± 67,8	1,899 ± 0,1	1,138 ± 0,032	11,8 ± 0,6	50,6 ± 14,6	0,9 ± 0,5	18,1 ± 4,1	81 ± 4,5	<b>25,2 ± 1,5</b>	733,7 ± 25,3	467,7 ± 16,3	7200,2 ± 1133,8	4537,8 ± 606,1
Tremie	9,9 ± 1	48,9 ± 4,5	76,5 ± 2,8	232,1 ± 86,2	2,407 ± 0,109	1,24 ± 0,057	10,9 ± 0,5	70,2 ± 8,4	1 ± 0,6	17,1 ± 4,2	81,9 ± 4,7	23,4 ± 1	730,4 ± 29,5	468 ± 14	6830,1 ± 777,3	4637,1 ± 465,9
Vollige	9,2 ± 1	<b>37,7 ± 4,3</b>	76,6 ± 3,1	374,8 ± 21,9	1,702 ± 0,085	1,166 ± 0,025	11,9 ± 0,8	28,9 ± 7,2	0,9 ± 0,5	14,5 ± 3	84,6 ± 3,4	22,7 ± 1,4	<b>743,5 ± 25,7</b>	471,8 ± 14,4	6830,1 ± 927,5	4323,3 ± 489,6
MOYENNE	9,65 ± 0,42	46,08 ± 3,66	77,7 ± 1,55	320,21 ± 63,56	2,45 ± 0,59	1,24 ± 0,06	11,53 ± 0,46	57,05 ± 21,45	0,83 ± 0,25	16,8 ± 3,6	82,36 ± 3,72	23,38 ± 0,85	723,86 ± 13,83	462,96 ± 6,76	6760,51 ± 894,68	4320,94 ± 234,78

**Tableau 10.** Analyse de variance GLM réalisé sur les caractéristiques technologiques des variétés françaises implantées les trois années. Les chiffres en italiques correspondent au degré de liberté des différents effets étudiés lors de l'analyse de variance.

	F Variétés	F Année	F Lieux(Année)	F Trait N	F Var x Trait N	R <sup>2</sup> modèle	H <sup>2</sup>
<i>ddl</i>	32	2	8	1	32		
PMG	44.39***	20.87***	151.53***	1.4 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	82.96	0.18
PS	28.76***	540.13***	164.46***	1.99 <sup>ns</sup>	0.39 <sup>ns</sup>	86.78	0.1
Hagberg	33.27***	36***	43.99***	1.78 <sup>ns</sup>	0.39 <sup>ns</sup>	74.54	0.38
Protéines	11.08***	11.95***	23.73***	73.40***	0.75 <sup>ns</sup>	50.61	0.25
Dureté	113.68***	47.36***	16.71***	10.33**	0.86 <sup>ns</sup>	87.68	0.79
Type A	31.88***	497.31***	2.99**	0.07 <sup>ns</sup>	0.52 <sup>ns</sup>	79.74	0.34
Type B	32.62***	410.13***	3.12**	0.08 <sup>ns</sup>	0.5 <sup>ns</sup>	78.3	0.38
Type C	13.86***	1717.32***	17.24***	0.03 <sup>ns</sup>	0.94 <sup>ns</sup>	89.32	0.07
Visc Pot	127.2***	29	18.8***	5.68***	-	94.1	-
Visc Reelle	13.3***	9.52**	20.89***	3.74 <sup>ns</sup>	0.83 <sup>ns</sup>	61.94	0.46
Rdt Glucose kg/t	4***	12.84***	14.74***	0.39 <sup>ns</sup>	1.59*	34.19	0.18
Rdt Ethanol L/t	2.04***	30.58***	7.85***	11.75***	1.68*	26.58	0.07
Rdt t/ha	4.86***	197.45***	114.78***	0.26 <sup>ns</sup>	0.45 <sup>ns</sup>	74.26	0.04
Rdt Glucose kg/ha	3.91***	19.60***	106.89***	0.23 <sup>ns</sup>	0.54 <sup>ns</sup>	65.14	0.06
Rdt Ethanol L/ha	3.61***	11.44***	92.42***	0.31 <sup>ns</sup>	0.56 <sup>ns</sup>	61.44	0.06
Amylose	1.87**	31	4.1**	7.67***	2	20.8	-

\*, \*\*, \*\*\* : significatif au seuil p<0.05, p<0.01 et p<0.001 respectivement  
ns : non significatif

## C. RÉSULTATS

### 1. Description des variétés françaises pour les caractéristiques physicochimiques et technologiques du grain

#### 1.1 Amplitude des variations observées

Les variations les plus importantes peuvent être observées pour le PMG, le temps de chute de Hagberg, la viscosité potentielle, la dureté, la distribution de la taille des granules d'amidon et les rendements en glucose et éthanol (Tableau 9).

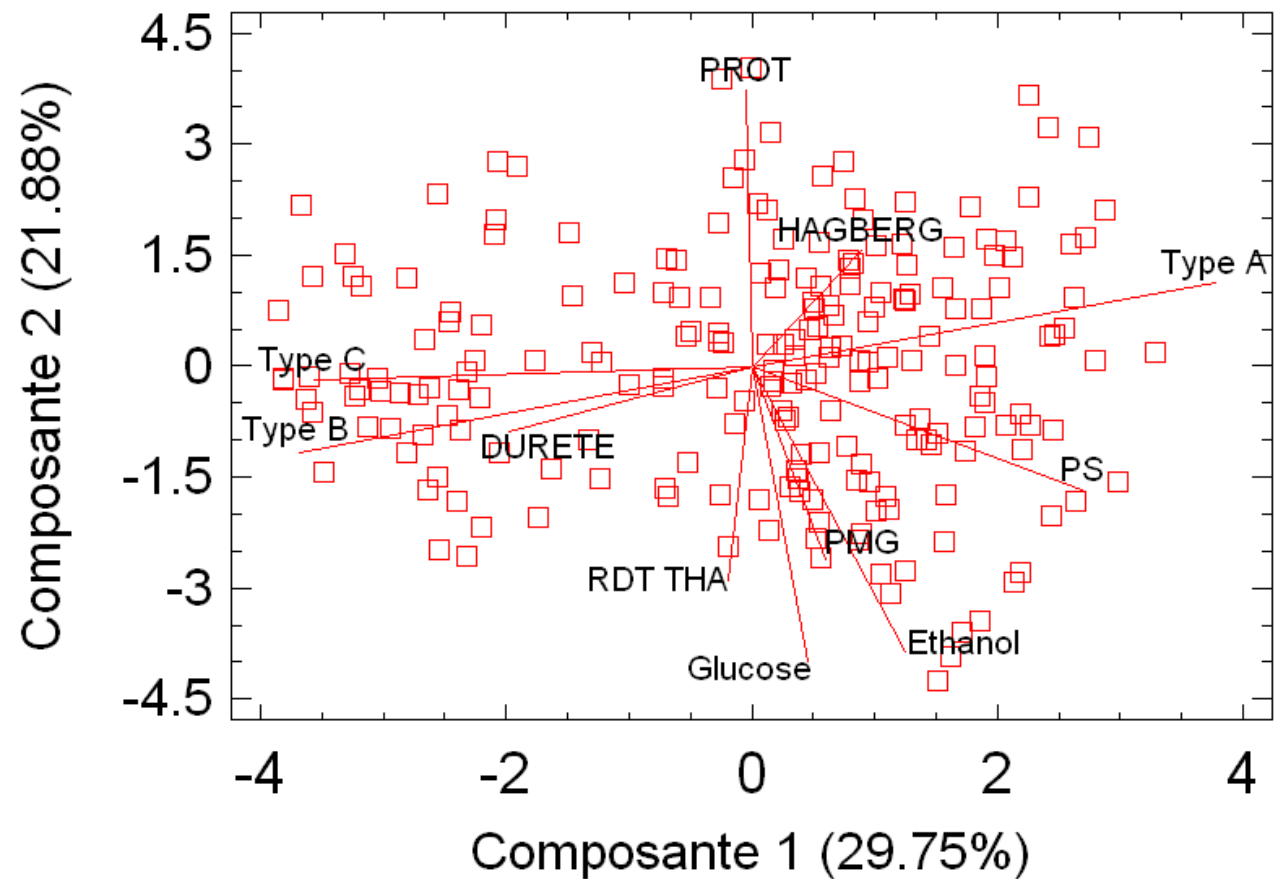
Le PMG le plus élevé est observé pour Mendel (53.5g) et le plus faible pour Voltige (37.7g). Le temps de chute de Hagberg le plus élevé a été observé pour la variété Sankara (422.7s) et le plus faible pour Tapidor (149.1s) qui possède par ailleurs la viscosité potentielle la plus élevée (4.133PI). La viscosité la plus faible a pu être observée pour la variété Crousty (1.453PI).

Le taux de protéines présente une amplitude de mesure relativement faible sur l'ensemble des variétés observées. Ainsi Glasgow possède un taux de protéines de 10.7% et Québon un taux de protéines de 12.7%. Ces mêmes variétés possèdent les valeurs minimale et maximale relevées pour la dureté avec Glasgow ayant une dureté de 18.5 et Québon une dureté de 82.1.

Concernant la distribution de la taille des granules d'amidon, des différences importantes peuvent être observées pour les granules de type B (taille comprise entre 2 et 10 $\mu$ m) et les granules de type A (taille supérieure à 10 $\mu$ m). Astuce possède la proportion de granules de type B la plus faible (10%) et la proportion de granules de type A la plus forte (89.3%). La variété Soissons possède quant à elle la proportion de granules de type B la plus importante (22.8%) et la proportion de granules de type A la plus faible (76.3%).

Globalement les variétés possèdent un bon rendement en glucose et en éthanol. En effet, le rendement en glucose est compris entre 688,7 kg/t pour Québon et 743.5 kg/t

	Composante 1	Composante 2
RDT THA	-0.0253148	-0.349813
PMG	0.0811402	-0.315243
PS	0.364534	-0.200904
HAGBERG	0.121131	0.188662
PROT	-0.00544914	0.450335
DURETE	-0.267521	-0.106588
Glucose	0.0622811	-0.48197
Ethanol	0.169723	-0.465829
Type C	-0.481727	-0.0217818
Type B	-0.498554	-0.142013
Type A	0.510214	0.134909



**Figure 33.** Analyse en composantes principales des lignées françaises réalisée sur les valeurs moyennes des données multilocales pluriannuelles et des traitements.



pour Voltige. La variation entre les différentes variétés est tout de même assez faible compte tenu des différences importantes observées pour les autres caractéristiques du grain. Il en est de même pour le rendement en éthanol où le minimum (445.9 L/t) est mesuré pour Ephoros et le maximum pour Soissons (473 L/t). Ces rendements en éthanol sont bien supérieurs aux 350 L/t couramment rapporté par les industriels pour le blé tendre. Concernant les rendements en glucose et éthanol ramené à l'hectare, la variété Premio possède les rendements en glucose et éthanol les plus élevés (7487.3 kg/ha et 4748.9 L/ha respectivement) et la variété Québon les plus faibles (5947.6 kg/ha et 3855.1 L/ha respectivement).

Le poids spécifique, la viscosité réelle, la proportion de granule de type C et la teneur en amylose présentent des variations relativement faibles par rapport aux amplitudes de mesures observées pour les autres variables.

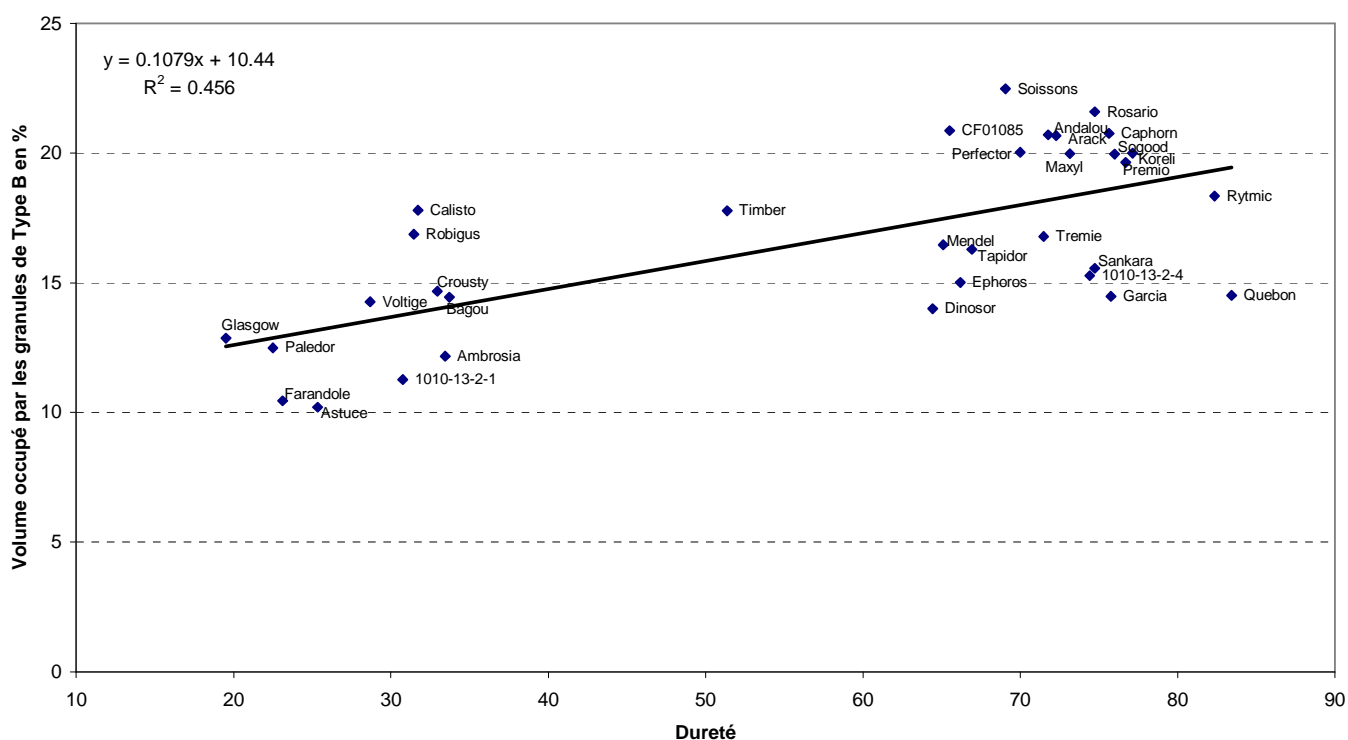
### 1.2 Analyse de variance sur les variétés françaises

L'analyse de variance sur les variétés françaises autres que les lignées *waxy* a permis de mettre en évidence des effets « variétés » et « année » très hautement significatif ( $P < 0.001$ ) sur toutes les caractéristiques du grain étudiées (Tableau 10). L'effet « lieu » est lui aussi hautement significatif pour toutes les variables étudiées. L'effet du traitement azoté a été significatif pour le taux de protéines, la dureté, la viscosité potentielle, le taux d'amylose et le rendement en éthanol. L'interaction « variétés\*traitement azoté » est significative seulement sur les rendements en glucose et en éthanol.

### 1.3 L'analyse en composantes principales (Figure 33)

Les deux premières composantes de l'ACP calculée sur les 32 variétés françaises cultivées durant les deux premières années dans huit lieux (SEC, SUR, R2N, LeD, CFD, MOM, UNI et CAU) expliquent 51.63% de la variation observée sur 11 variables (Glucose, Ethanol, PMG, Rendement, PS, Dureté, Distribution de la taille des granules (Type A, Type B, Type C), Hagberg, Taux de protéines). La première composante (29.75%) correspond

**Corrélation entre la dureté et le pourcentage de volume occupé par les granules de type B**



**Figure 34.** Corrélation entre la dureté et le volume occupé par les granules de type B chez les variétés françaises sur les valeurs moyennes multilocales.

**Tableau 11.** Corrélations linéaires (établies à partir des 32 variétés françaises dans chacun des 8 lieux) entre la dureté et les pourcentages de volume des différents types de granules. Type A : >10µm ; Type B : comprises entre 2 et 10 µm ; Type C : <2µm

	Dureté							
	SUR	SEC	Led	R2N	CAU	CFD	UNI	MOM
Type C	0.6162***	0.6636***	0.6314***	0.6771***	0.4006*	0.5812***	0.4479*	0.6064***
Type B	0.5883***	0.7687***	0.665***	0.6473***	0.4917**	0.6258***	0.3864*	0.7245***
Type A	-0.6055***	-0.7806***	-0.6825***	-0.6672***	-0.4965**	-0.6327***	-0.4021*	-0.7348***

\*, \*\*, \*\*\* : significatif au seuil p<0.05, p<0.01 et p<0.001 respectivement  
ns : non significatif

essentiellement à la distribution des granules d'amidon (type A : 0.510 ; type B : -0.499 ; type C : -0.482) et à la dureté (-0.268). La deuxième composante (21.88%) est associée aux rendements en glucose (-0.482), éthanol (-0.466), au taux de protéines (0.450), au rendement t/ha (-0.35) et au PMG (-0.315).

Ces deux axes mettent en évidence d'une part une relation entre la dureté et la distribution de la taille des granules et d'autre part une corrélation entre le rendement t/ha, le taux de protéines, le PMG et les rendements en glucose et éthanol.

#### 1.4 Les corrélations entre les différentes variables

##### *a) Corrélation entre le taux de protéines et le rendement en grain*

La corrélation négative entre le rendement en grain et le taux de protéines fut significative dans 5 des huit lieux étudiés (SEC, R2N, CAU, UNI et MOM). Le coefficient de corrélation est compris entre -0.428 (R2N) et -0.690 (CAU).

##### *b) Corrélation entre la dureté et la distribution de la taille des granules d'amidon*

Une corrélation entre la distribution de la taille des granules d'amidon et la dureté a été mise en évidence dans tous les lieux des deux premières années (Tableau 11). Ainsi plus la dureté est importante plus le pourcentage de volume représenté par les granules de type B (taille comprise entre 2 et 10 $\mu$ m) (Figure 34) et de type C (<2 $\mu$ m) est important. Réciproquement plus le grain est soft, plus le volume occupé par les granules de type A (>10 $\mu$ m) augmente.

##### *c) Corrélation entre le PMG et la dureté*

Une corrélation positive entre le PMG et la dureté a aussi été mise en évidence pour 4 lieux (SEC, R2N, CAU et UNI). Les coefficients sont compris entre 0.435 (lieu UNI) et 0.579 (lieu CAU).

**Tableau 12.** Corrélations linéaires entre les différentes caractéristiques du grain et le rendement en glucose et éthanol pour les 32 variétés françaises implantées en année 1 et 2.

	ANNEE 1							
	LD		R2N		SEC		SUR	
	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol
ETHANOL	ns	-	0.62***	-	0.4598**	-	0.6376***	-
RDT T/Ha	-	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PMG	ns	ns	-0.4537*	ns	ns	ns	ns	ns
PS	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HAGBERG	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
VISCO POT	ns	ns	-0.5162**	ns	ns	ns	ns	ns
PROT	ns	ns	-0.3723*	-0.4823**	-0.4047*	ns	ns	ns
DURETE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.4325*
TYPEC	ns	ns	ns	ns	ns	0.3682*	ns	ns
TYPEB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

	ANNEE 2							
	CAU		CFD		MO		UNI	
	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol
ETHANOL	0.8485***	-	0.8545***	-	0.6493***	-	0.8716***	-
RDT T/Ha	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PMG	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PS	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.3903*	-0.5178**
HAGBERG	-0.4217*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
VISCO REELLE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PROT	-0.5808***	-0.6759***	-0.6586***	-0.6943***	-0.6625***	-0.6956***	-0.4174*	-0.4194*
DURETE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMYLOSE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

\*, \*\*, \*\*\* : significatif au seuil  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  et  $p < 0.001$  respectivement  
ns : non significatif

*d) Les autres corrélations*

Plusieurs autres corrélations ont été mises en évidence et observées dans au plus trois lieux. Une corrélation positive entre le PMG et le volume des granules de type C dans les lieux SEC, R2N et UNI. Les coefficients sont compris entre 0.364 (lieu R2N) et 0.509 (lieu SEC). Cette corrélation découle des relations observées entre [PMG – dureté] et [dureté – granule type C] observées pour les lieux SEC, R2N, CAU et UNI. Par transitivité, la corrélation entre le PMG et le volume des granules de type C est significative pour trois de ces lieux (SEC, R2N et UNI).

Deux corrélations positives mettant en relation le temps de chute de Hagberg et le taux de protéines (0.3510 et 0.4638 pour CFD et CAU) d'une part et le temps de chute et le poids spécifique d'autre part ont été mises en évidence sur deux lieux (0.561 et 0.365 pour UNI et MOM).

1.5 Les corrélations avec les rendements en glucose et en éthanol (Tableau 12)

Après avoir observé les relations entre les variables physicochimiques et technologiques du grain, les corrélations entre ces caractéristiques et le rendement en glucose et éthanol ont été calculées pour chaque lieu.

Tout d'abord les rendements en glucose et éthanol sont fortement corrélés positivement pour tous les lieux excepté Lemaire Desfontaines (année 1). Les coefficients de corrélation sont compris entre 0.45 (lieu SEC) et 0.638 (lieu SUR) pour la première année d'expérimentation et entre 0.649 (lieu MOM) et 0.872 (lieu UNI) pour la deuxième année.

*a) Corrélation entre le taux de protéines et les rendements en glucose et éthanol*

L'expérimentation permet de montrer une corrélation significative entre le taux de protéines et les rendements en glucose et en éthanol. Pour la première année, pour les lieux R2N et SEC on relève une corrélation négative entre le taux de protéines et le rendement en

glucose respectivement de -0.372 et -0.405. Cependant le rendement en éthanol n'est influencé significativement par le taux de protéines (-0.482) que dans le lieu R2N.

Pour la deuxième année, tous les lieux présentent une corrélation négative significative. Les coefficients sont compris entre -0.417 (lieu UNI) et -0.662 (lieu MOM) pour le glucose et entre -0.419 (lieu UNI) et -0.695 (lieu MOM) pour l'éthanol.

*b) Les autres corrélations avec les rendements en glucose et en éthanol*

Les autres corrélations mises en évidence avec le rendement en glucose n'ont été repérées comme significatives que pour un lieu en particulier.

Ainsi, pour le lieu R2N, la viscosité potentielle est corrélée négativement avec le taux de glucose (-0.51) de manière hautement significative. Ce résultat paraît assez logique puisque l'hydrolyse enzymatique est généralement plus efficace dans un milieu où la viscosité des arabinoxylanes n'est pas importante. Pour ce même lieu une autre corrélation négative a été rapportée entre le PMG et le rendement en glucose (-0.453). Cette corrélation est assez surprenante puisque l'on pourrait s'attendre à ce qu'une variété possédant un poids de mille grains élevé et par conséquent un meilleur remplissage du grain aurait plus d'amidon que des grains possédant un faible PMG. Une corrélation positive (0.368) entre le volume des granules de type C et le rendement en éthanol a aussi été mise en évidence dans le lieu R2N. Cette corrélation est cependant contradictoire avec la corrélation négative (-0.433) entre le rendement en éthanol et la dureté mise en évidence dans le lieu SUR.

En effet, la dureté et le volume des granules de type C ont été montrés comme corrélés positivement dans tous les lieux.

Pour le lieu CAU, le temps de chute de Hagberg a été montré comme négativement associé au rendement en glucose (-0.422). Cette liaison semble logique puisqu'un temps de chute faible est dû à une action des  $\alpha$ -amylases qui ont commencé à dégrader l'amidon.

**Tableau 13.** Composition allélique des gluténines de haut et faible poids moléculaire pour les variétés françaises.

VAR	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	<i>Glu-A3</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Glu-D3</i>
1010-13-2-1	2*	7-8	5-10	e/f	g	c
1010-13-2-4	2*	7-8	5-10	e/f	g	c
Ambrosia	0	17-18	3-12	e/f	j	c
Andalou	0	7-8	5-10	a	g	c
Arack	0	6-8	5-10	a	c'	c
Astuce	1	17-18	5-10	d	j	c
Bagou	0	6.1-22	2-12	e/f	a	c
Calisto	0	7-9	5-10	e/f	g	c
Caphorn	1	7-9	5-10	e/f	g	c
CF01085	0	7-9	2-12	d	c'	c
Crousty	0	6-8	5-10	d	g	c
Dinosor	1	6-8	5-10	d	g	b
Ephoros	0	7-9	5-10	a	g	c
Farandole	1	7-8	2-12	d	g	c
Garcia	0	7-9	3-12	e/f	c	c
Glasgow	0	7-9	3-12	a	g	a
Koreli	0	7-8	5-10	a	c'	c
Maxyl	1	7-9	3-12	e/f	g	c
Mendel	0	7-9	2-12	d	g	b
Paledor	0	6-8	2-12	a	f	c
Perfector	0	7-9	2-12	d	g	c
Premio	0	6-8	5-10	a	f	c
Quebon	1	7-9	5-10	e/f	g	c
Robigus	0	7-8	5-10	a	b	c
Rosario	1	17-18	2-12	e/f	g	c
Rytmic	0	6-8	5-10	a	g	c
Sankara	0	17-18	2-12	e/f	g	c
Sogood	1	17-18	2-12	e/f	g	c
Soissons	2*	7-8	5-10	a	b'	c
Tapidor	0	17-18	5-10	e/f	j	b
Timber	0	6.1-22	5-10	e/f	g	c
Tremie	0	6-8	3-12	e/f	c	c
Voltige	2*	7-8	5-10	a	b	c

**Tableau 14.** Effet des allèles de gluténines de haut et faible poids moléculaire sur les rendements en glucose et éthanol.

Locus	GLUCOSE		ETHANOL		+ effet des allèles -
	F	R <sup>2</sup>	F	R <sup>2</sup>	
<i>Glu-A1</i>	9.27***	16.37	6.10**	16.72	0 <sup>a</sup> 2 <sup>*a</sup> 1 <sup>b</sup>
<i>Glu-B1</i>	ns	-	2.92*	14.58	6-8 <sup>a</sup> 6.1-22 <sup>ab</sup> 7-8 <sup>abc</sup> 7-9 <sup>bc</sup> 17-18 <sup>c</sup>
<i>Glu-D1</i>	7.49***	15.66	ns	-	3-12 <sup>a</sup> 5-10 <sup>b</sup> 2-12 <sup>b</sup>
<i>Glu-A3</i>	4.98**	14.64	ns	-	a <sup>a</sup> e/f <sup>a</sup> d <sup>b</sup>
<i>Glu-B3</i>	3.45**	16.49	2.22*	16.39	b' <sup>a</sup> c <sup>a</sup> f <sup>a</sup> b <sup>a</sup> a <sup>ab</sup> c' <sup>ab</sup> g <sup>b</sup> j <sup>b</sup>
<i>Glu-D3</i>	ns	-	ns	-	a <sup>a</sup> b <sup>a</sup> c <sup>a</sup>

les lettres en exposant permettent de classer les allèles associés au rendement du meilleur au plus mauvais (a>b>c)

L'amidon, partiellement dégradé, est moins abondant et plus accessible aux enzymes intervenant durant l'étape d'hydrolyse lors du processus de fabrication d'éthanol.

Dans le lieu UNI, le poids spécifique est corrélé négativement au rendement en glucose (-0.390) et au rendement en éthanol (-0.518). Il est vraisemblable que des conditions d'élaboration du rendement et de remplissage du grain aient abouti dans ce lieu cette année là à davantage de grains de petites tailles et que les gros grains soient mal remplis.

#### 1.6 Effet des allèles de gluténines de haut et faible poids moléculaire sur le rendement en glucose et éthanol (Tableaux 13 et 14).

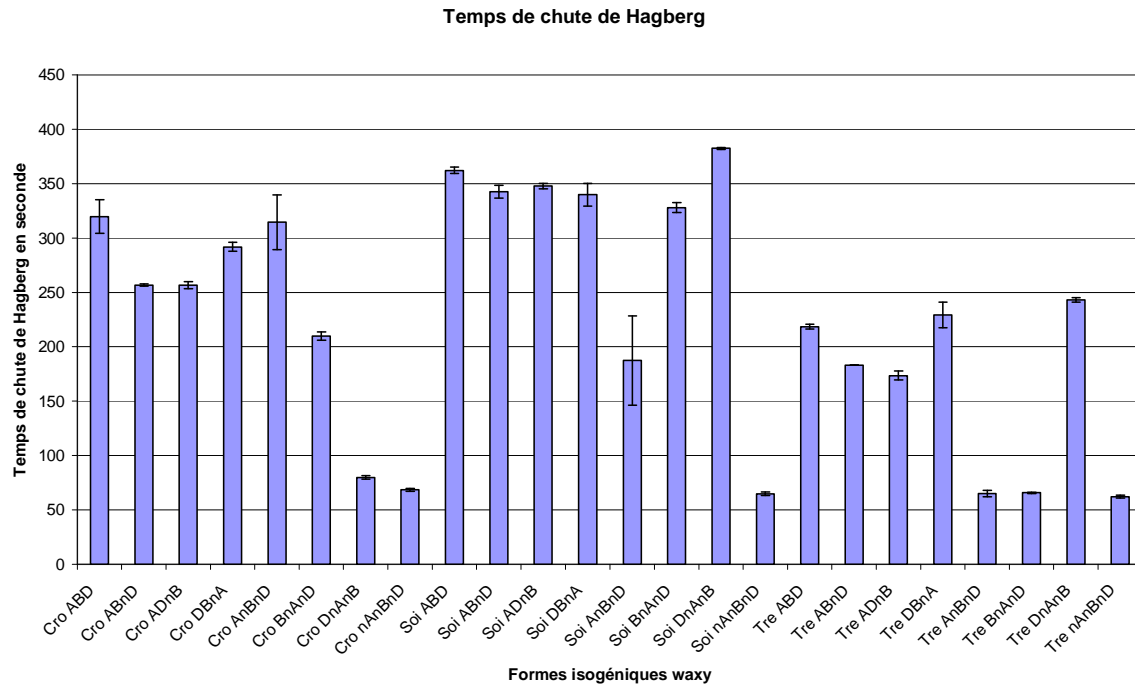
L'effet des allèles aux loci des gluténines de haut poids moléculaire (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*) et de faible poids moléculaire (*Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*) a été étudié par analyse de variance pour chacun des loci sur les variétés françaises cultivées les deux premières années. Ces analyses ont permis de révéler que le locus *Glu-A1* a un effet très hautement significatif sur les rendements en glucose et éthanol. Ainsi les variétés possédant les allèles 0 et 2\* produisent plus d'éthanol que celles possédant l'allèle 1. Le locus *Glu-B1* a un effet significatif sur le rendement en éthanol. Les allèles 6-8, 6.1-22 et 7-8 sont les allèles les plus intéressants pour la production de bioéthanol suivis des allèles 7-9 et 17-18. Le locus *Glu-D1* a un effet significatif seulement sur le rendement en glucose. La présence de l'allèle 3-12 conduit à un meilleur rendement que les allèles 5-10 et 2-12.

Concernant les loci des gluténines de faibles poids moléculaires le locus *Glu-A3* a un effet significatif sur le rendement en glucose avec les allèles a et e/f qui aboutissent à un meilleur rendement que l'allèle d. Le locus *Glu-B3* a un effet significatif à la fois pour le rendement en glucose mais aussi en éthanol. Les allèles forment deux groupes : les allèles b', c, f, b sont favorables à un rendement plus élevé contrairement à g et j. Pour le locus *Glu-D3* aucun des allèles n'a d'effet significatif sur le rendement en glucose ou éthanol.



**Tableau 15.** Données moyennes et écart types des lignées isogéniques waxy dans l'essai multilocal pour chacune des variables étudiées. La valeur maximale pour la variable considérée est indiquée en gras sur fond vert et la valeur minimale en gras, italique sur fond bleu.

VARIETES	Rdt parcellaire	PMG	PS	HAGBERG	VISCO REELLE	Taux de protéines	Dureté	Type C	Type B	Type A	Rdt Glucose kg/t	Rdt Ethanol L/t	Rdt Glucose kg/ha	Rdt Ethanol L/ha
Cro A B D	9.8 ± 1.12	43.3 ± 2.11	80.2 ± 0.83	319.7 ± 29.05	<b>1.141 ± 0.02</b>	11.6 ± 0.56	33.7 ± 4.94	0.4 ± 0.17	11.9 ± 1.46	87.7 ± 1.61	ND	ND	ND	ND
Cro A B nD	10 ± 1.13	47 ± 1.81	<b>81.3 ± 0.54</b>	256.7 ± 13.23	1.167 ± 0.02	12 ± 0.4	35.1 ± 4.59	0.4 ± 0.18	12.5 ± 2.04	87.1 ± 2.2	ND	ND	ND	ND
Cro A D nB	9.6 ± 0.99	46.2 ± 2.18	81 ± 0.53	256.7 ± 7.28	1.164 ± 0.03	12 ± 0.52	37.8 ± 5.24	<b>0.3 ± 0.16</b>	11 ± 1.43	88.7 ± 1.47	ND	ND	ND	ND
Cro D B nA	9.5 ± 1.28	44.4 ± 1.72	81.1 ± 0.49	291.8 ± 23.95	1.172 ± 0.02	12.4 ± 0.52	38.2 ± 5.1	0.3 ± 0.11	<b>10.4 ± 1.4</b>	<b>89.3 ± 1.43</b>	ND	ND	ND	ND
Cro A nB nD	9.9 ± 1.18	44.4 ± 1.72	80.8 ± 0.58	314.5 ± 29.18	1.165 ± 0.02	11.7 ± 0.45	33.4 ± 5.54	0.5 ± 0.19	12.4 ± 2.11	87.1 ± 2.25	ND	ND	ND	ND
Cro B nA nD	<b>8.5 ± 1.01</b>	47.7 ± 0.84	81 ± 0.57	209.8 ± 37.7	1.179 ± 0.02	12.4 ± 0.69	39.7 ± 2.56	0.4 ± 0.21	11.6 ± 1.46	88.1 ± 1.66	ND	ND	ND	ND
Cro D nA nB	10 ± 0.95	44.6 ± 1.46	80.5 ± 0.5	79.8 ± 8.4	1.166 ± 0.03	11.8 ± 0.53	30.7 ± 2.27	0.4 ± 0.12	12.2 ± 1.48	87.4 ± 1.55	ND	ND	ND	ND
Cro nA nB nD	10 ± 1.14	45 ± 2.65	80.1 ± 0.66	68.5 ± 2.95	1.162 ± 0.03	12.1 ± 0.37	<b>25.3 ± 5.34</b>	0.6 ± 0.25	13.7 ± 1.42	85.7 ± 1.47	ND	ND	ND	ND
Soi A B D	9.7 ± 0.7	42.3 ± 1.77	80.4 ± 0.82	362.2 ± 19.81	1.166 ± 0.01	12 ± 0.37	67 ± 5.31	0.5 ± 0.19	17.6 ± 1.15	81.9 ± 1.31	ND	ND	ND	ND
Soi A B nD	9.4 ± 0.68	42.8 ± 1.4	80.6 ± 0.58	342.5 ± 66.27	1.171 ± 0.03	12.4 ± 0.72	71.8 ± 2.65	0.5 ± 0.15	16.7 ± 1.69	82.8 ± 1.81	ND	ND	ND	ND
Soi A D nB	9.6 ± 0.71	41.5 ± 1.14	80.8 ± 0.7	347.8 ± 28.65	1.169 ± 0.01	12 ± 0.47	67 ± 4.92	0.5 ± 0.13	17.7 ± 1.46	81.8 ± 1.58	ND	ND	ND	ND
Soi D B nA	9.7 ± 0.84	42 ± 1.33	80.4 ± 0.56	339.8 ± 34.89	1.169 ± 0.01	11.8 ± 0.46	65.4 ± 5.35	0.4 ± 0.16	17.4 ± 0.85	82.1 ± 0.99	ND	ND	ND	ND
Soi A nB nD	9.2 ± 0.44	44 ± 1.57	81 ± 0.87	187.3 ± 51.62	1.169 ± 0.02	12.5 ± 0.5	<b>73.3 ± 2.78</b>	0.7 ± 0.21	20.4 ± 3.13	78.9 ± 3.33	ND	ND	ND	ND
Soi B nA nD	9.6 ± 0.55	43.3 ± 1.7	80.1 ± 0.79	327.8 ± 28.34	1.145 ± 0.01	12.1 ± 0.39	69.7 ± 2.68	0.5 ± 0.15	19.3 ± 2.62	80.2 ± 2.76	ND	ND	ND	ND
Soi D nA nB	9.4 ± 0.88	<b>40 ± 2.75</b>	80.7 ± 0.54	<b>385.2 ± 39.86</b>	1.166 ± 0.01	12.1 ± 0.59	69.5 ± 4.87	0.5 ± 0.15	18.3 ± 1.05	81.2 ± 1.18	ND	ND	ND	ND
Soi nA nB nD	9.2 ± 0.84	42.1 ± 1.08	80.9 ± 0.79	64.8 ± 0.75	1.201 ± 0.02	<b>12.6 ± 0.61</b>	59.9 ± 4.05	<b>2 ± 0.4</b>	<b>36 ± 2.19</b>	<b>62 ± 2.58</b>	ND	ND	ND	ND
Tre A B D	<b>10.7 ± 0.57</b>	51.5 ± 2.75	77.3 ± 0.89	218.5 ± 53.85	1.227 ± 0.03	10.7 ± 0.55	65.5 ± 3.07	0.6 ± 0.21	14.1 ± 1.25	85.3 ± 1.43	<b>728 ± 11.61</b>	463.3 ± 6.83	<b>7820.3 ± 465.41</b>	<b>4976.5 ± 287.33</b>
Tre A B nD	10.1 ± 0.31	50.7 ± 3.48	77.5 ± 0.47	183.2 ± 52.91	1.253 ± 0.03	11.2 ± 1	65.3 ± 2.98	0.6 ± 0.23	14.5 ± 1.88	84.9 ± 2.08	720.4 ± 10.65	456.9 ± 8.08	7300 ± 256.11	4629.7 ± 171.93
Tre A D nB	10 ± 0.41	51.9 ± 3.22	78 ± 0.49	173.5 ± 50.41	<b>1.29 ± 0.05</b>	11.3 ± 0.72	69.8 ± 6.39	0.7 ± 0.26	14.4 ± 1.1	84.9 ± 1.33	720.2 ± 15.74	461 ± 9.87	7224.1 ± 327.76	4623.9 ± 202.89
Tre D B nA	10.5 ± 0.62	50.8 ± 2.57	<b>77.3 ± 0.79</b>	229 ± 71.77	1.235 ± 0.05	<b>10.6 ± 0.58</b>	61.4 ± 10.22	0.5 ± 0.13	13.5 ± 1.83	85.9 ± 1.95	718.9 ± 17.04	460.4 ± 10.1	7577.3 ± 396.09	4855.3 ± 308.69
Tre A nB nD	10.6 ± 0.64	50.8 ± 2.46	77.9 ± 0.98	65 ± 1.67	1.251 ± 0.06	11.5 ± 0.41	61.6 ± 4.56	1 ± 0.53	19.7 ± 4.48	79.2 ± 4.98	<b>703.4 ± 11.75</b>	453.7 ± 10.13	7478.3 ± 510.11	4824.5 ± 357.68
Tre B nA nD	10.1 ± 0.74	<b>53 ± 2.89</b>	78 ± 0.29	65.7 ± 3.61	1.251 ± 0.03	11.2 ± 0.48	61.2 ± 2.31	0.6 ± 0.26	15.7 ± 2.28	83.7 ± 2.5	716.8 ± 5.05	457.1 ± 7.62	7243.3 ± 557.85	4621.3 ± 403.18
Tre D nA nB	10.3 ± 0.67	52.7 ± 3.16	78.3 ± 1.17	243.2 ± 75.2	1.238 ± 0.04	10.9 ± 0.42	70.1 ± 2.92	0.6 ± 0.15	14.1 ± 1.04	85.4 ± 1.12	726.3 ± 12.8	<b>463.9 ± 9.55</b>	7484.7 ± 558.87	4783.8 ± 392.86
Tre nA nB nD	10.1 ± 0.46	49.5 ± 2.92	78 ± 0.37	<b>62.3 ± 0.52</b>	1.274 ± 0.05	12.1 ± 0.5	57.5 ± 5.16	1.6 ± 0.37	28 ± 3.12	70.4 ± 3.26	707.6 ± 16.71	<b>452.4 ± 9.28</b>	<b>7152.6 ± 346.03</b>	<b>4573.6 ± 235.74</b>
MOYENNE	<b>9.8 ± 0.49</b>	<b>46.3 ± 4.06</b>	<b>79.7 ± 1.44</b>	<b>224.8 ± 109.48</b>	<b>1.195 ± 0.04</b>	<b>11.8 ± 0.56</b>	<b>55.4 ± 15.95</b>	<b>0.6 ± 0.39</b>	<b>16.4 ± 5.72</b>	<b>83 ± 6.09</b>	<b>717.7 ± 8.47</b>	<b>458.6 ± 4.26</b>	<b>7410.1 ± 222.74</b>	<b>4736.1 ± 144.21</b>



**Figure 35.** Temps de chute de Hagberg chez les lignées isogéniques waxy.

## 2. Description des lignées isogéniques pour les caractéristiques physicochimiques et technologiques du grain

### 2.1 Amplitude des variations observées (Tableau 15)

Les variations les plus importantes peuvent être observées pour le temps de chute de Hagberg, le taux de protéines, la dureté, la distribution de la taille des granules d'amidon et les rendements en glucose et éthanol. Les rendements en glucose et éthanol ont été seulement mesurés sur les huit lignées isogéniques waxy de Trémie pour des raisons de temps de réalisation dans le cadre de cette recherche de thèse.

#### *a) Le temps de chute de Hagberg des lignées isogéniques waxy*

La mesure du temps de chute de Hagberg (Figure 35) met en évidence une différence très importante entre les lignées possédant les trois allèles nulles et les lignées normales. Ainsi Crousty nAnBnD possède un temps de chute de 68.5s alors que la forme normale possède un temps de chute de 319.7s. Il en est de même pour les lignées des variétés Soissons (64.8s et 362.2s) et Trémie (62.3s et 218.5s). Les autres lignées ont des temps de chute très différents en fonction des variétés. Aucun lien entre le nombre d'allèles nuls et le temps de chute n'a pu être mis en évidence de manière significative.

#### *b) Le taux de protéines et la dureté des lignées isogéniques waxy*

Pour le taux de protéines, les différences sont moins importantes mais toujours présentes entre la forme triple nulle et la forme normale pour les trois variétés. En effet, les formes triple nulles possèdent un taux de protéines un peu plus important que celui des lignées possédant les trois allèles fonctionnels. L'écart le plus important est observé pour Trémie triple nul, qui possède un taux de 12.1% de protéines, contre 10.7% pour la forme normale.

Comme pour le taux de protéines, les différences de dureté sont relativement faibles mais concerne toujours les formes triples nulles par rapport aux formes normales. Les formes

**Tableau 16.** Analyse de variance GLM réalisée sur les caractéristiques technologiques des lignées isogéniques. Les chiffres en italiques correspondent au degré de liberté des différents effets étudiés lors de l'analyse de variance.

	F Variétés	F Lieux	F TraitN(Lieux)	F Var x Trait N	R <sup>2</sup> modèle
<i>ddl</i>	23	2	3	23	
PMG	42.60***	59.17***	10.35***	0.88 <sup>ns</sup>	88.65
PS	32.07***	21.87***	0.92 <sup>ns</sup>	0.45 <sup>ns</sup>	83.95
Hagberg	52.07***	14.97***	0.16 <sup>ns</sup>	0.29 <sup>ns</sup>	89.35
Protéines	10.64***	20.49***	21.91***	0.5 <sup>ns</sup>	66.66
Dureté	78.41***	3.19*	10.74***	0.47 <sup>ns</sup>	92.71
Type A	34.65***	6.72**	4.84**	0.59 <sup>ns</sup>	87.12
Type B	35.45***	5.04**	4.45**	0.62 <sup>ns</sup>	87.26
Type C	19.11***	39.07***	8.37***	0.50 <sup>ns</sup>	81.63
Visc Reelle	13.71***	5.89**	4.34**	0.61 <sup>ns</sup>	68.19
Rdt t/ha	6.31***	105.68***	9.76***	0.62 <sup>ns</sup>	70.93
Rdt Glucose kg/t	4.54** 7	4.54** 2	4.63**	0.74 <sup>ns</sup> 7	55.32
Rdt Ethanol L/t	2.35 <sup>ns</sup> 7	7.17** 2	7.59***	0.58 <sup>ns</sup> 7	45.1
Rdt Glucose kg/ha	2.91* 7	18.85*** 2	2.05 <sup>ns</sup>	0.55 <sup>ns</sup> 7	51.08
Rdt Ethanol L/ha	2.35 <sup>ns</sup> 7	17.55*** 2	1.47 <sup>ns</sup>	0.44 <sup>ns</sup> 7	46.01

\* , \*\* , \*\*\* : significatif au seuil  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  et  $p < 0.001$  respectivement  
ns : non significatif

triples nulles possèdent une dureté plus faible que celle relevée pour les formes normales. Les lignées triples nulles des variétés Crousty, Soissons et Trémie possèdent une dureté de 25.3, 59.9 et 57.7 respectivement alors que pour les formes normales de ces variétés la dureté est de 33.7, 67 et 65.5.

*c) La distribution des granules d'amidon chez les lignées isogéniques*

Chez Crousty, il n'y a pas de différence significative entre les différentes lignées isogéniques dont le volume des granules de type A est compris entre 85.7% (forme triple nulle) et 89.3% (forme DBnA). Par contre, pour les lignées isogéniques waxy de Soissons et de Trémie, les valeurs entre les formes triples nulles et les autres formes isogéniques sont très différentes. Ainsi, chez Soissons, le volume représenté par les granules de type A est compris entre 62% (Triple nul) et 82.8% pour la forme ABnD. La forme normale de Soissons possède un volume de granules de type A de 81.9%. Pour Trémie, la forme triple nulle possède un volume de granules de type A de 70.4% tandis que la forme normale possède un volume de 85.3% pour cette classe de granules.

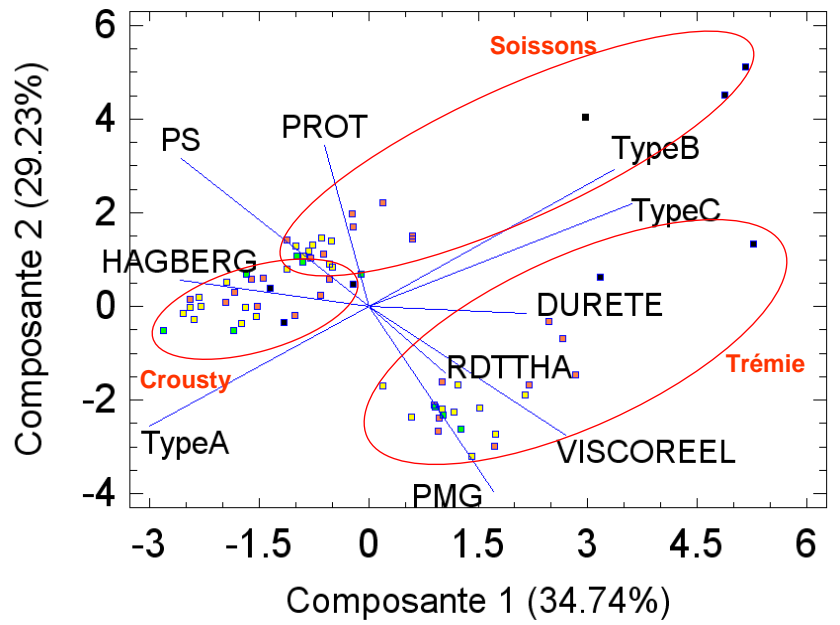
En général, la forme isogénique waxy triple nulle possède donc un volume représenté par les granules de type A moins élevé et par conséquent un volume plus important des granules de diamètres plus faibles (type B et type C).

*d) Les rendements en glucose et éthanol des lignées isogéniques waxy de Trémie*

Pour le rendement en glucose, les lignées triple nulle et AnBnD de Trémie (*Wx-A1a*, *Wx-B1b*, *Wx-D1b*) possèdent les rendements les plus faibles (703.4 kg/t et 707.6 kg/t respectivement) alors que la forme normale de Trémie possède le meilleur (728 kg/t). Les différences entre les lignées sont faibles mais les deux lignées AnBnD et triple nulle sont cependant plus faibles que les autres qui ne sont pas significativement différentes entre elles.

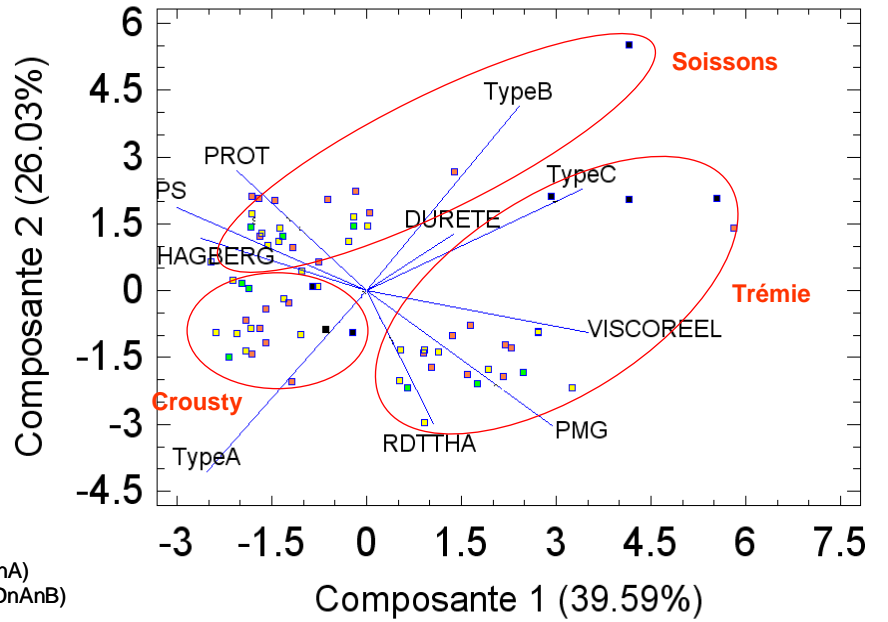
**A**

	Composante 1	Composante 2
RDTHA	0.128966	-0.170814
PMG	0.210884	-0.476417
PS	-0.31689	0.380222
HAGBERG	-0.318976	0.0671809
VISCOREEL	0.334096	-0.330028
PROT	-0.0746282	0.413867
DURETE	0.266916	-0.017384
TypeC	0.44499	0.264404
TypeB	0.416306	0.351265
TypeA	-0.420679	-0.347799



**B**

	Composante 1	Composante 2
RDTHA	0.127767	-0.352024
PMG	0.354557	-0.358032
PS	-0.374506	0.226992
HAGBERG	-0.316176	0.138068
VISCOREEL	0.423644	-0.10996
PROT	-0.248105	0.316891
DURETE	0.165556	0.1488
TypeC	0.411893	0.268362
TypeB	0.293146	0.490294
TypeA	-0.306127	-0.479838



- Forme normale (ABD)
- Formes simples nulles (ABnD; ADnB; DBnA)
- Formes doubles nulles (AnBnD; BnAnD; DnAnB)
- Forme triple nulle (nAnBnD)

**Figure 36.** Analyses en composantes principales des lignées isogéniques waxy. La première (A) correspond au traitement N et la deuxième (B) au traitement n-

Concernant le rendement en éthanol, les différences observées sont encore plus faibles que celles observées pour le rendement en glucose. Ceci explique pourquoi l'effet variété n'est pas significatif. Cependant il est tout de même intéressant de noter que les variétés possédant les rendements les moins importants sont les mêmes que pour le rendement en glucose (Triple nulle et AnBnD) avec 452.4 L/t et 453.7 L/t respectivement et que les meilleurs sont obtenus pour les formes DnAnB et normale (463.9 L/t et 463.3 L/t respectivement).

Les rendements glucose et éthanol en kg/ha et L/ha les moins bons sont observés pour la forme triple nulle (7152.6 kg/ha et 4573.6 L/ha respectivement) tandis que les meilleurs sont mesurés pour la forme normale (7820.3 kg/ha et 4976.5 L/ha). Ceci peut s'expliquer du fait que la forme triple nulle possède un rendement parcellaire en grain plus faible que celui de la forme normale ce qui accentue encore plus les différences déjà observées pour les rendements en glucose et éthanol.

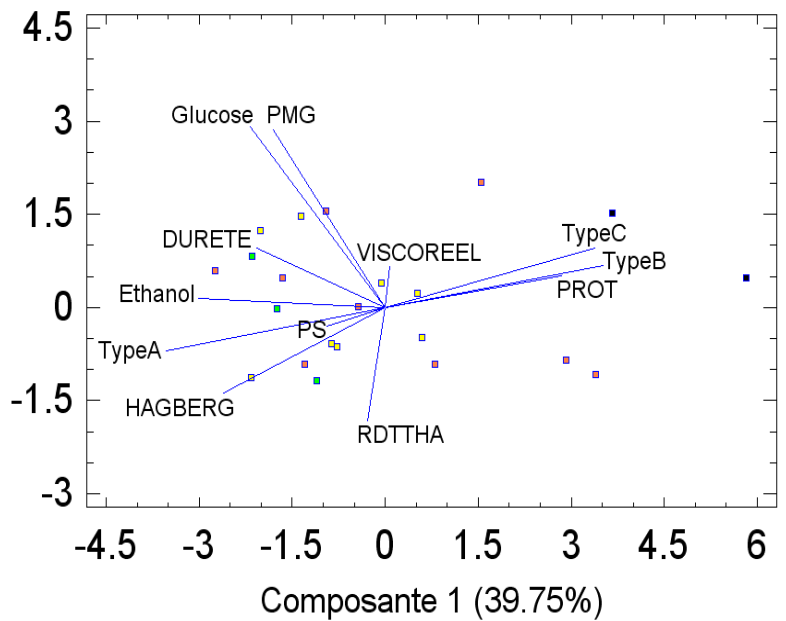
## 2.2 Analyse de variance sur les lignées isogéniques waxy

L'analyse de variance (Tableau 16) a été réalisée sur les huit lignées isogéniques des variétés Trémie, Soissons et Crousty pour toutes les caractéristiques du grain exceptées les rendements en glucose et éthanol pour lesquels seules les lignées isogéniques *waxy* de Trémie ont été à ce jour mesurées.

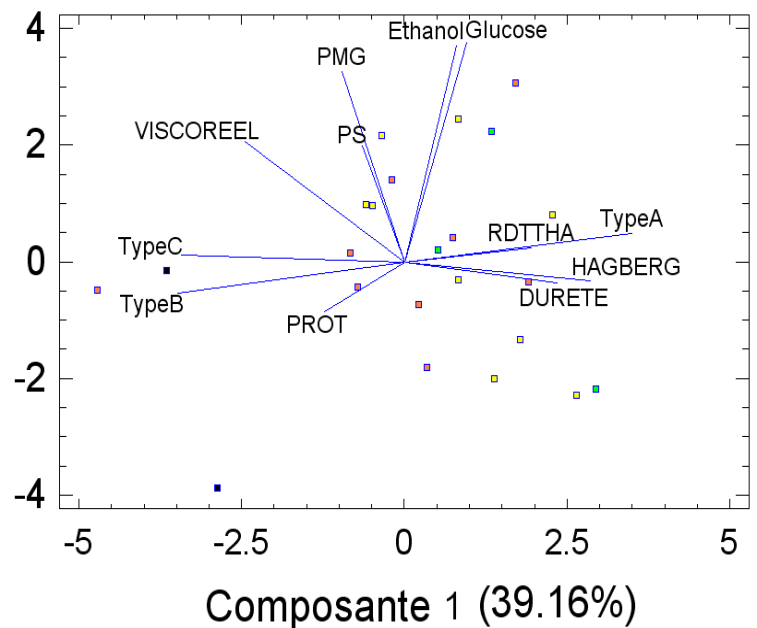
Un effet lieu significatif a été observé pour toutes les variables étudiées sans exception. Ceci n'a pas été le cas pour l'effet du traitement azoté qui n'a pas été significatif pour le poids spécifique, le temps de chute de Hagberg ainsi que les rendements glucose et éthanol à l'hectare. Aucune interaction « variété \* traitement » n'a été observée pour les différentes variables étudiées. Cette analyse a mis en évidence un effet « variété » au moins hautement significatif pour toutes les caractéristiques du grain excepté pour le rendement en éthanol.

**A**

	Composante 1	Composante 3 (11.6%)
RDTHA	-0.0338577	-0.362373
PMG	-0.211051	0.566589
PS	-0.11052	-0.0605622
HAGBERG	-0.303525	-0.271827
VISCOREEL	0.00779019	0.130362
PROT	0.331917	0.101331
DURETE	-0.24212	0.189021
Glucose	-0.25445	0.577115
Ethanol	-0.35147	0.0304617
TypeC	0.394058	0.189287
TypeB	0.410459	0.134396
TypeA	-0.411199	-0.138683

**B**

	Composante 1	Composante 2 (24%)
RDTHA	0.243603	0.0346965
PMG	-0.120074	0.469882
PS	-0.080943	0.287302
HAGBERG	0.357962	-0.0476465
VISCOREEL	-0.305906	0.295725
PROT	-0.153557	-0.123395
DURETE	0.292965	-0.0511529
Glucose	0.118994	0.540889
Ethanol	0.100402	0.533314
TypeC	-0.428037	0.0158536
TypeB	-0.43554	-0.0765677
TypeA	0.437508	0.0692796



- Forme normale (ABD)
- Formes simples nulles (ABnD; ADnB; DBnA)
- Formes doubles nulles (AnBnD; BnAnD; DnAnB)
- Forme triple nulle (nAnBnD)

**Figure 37.** Analyses en composantes principales des lignées isogéniques waxy de Trémie. La première (A) concerne les lignées ayant subi le traitement N et la seconde (B) fut obtenue avec les lignées ayant subi le traitement n-.



### 2.3 Analyses en composantes principales des lignées isogéniques Soissons, Trémie et Crousty (Figure 36)

Les analyses en composantes principales mettent en évidence trois groupes d'individus qui correspondent aux lignées isogéniques des trois variétés Soissons, Trémie et Crousty. Les individus de Crousty forment un groupe compact tandis que les lignées de Soissons et Trémie sont plutôt dispersées sur le premier plan des ACP.

Pour le traitement N (Figure 36A), le premier axe qui représente 34.74% de la variation est expliqué principalement par la distribution des granules d'amidon (Type A : -0.421 ; Type B : 0.416 ; Type C : 0.445) et la viscosité réelle (0.334). Le second axe (29.23%) est expliqué par le PMG (-0.476), le taux de protéines (0.414) et le poids spécifique (0.3802).

Pour le traitement n- (Figure 36B), le premier axe (39.59%) est aussi expliqué par les granules de type C (0.411) et la viscosité réelle (0.424), et le second axe (26.04%) par les granules de type B (0.490) et A (-0.480) ainsi que le PMG (-0.358) et le rendement en grains (-0.352).

### 2.4 Analyses en composantes principales sur les lignées isogéniques de Trémie et leur rendement en glucose et éthanol (Figure 37).

L'ACP pour le traitement N (Figure 37A) des lignées isogéniques de Trémie montre que le premier axe (39.75%) est essentiellement expliqué par la distribution de la taille des granules d'amidon (Type A : -0.411 ; Type B : 0.411 ; Type C : 0.394) et le second (11.6%) par le rendement en glucose (0.577) et le PMG (0.566). La forme triple nulle de Trémie est éloignée des autres lignées isogéniques et à l'opposé des variables rendement en glucose et éthanol.

L'ACP pour le traitement n- (Figure 37B) révèle un premier axe (39.16%) toujours fortement associé à la distribution de la taille des granules d'amidon et un second axe (24%) expliqué essentiellement par les rendements en glucose (0.541) et éthanol (0.533). Les

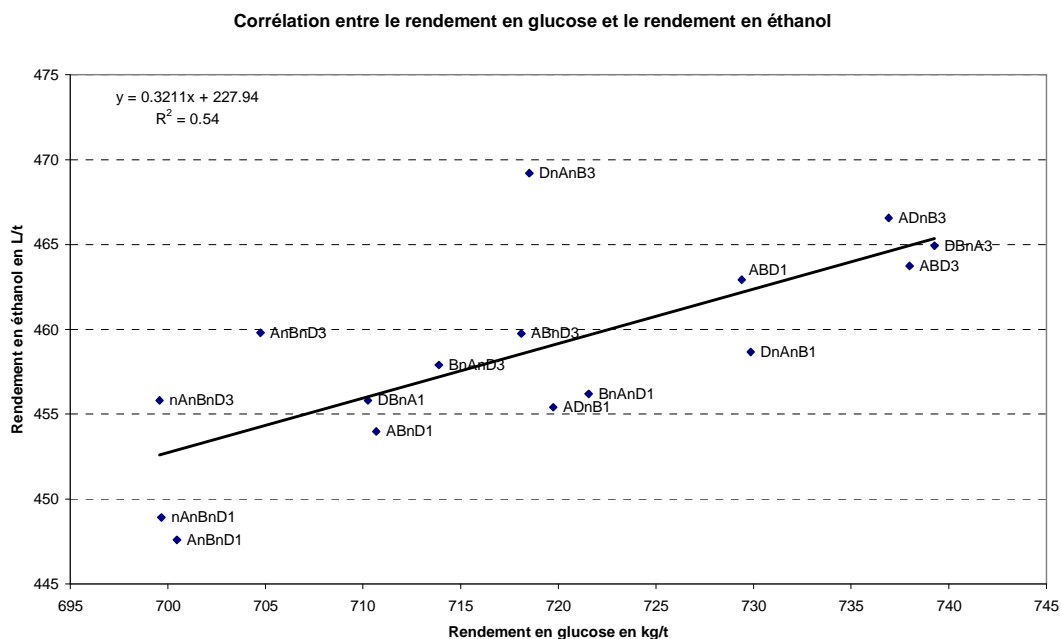
**Tableau 17.** Corrélations linéaires entre les différentes caractéristiques du grain et le rendement en glucose et éthanol pour les lignées isogéniques waxy de Trémie. Le tableau A présente les résultats pour le traitement N (apport normal) et le tableau B présente les corrélations pour le traitement n- (sans troisième apport d'azote).

A

	Lignées isogéniques Waxy ANNEE 3 Traitement N					
	CFD		MOM		SEC	
	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol
ETHANOL	0.8547*	-	0.7538*	-	0.7376*	-
RDT T/Ha	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PMG	ns	ns	0.7489*	0.8223*	ns	ns
PS	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HAGBERG	ns	0.8087*	ns	ns	ns	0.7607*
VISCO R	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PROT	-0.8218*	-0.9007**	ns	-0.7688*	-0.7226*	-0.8083*
DURETE	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEC	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEB	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEA	ns	ns	ns	ns	ns	ns

B

	Lignées isogéniques Waxy ANNEE 3 Traitement n-					
	CFD		MOM		SEC	
	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol
ETHANOL	0.8274*	-	0.9248***	-	0.9028**	-
RDT T/Ha	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PMG	ns	ns	0.8436**	0.9395***	ns	ns
PS	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HAGBERG	ns	ns	0.9205**	0.7709*	ns	ns
VISCO R	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PROT	-0.8193	ns	-0.7722*	-0.8511**	ns	ns
DURETE	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEC	-0.7184*	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEB	-0.8336*	ns	ns	ns	ns	ns
TYPEA	0.8310*	ns	ns	ns	ns	ns



**Figure 38.** Corrélations linéaires entre le rendement en glucose et le rendement en éthanol pour les lignées isogéniques waxy de Trémie. (1 : traitement N ; 3 : traitement n-).

individus triples nuls sont là aussi très éloignés des autres lignées et opposés aux variables de rendement en glucose et éthanol.

## 2.5 Les corrélations avec les rendements en glucose et éthanol

Une analyse de corrélation entre les rendements en glucose et éthanol avec les autres caractéristiques du grain a été réalisée par lieu et par traitement pour les lignées isogéniques de la variété Trémie (Tableau 17 et Figure 38).

Plusieurs corrélations montrées pour les variétés françaises étudiées les deux premières années sont aussi présentes chez les lignées isogéniques waxy. Ainsi les rendements en glucose et en éthanol sont corrélés positivement de manière significative. Pour le traitement avec apport d'azote normal les coefficients sont compris entre 0.738 (lieu SEC) et 0.855 (lieu CFD). Pour le traitement sans troisième apport d'azote, les coefficients de corrélation sont compris entre 0.827 (lieu CFD) et 0.925 (lieu MOM).

L'influence négative du taux de protéines sur les rendements en glucose et éthanol a aussi été mise en évidence pour les deux traitements azotés. Ainsi les coefficients de corrélation avec le rendement en glucose sont compris entre -0.723 et -0.822 pour le traitement N et entre -0.772 et 0.819 pour le traitement n-.

Les autres corrélations mises en évidence, comme pour les variétés françaises, ne concernaient le plus souvent qu'un seul lieu. Ainsi, dans le lieu Momont pour les deux traitements N et n-, le poids de mille grains est corrélé positivement avec le rendement en glucose (0.843 et 0.748) et le rendement en éthanol (0.939 et 0.822).

Enfin notons que pour le traitement sans troisième apport d'azote dans le lieu CFD, le rendement en glucose est corrélé négativement avec les granules de type C et B (<10 $\mu$ m) et positivement avec les granules de type A (>10 $\mu$ m). Cette corrélation uniquement observée dans un lieu et un traitement est pour le moins surprenante. Il est en effet logique d'admettre que plus le volume des petits granules est important plus la surface de ces granules soumise à

l'action des enzymes est importante ce qui facilite la dégradation rapide de l'amidon en sucres simples. Cependant cette corrélation semble montrer le contraire.

## **D. DISCUSSION**

### **1. Les ACP des variétés françaises donnent un aperçu des relations entre les différentes variables et le rendement en éthanol**

#### 1.1 Premier axe : La relation entre la dureté et la taille des granules d'amidon

L'ACP a permis de mettre en évidence que le premier axe était fortement lié à la distribution de la taille des granules d'amidon et à la dureté. Ce résultat, déjà observé (Raeker et al., 1998 ; Capouchova et al., 2003), montre que plus une variété possède un albumen dur plus le pourcentage de volume des granules de type B est important. Ceci peut s'expliquer par la cinétique de croissance des granules d'amidon étudiée par Bechtel et al., (1990). Les premiers granules dans les amyloplastes apparaissent vers 7 jours après la fécondation puis grossissent pour devenir des granules de type A, puis vers 14 jours apparaissent les granules de type B et enfin ceux inférieurs à  $2\mu\text{m}$  (Type C). Pour les variétés dont la dureté est élevée, l'absence d'espace libre dans l'albumen (compacité forte) induit une croissance moindre des granules d'amidon et relativement moins de granules atteignent la taille des granules de type A. Ainsi les granules de petites tailles s'accumulent sans atteindre la taille des grosses granules ( $>10\mu\text{m}$ ) et comblent les espaces cellulaires afin d'avoir un stockage maximal d'amidon.

Cette relation entre la taille des granules et la dureté est aussi observée pour les lignées isogéniques waxy. En effet, la distribution de la taille des granules d'amidon chez les lignées waxy est très différente en fonction de la dureté de la variété dont sont issues ces lignées. Geera et al., en 2006 ont montré que les lignées triples nulles possédaient une quantité de granules de type A bien inférieure à celle observée chez la forme normale. Ces mêmes résultats ont pu être observés chez Soissons (Medium Hard) et Trémie (Hard) mais pas chez

Crousty (Soft). Cette différence de proportion de granules ne concerne donc que les lignées issues des variétés dont la dureté est Médium Hard et Hard.

### 1.2 Deuxième axe : les rendements en glucose et en éthanol, le PMG et le taux de protéines

Le deuxième axe est principalement associé aux variables de rendement en glucose et éthanol, au taux de protéines, au PMG et au rendement à l'hectare. Les relations entre les différentes variables sont logiques puisque l'éthanol est le produit de la fermentation du glucose et que plus le rendement parcellaire en t/ha est important plus la quantité d'amidon est importante. Le vecteur du taux de protéines est opposé à ceux du rendement en glucose et éthanol ce qui paraît aussi logique puisque le taux de protéines dans le grain est inversement proportionnel à la quantité d'amidon.

### **2. Le temps de chute de Hagberg faible chez les lignées isogéniques triples nulles**

Le temps de chute de Hagberg des lignées triples nulles est très faible. Graybosch et al., en 2000 ont montré que les lignées waxy possédaient un temps de chute très faible et que ce phénomène était indépendant de l'activité des  $\alpha$ -amylases dans le grain. Ce temps de chute faible observé chez les trois variétés est certainement relié à la teneur en amylose de l'amidon qui influe sur la viscosité de la pâte lors de la gélatinisation. En effet, Sasaki et al. en 2000 ont montré que le contenu peu élevé en amylose est associé à une viscosité faible de l'amidon gélatinisé. Ce phénomène explique le temps de chute réduit observé pour ces lignées.

### **3. L'effet des allèles des sous unités de gluténines de haut et faible poids moléculaire sur les rendements en glucose et en éthanol**

L'étude des allèles de gluténines de haut et faible poids moléculaire a révélé un effet significatif sur les rendements en glucose et éthanol pour tous les loci excepté le locus *Glu-D3*. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les allèles qui sont habituellement corrélés à une bonne qualité boulangère sont les allèles les moins favorables concernant le rendement en

**Tableau 18.** Identification des variables corrélées et mise en évidence de leurs ordres respectifs pour leur effet sur les rendements en glucose et éthanol.

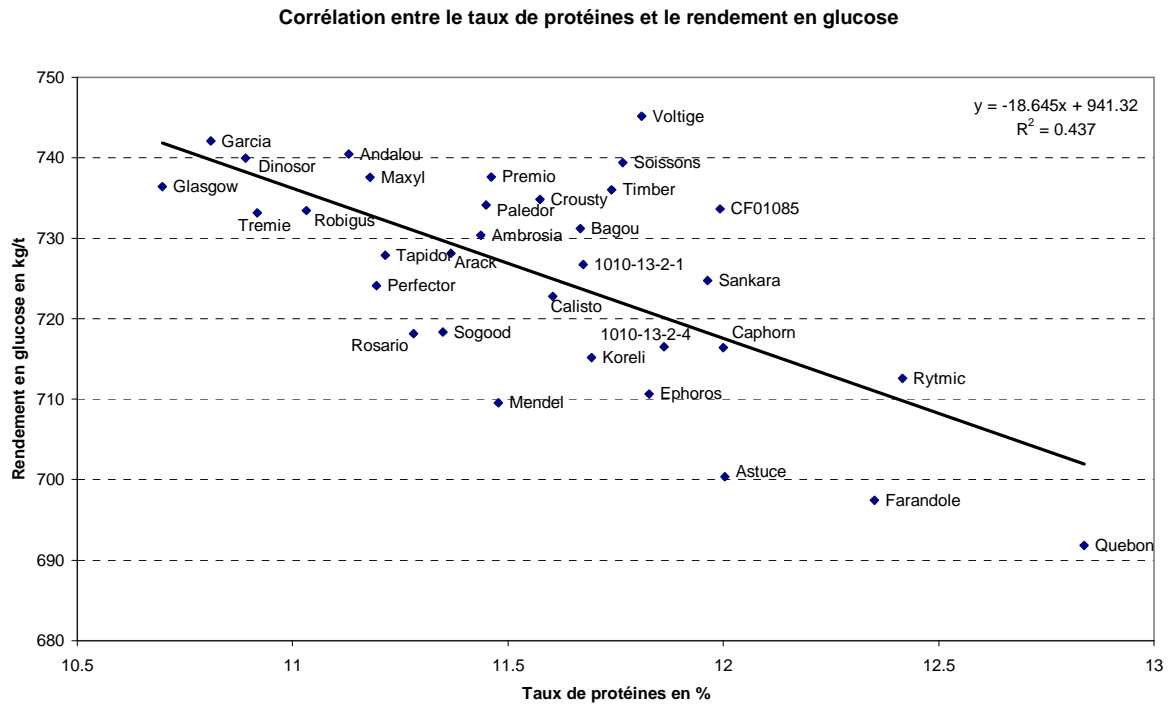
		1	2	3	4
<b>GLUCOSE</b>	$R^2=[0.3472-0.4747]$	Prot [-]	Distribution granules d'amidon	Viscosité [-]	PS [-]
			Type A [-]		Allèles des gluténines
			Type B [+]		
			Type C [+]		
		1	2	3	4
<b>ETHANOL</b>	$R^2=[0.4532-0.5598]$	Prot [-]	Distribution granules d'amidon	Dureté [-]	PS [-]
			Type A [-]		Allèles des gluténines
			Type B [+]		
			Type C [+]		

glucose ou éthanol. Ainsi pour le locus *Glu-A1*, l'allèle nul aboutit à un meilleur rendement en glucose et en éthanol que l'allèle 1. Pour le locus *Glu-B1*, les allèles 7-9 et 17-18 qui sont généralement associés à une bonne qualité boulangère sont, pour les rendements, moins bons. Pour le locus *Glu-D1*, l'allèle 5-10 connu pour être très favorable à la qualité rhéologique est moins bon que l'allèle 3-12, généralement contre sélectionné pour la qualité boulangère (Branlard et al., 2001).

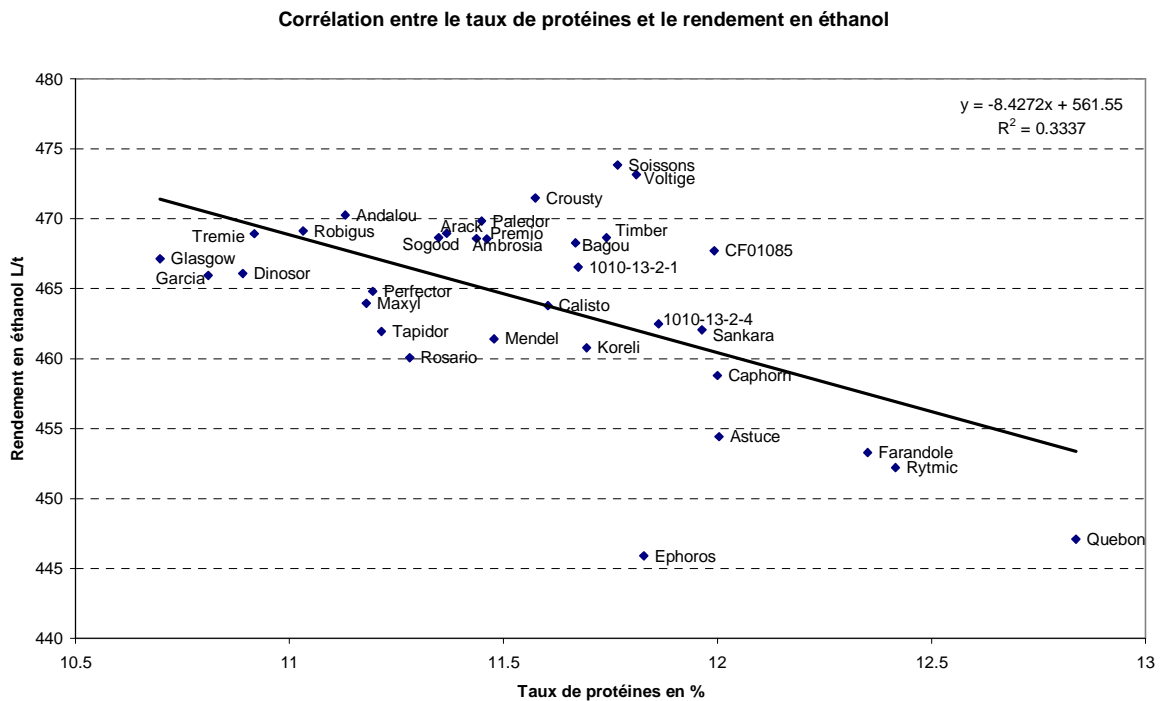
Pour les gluténines de faibles poids moléculaires, le locus *Glu-A3* montre que les variétés possédant l'allèle d (également favorable à la qualité boulangère), ont un rendement en glucose moins élevé que l'allèle nul. Pour le locus *Glu-B3*, l'allèle j provenant de la translocation 1BL/1RS avec le seigle, est connu pour accroître la quantité et la viscosité des pentosanes ; il est le moins intéressant pour le rendement en éthanol. Les allèles c' et g, connus aussi pour accroître la qualité boulangère, sont aussi parmi les allèles conduisant à un rendement faible.

Globalement, les allèles dont l'importance dans la qualité boulangère a été démontrée sont ceux conduisant aux rendements en glucose et éthanol les plus faibles. Cependant, bien que la part expliquée par ces allèles à chacun des loci ( $R^2$  de 14.5 à 16.5%) soit faible, l'effet de la composition allélique sur le rendement en glucose et éthanol est indépendant et complémentaire de celui causé par le taux de protéines. Ainsi la présence d'allèles des gluténines défavorables à la qualité boulangère, c'est-à-dire offrant des polymères de moindre importance est à rechercher dans les blés destinés à la production d'éthanol. L'abondance de ces polymères est linéairement dépendante du taux de protéines (Martre et al., 2006), lequel est fortement associé à la nutrition azotée.

A



B



**Figure 39.** Corrélations négatives entre le taux de protéines et les rendements en glucose (A) et en éthanol (B) pour les variétés françaises sur les valeurs moyennes multilocales.



#### **4. Les caractéristiques du grain corrélées aux rendements en glucose et en éthanol**

Les corrélations simples, les analyses en composantes principales, et une analyse par régressions multiples ont permis de mettre en évidence quels étaient les principaux critères associés à des rendements en glucose et éthanol élevés (Tableau 18).

La régression multiple pour les rendements en glucose et éthanol fait ressortir systématiquement le taux de protéines comme premier caractère explicatif (Figure 39). Ceci a déjà été rapporté (Smith et al., 2006 ; Kindred et al., 2008) et ce phénomène s'explique du fait que le taux de protéines est inversement proportionnel au contenu en amidon dans le grain de blé. L'amidon étant le constituant qui va être transformé en sucre puis en éthanol. Il est donc logique que le taux de protéines soit corrélé négativement aux rendements.

Le deuxième caractère le plus important révélé par l'analyse de régression multiple est la distribution de la taille des granules d'amidon. Les granules de type A ( $>10\mu\text{m}$ ) influencent négativement les rendements en glucose et éthanol alors que les granules de type C et B sont corrélés positivement à ces rendements. Ce résultat paraît aussi logique car plus la quantité de petits granules est importante plus la surface des granules d'amidon sujet à l'hydrolyse enzymatique est importante et par conséquent le rendement de l'hydrolyse amélioré.

Deux caractères différents pour chacun des deux rendements ont été mis en évidence par la régression multiple. Ainsi, pour le rendement en glucose, une viscosité élevée des pentosanes hydrosolubles a une influence négative. Ceci semble logique car l'hydrolyse enzymatique est généralement plus efficace dans un milieu où la viscosité est faible. Le troisième critère mis en évidence pour le rendement en éthanol est la dureté qui est corrélée négativement. Ceci pourrait paraître en complète contradiction avec le deuxième critère qui concerne la distribution de la taille des granules d'amidon. En effet, l'étude réalisée sur les trente variétés françaises a mis en évidence que la dureté est corrélée positivement avec les

granules de petites tailles. Ceci est donc contradictoire avec le résultat de l'analyse des régressions multiples. Cependant cette corrélation n'est pas illogique car une variété possédant une forte dureté possède une granulométrie plus élevée de ses broyats de mouture et donc une moindre facilité d'hydrolyse enzymatique. Cette contradiction entre ces deux caractères afin d'obtenir un rendement élevé en éthanol, met en évidence la difficulté de trouver une variété réunissant ces deux conditions (nombreuses granules de petites tailles et dureté faible) qui n'existent pas au sein d'un même génotype de blé. Il serait donc nécessaire de privilégier les cultivars qui se situent au dessus de la relation positive entre la proportion des granules de petite taille (type B et type C) et la dureté et qui soient de type soft.

Le dernier critère révélé par la régression multiple est le poids spécifique qui est corrélé négativement aux rendements en glucose et éthanol. Le poids spécifique représentant le poids d'un hectolitre de grain peut être relié soit à la densité du grain soit à la taille des grains. Un poids spécifique élevé signifie soit une densité du grain plus importante qui influe sur sa compacité et par conséquent sur la granulométrie de sa mouture et sa facilité d'hydrolyse, soit une taille des grains plus petite, diminuant ainsi les espaces vides dans le volume de mesure.

Swanston et al. en 2007 ont montré que le rapport longueur/largeur du grain est corrélé négativement au rendement en éthanol. Ceci confirme que plus un grain est petit (longueur/largeur élevé), plus le rendement en éthanol est faible et coïncide avec un poids spécifique élevé.

### **5. Les lignées waxy de Trémie et le rendement en glucose**

L'analyse des lignées isogéniques waxy de Trémie a permis de montrer que la lignée triple nulle possédait le rendement en glucose le plus faible. Ceci est surprenant car cette lignée possède une quantité de granules de type B plus importante que la lignée normale. La

lignée triple nulle devrait donc posséder un rendement en glucose plus important que pour la lignée normale.

D'autres études ont rapporté des résultats similaires. En effet Zhao et al., en 2009 ont montré que les variétés waxy possédaient un rendement plus faible que les variétés normales. L'étude des rendements en glucose et en éthanol, réalisée avec les lignées waxy de la variété Trémie, a montré une faible amplitude des résultats. Il conviendra d'étudier ces rendements en glucose et éthanol pour les lignées isogéniques waxy des variétés Soissons et Crousty afin de confirmer l'effet des trois allèles nuls sur ces rendements.

## **6. Brève conclusion**

L'étude multilocale et pluriannuelle a mis en évidence des caractères ayant un effet sur le rendement en glucose et éthanol déjà décrits comme le taux de protéines, mais aussi d'autres caractéristiques comme la taille des granules d'amidon, la viscosité et la dureté. Par ailleurs, l'idéotype réunit des caractères qui d'après l'analyse des corrélations ne coexistent pas au sein d'une même variété. Il conviendra donc ultérieurement de rechercher des variétés réunissant prioritairement ces différents caractères : faible taux de protéines, proportion de granules de type B et C élevée et dureté faible. Parmi les variétés réunissant ces différents critères, celles possédant des allèles défavorables à la qualité boulangère et possédant une faible viscosité des pentosanes devraient avoir les meilleurs rendements en glucose et éthanol.

La relation entre les lignées isogéniques waxy de Trémie et les rendements en glucose et éthanol n'a pas mis en évidence un réel effet des allèles nuls des gènes waxy. L'analyse des autres lignées issues de Soissons et Crousty devrait permettre de préciser ces constatations.

## **IV. PRINCIPE DE L'ANALYSE PROTÉOMIQUE**

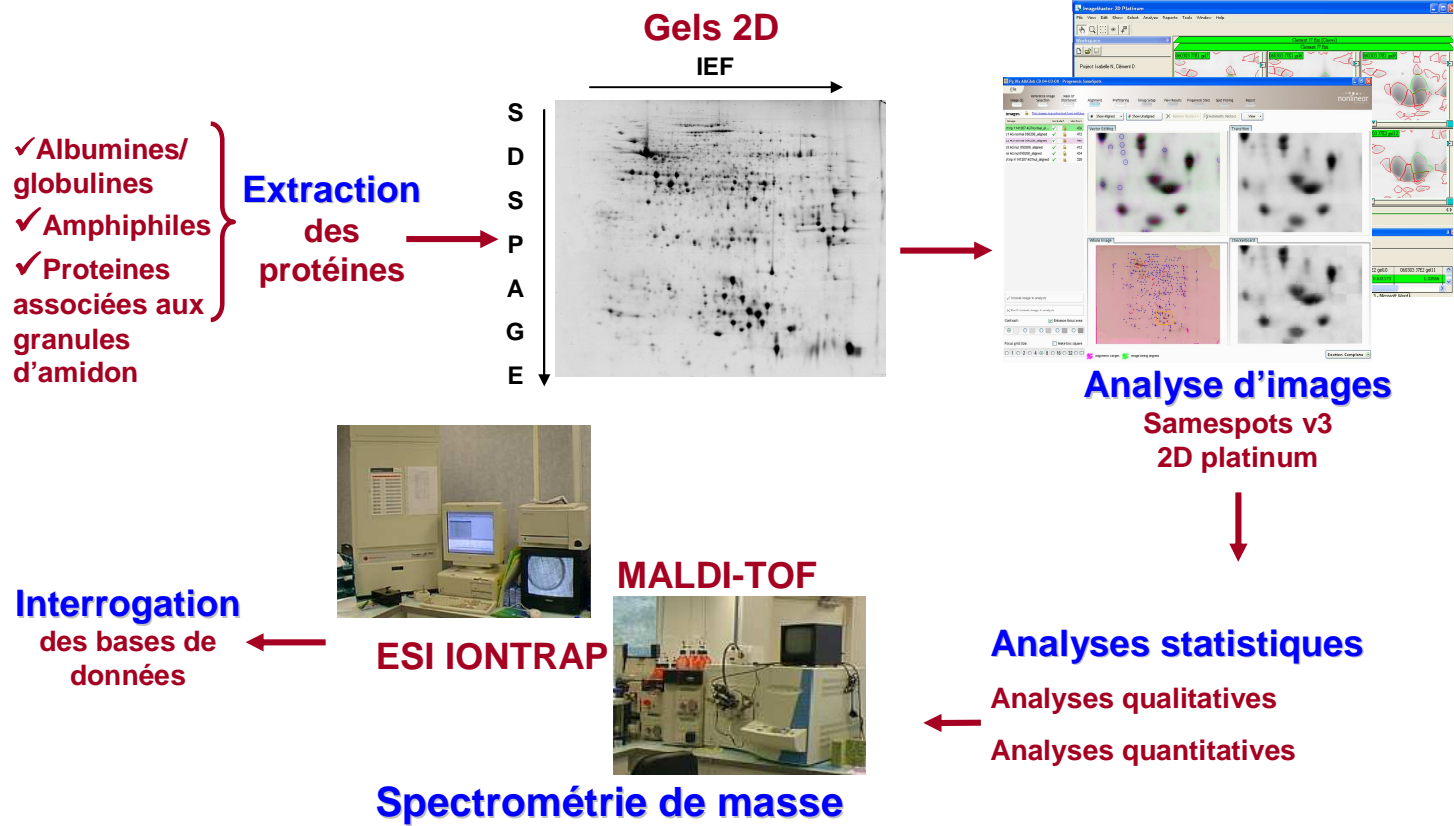


Figure 40. Principales étapes de l'analyse protéomique

Les principes généraux de l'approche protéomique sont décrits ci-dessous. Les méthodes utilisées sont quant à elles détaillées dans les articles (p 86-89 et p 110-113).

## **A. DÉFINITION**

Au même titre que l'ensemble des gènes d'un organisme constitue son génome et l'ensemble des ARN son transcriptome, l'ensemble des protéines constitue son protéome. Ce terme, défini en 1995 par Wilkins et al., désigne l'ensemble des protéines exprimées dans un organisme, dans un tissu ou dans une cellule à un moment donné. Le protéome possède la particularité de changer en permanence au cours de la vie d'une cellule et varie énormément en fonction des changements environnementaux ou des stress que subissent les organismes.

L'analyse protéomique permet d'étudier l'expression des protéines d'un point de vue qualitatif (présence/absence) et quantitatif (augmentation ou diminution de l'expression). Elle permet aussi d'identifier ces protéines et de déterminer leur fonction.

## **B. PRINCIPALES ÉTAPES DE L'ANALYSE PROTÉOMIQUE**

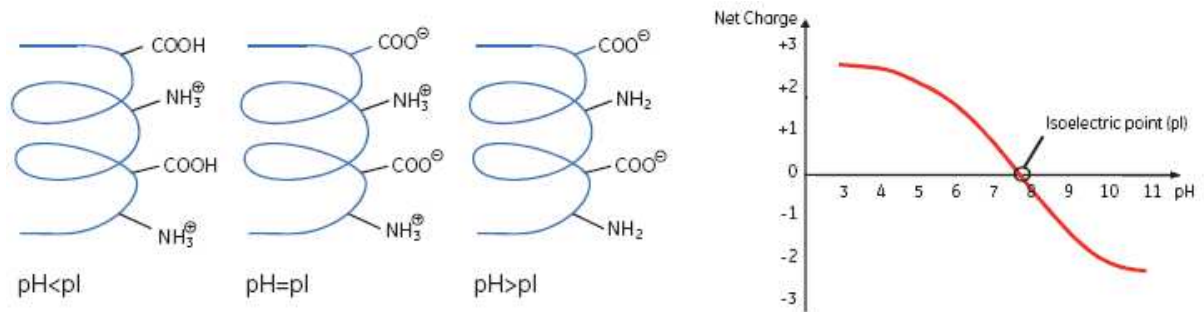
L'électrophorèse bidimensionnelle (E2D), définie pour la première fois par O'Farrell en 1975, permet de séparer les protéines après leur extraction et solubilisation dans des détergents non-ioniques et zwitterioniques. Comparativement aux techniques de chromatographie, l'E2D est encore la méthode la plus largement utilisée dans l'analyse protéomique pour séparer de très nombreuses protéines (Rabilloud et al., 2010). Les protéines une fois extraites sont séparées selon leur point isoélectrique (première dimension) et leur poids moléculaire (deuxième dimension) sur gel d'acrylamide. Ces gels sont ensuite colorés et analysés à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image qui permet de comparer les images entre elles et de déterminer avec précision les variations qualitatives et quantitatives des spots protéiques. Les spots d'intérêt sont ensuite excisés afin d'être identifiés par spectrométrie de masse et interrogation des bases de données (Figure 40).

### **1. Extraction et solubilisation des protéines**

Après broyage du matériel, les protéines sont extraites dans un tampon dépendant de la classe de protéines à étudier. Ainsi les albumines et globulines sont extraites dans un tampon salin et les protéines amphiphiles dans un détergent (Triton X114).

Les protéines sont ensuite solubilisées dans une solution contenant :

- du CHAPS qui est un détergent zwitterionique assurant la solubilisation par rupture des interactions hydrophobes.



**Figure 41.** Evolution de la charge nette d'une protéine en fonction du pH du milieu dans lequel elle se situe. L'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses correspond au point isoélectrique de la protéine. (GE Healthcare, 2004)

- de l'urée qui est un agent chaotrope. Ce dénaturant neutre est très efficace pour rompre les liaisons hydrogènes.
- du thiourée qui est aussi un agent chaotrope améliorant la solubilisation des protéines.
- du DTT qui est un réducteur capable de rompre les ponts disulfures
- de l'Immobiline pH gradient (IPG) qui permet de minimiser les agrégats causés par les liaisons électrostatiques
- des antiprotéases qui vont limiter la dégradation des protéines par des protéases lors de la solubilisation des protéines.

## 2. Le dosage des protéines

Le but de l'approche protéomique est de pouvoir comparer le niveau d'expression de protéines de manière qualitative (présence/absence) et quantitative. Afin de pouvoir effectuer ces comparaisons de manière précise, il convient de déposer la même quantité de protéines sur tous les gels bidimensionnels. Il est donc nécessaire de connaître la concentration de protéines présentes dans les extraits à comparer.

Le dosage des protéines est souvent réalisé à l'aide du bleu de Coomassie (Bradford, 1976) qui a la capacité de former des complexes avec les protéines présentes en solution. Les complexes induisent un changement de l'absorption du colorant à 595nm de manière linéaire dans une gamme allant de 0.1 à 1.4 mg/mL de protéines. Ces mesures se font à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec un standard tel que la BSA (bovine serum albumin).

## 3. L'électrophorèse bidimensionnelle

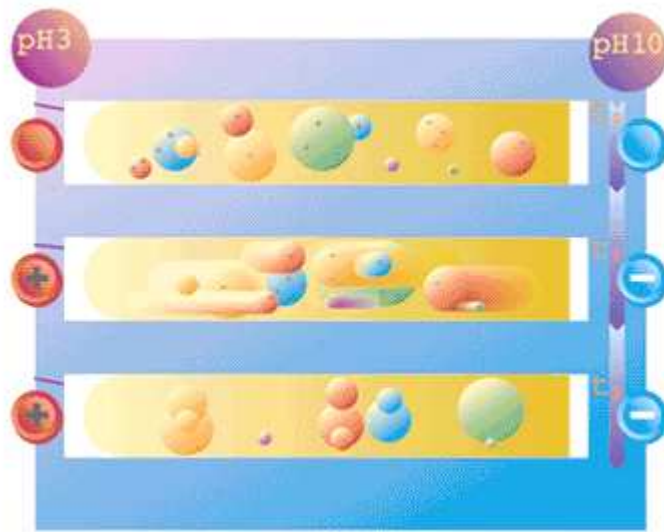
Les protéines sont ensuite séparées selon deux caractéristiques qui leur sont propres :

- leur point isoélectrique (pI) pour la première dimension
- leur poids moléculaire (PM) pour la seconde dimension

### 3.1 La première dimension : l'électrofocalisation

L'électrofocalisation permet la séparation des protéines selon leur point isoélectrique. Les protéines sont des molécules « amphotères », c'est-à-dire portant à la fois des charges négatives et positives. Selon le pH du milieu dans lequel elles se situent, ces protéines possèdent une charge nette positive, neutre ou négative. Ainsi les protéines sont chargées positivement dans un milieu où le pH est inférieur au point isoélectrique de la protéine et négativement dans un milieu où le pH est supérieur au point isoélectrique (Figure 41).





**Figure 42.** Principe de l'électrofocalisation (1ère dimension) : les protéines sous l'effet d'un courant électrique se déplacent sur le gradient de pH afin d'atteindre l'endroit où leur charge nette sera nulle.



**Figure 43.** Principe de l'électrophorèse SDS-PAGE (2ème dimension) : les protéines sous l'effet d'un courant électrique migrent dans un gel SDS-PAGE selon leurs poids moléculaires.

L'électrofocalisation est réalisée sur des bandelettes d'acrylamide de quelques millimètres de largeur et de longueurs variables (strip). Un gradient de pH est créé sur ce gel d'acrylamide par incorporation de molécules « immobilines » possédant des groupements acides et basiques. Sous l'effet d'un courant électrique, les protéines déposées sur cette bandelette vont migrer jusqu'à atteindre la position où leur charge nette est nulle (Figure 42).

Une fois l'électrofocalisation réalisée, les protéines présentes sur la bandelette d'acrylamide sont réduites puis alkylées. Cette étape est l'équilibration. Les protéines, sous l'effet du SDS vont former des complexes anioniques conduisant à une uniformisation des charges des protéines présentes sur le strip.

L'équilibration se fait en deux temps

- un premier bain des strips dans une solution contenant de l'urée, du glycérol, du SDS et du DTT
- un second bain dans une solution où le DTT est remplacé par un alkylant (iodoacétamide)

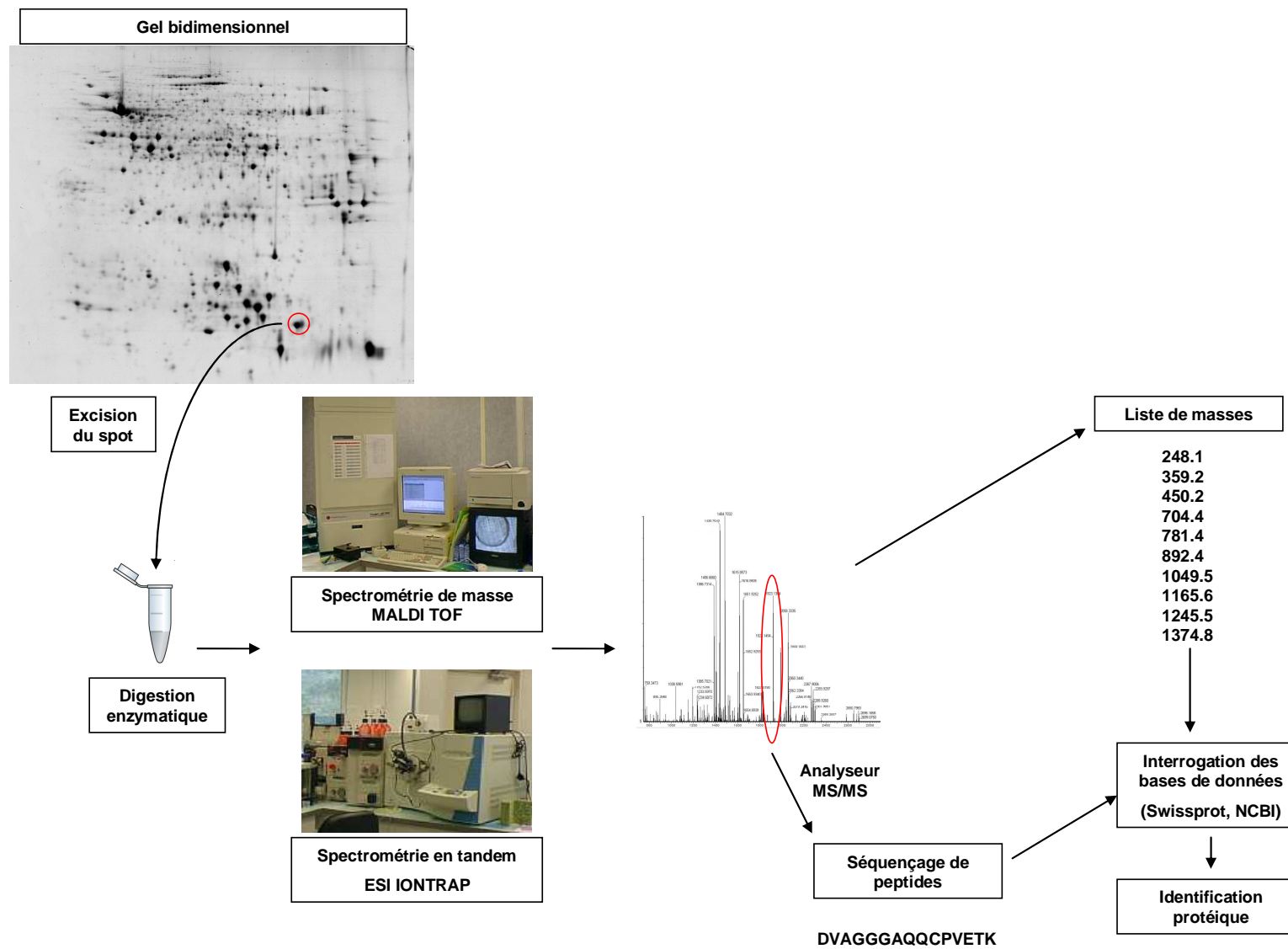
### 3.2 La deuxième dimension : l'électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) permet une séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire sous l'effet d'un champ électrique (Figure 43). Cette migration s'effectue en milieu dénaturant (SDS) sur gel de polyacrylamide.

## 4. La coloration des gels

La révélation des protéines se fait par coloration. Il existe plusieurs types de colorations qui diffèrent principalement selon le seuil de détection et la linéarité entre l'intensité de la coloration et la quantité de protéines présente sur le gel.

Les colorations les plus utilisées sont le bleu de Coomassie et le nitrate d'argent. La limite de détection des protéines avec le bleu de Coomassie est de 100ng (Neuhoff et al., 1988). Cette coloration possède l'avantage d'avoir une très bonne linéarité entre la quantité de protéines présente sur le gel et l'intensité de la coloration. La coloration au nitrate d'argent permet quant à elle de détecter des quantités beaucoup plus faibles de protéines avec une limite de détection à 0.1ng. Cependant cette coloration n'est pas aussi linéaire que celle du bleu de Coomassie et est peu souhaitable dans le cas d'une analyse des protéines par



**Figure 44.** Principales étapes conduisant à l'identification protéique par l'utilisation de la spectrométrie de masse.

spectrométrie de masse.

D'autres colorations existent, utilisant des colorants fluorescents comme le Sypro Ruby ou le Deep purple. Ces colorations présentent l'avantage d'avoir un seuil de détection des protéines plus faible que celui de la coloration au bleu de Coomassie (à partir de 1ng) tout en gardant une bonne linéarité entre la quantité de protéines et l'intensité de fluorescence.

### **5. L'analyse d'image**

Une fois les gels colorés, ils sont scannés puis les images ainsi obtenues sont analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Samespot nonlinear, 2D platinum). Ces logiciels permettent de comparer des images et d'effectuer des analyses statistiques précises permettant de comparer l'expression des protéines entre les différents gels de l'analyse.

Généralement, une analyse de variance ANOVA est réalisée et permet de déterminer les variations quantitatives des spots protéiques entre les différentes conditions étudiées. Ces spots peuvent ensuite être excisés afin d'être identifiés par spectrométrie de masse.

### **6. L'identification des protéines par spectrométrie de masse**

Les spots protéiques d'intérêt sont ensuite excisés du gel, décolorés, puis subissent une digestion enzymatique. Les peptides obtenus sont ensuite analysés par spectrométrie de masse afin de permettre l'identification de la protéine dont ils sont issus (Figure 44).

#### **6.1 L'ionisation des échantillons**

Plusieurs types de spectromètres de masses existent reposant principalement sur deux types d'ionisation :

- L'ionisation MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) qui repose sur l'utilisation d'une matrice. Cette matrice va permettre l'absorption d'énergie apportée par un laser. Les échantillons à identifier sont cristallisés au sein de la matrice puis un faisceau laser va percuter le cristal provoquant une désorption des molécules de l'échantillon et de la matrice. Lors de cette désorption, un transfert de proton de la matrice vers les molécules de l'échantillon se produit, aboutissant à la formation d'ions chargés.
- L'ionisation ESI (Electrospray Ionization) qui repose sur l'émission en phase gazeuse d'ions préformés en solution sous l'effet d'un champ électrique. Les molécules chargées sont introduites dans un capillaire et sous l'effet d'un champ électrique intense, une émission de gouttelettes chargées va avoir lieu. Ces

gouttelettes sont ensuite évaporées ce qui va permettre d'augmenter leur concentration en charge. Ces gouttelettes sous l'effet de la répulsion des charges positives vont éclater pour libérer des ions individuels chargés.

### 6.2 L'analyse des ions chargés

Les ions chargés sont ensuite séparés dans un analyseur en fonction de leur rapport m/z (masse / charge). Généralement les ions chargés par MALDI sont ensuite analysés à l'aide d'un analyseur de type pulsé selon leur temps de vol (TOF : time of flight). La mesure de ce temps permet de déterminer une liste de masses des peptides présents dans l'échantillon (peptide mass fingerprinting). Les analyseurs de type continu sont quant à eux associés à des sources ESI.

Il est possible d'associer plusieurs analyseurs montés en série (MS/MS) ce qui permet d'isoler et d'analyser un ion parent pour ensuite le fragmenter et mesurer les masses peptidiques des ions fils. Ceci permet de déterminer la séquence en acides aminés d'un peptide particulier grâce à la fragmentation au niveau des liaisons peptidiques.

### 6.3 L'analyse des banques de données

Les données obtenues (liste de masses et/ou séquence en acides aminés des peptides de l'échantillon) sont ensuite analysées et comparées à celles présentes dans les banques de données (notamment NCBI, uniprot). Les listes de masses obtenues expérimentalement sont comparées à l'aide d'algorithmes aux listes de masses théoriques des peptides obtenues par digestion *in silico* des protéines présentes dans les bases de données. La même procédure est utilisée dans le cas des comparaisons de séquences en acides aminés avec les séquences protéiques présentes dans les bases de données.

Les algorithmes de comparaisons établissent alors un score pour chaque protéine candidates ce qui permet de les classer. En fonction du score obtenu et en tenant compte d'autres critères (organisme, pourcentage de recouvrement, nombre de peptides identifiés, pI et PM théoriques, précisions des mesures), il est alors possible de déterminer à quelle protéine le spot protéique préalablement excisé correspond.

Cependant, la complexité des systèmes biologiques ne repose pas uniquement sur l'expression des gènes codant pour les protéines mais aussi sur leur quantité, leur modification post traductionnelles, ainsi que les différentes interactions existant entre ces protéines.

## **Introduction à la première étude du protéome des lignées waxy**

L'analyse des lignées isogéniques waxy a montré que la présence des trois allèles nuls diminuait les rendements en éthanol et glucose. Cependant plusieurs études ont montré que le taux de conversion de l'amidon en éthanol dans ce type de lignées était meilleur que celui observé pour les variétés normales. Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de la quantité des granules de petites tailles observée chez les lignées triples nulles. En effet, l'efficacité de la gélatinisation de l'amidon et sa transformation en sucre par les enzymes sont meilleures lorsque les granules sont plus petits.

Les trois gènes *waxy* responsables de la formation d'amylose dans le grain de blé codent pour les granules bound starch synthases. La présence d'un, deux ou trois allèles nuls modifie le taux d'amylose dans le grain de blé qui varie entre 28% pour les formes normales à presque 0% pour les formes triples nulles. Ces changements importants de la composition de l'amidon se traduisent par des modifications au niveau de la voie métabolique des sucres et de l'amidon qu'il convient d'étudier pour comprendre leur effet sur le rendement en éthanol.

L'article suivant présente deux analyses protéomiques de lignées isogéniques waxy possédant un, deux ou trois allèles nuls pour ces gènes. L'effet de ces allèles a été observé sur deux fractions de protéines regroupant la majorité des enzymes intervenant dans les voies métaboliques de l'amidon et des sucres. Tout d'abord les albumines et globulines, puis les protéines amphiphiles ont été étudiées par approche protéomique, ce qui a permis de révéler des changements de l'expression d'enzymes de la voie métabolique des sucres mais aussi des enzymes de stress et de défense.

Peu d'enzymes ont été révélées comme significativement variantes entre les formes isogéniques et la forme normale de Trémie pour les deux fractions protéiques étudiées. Seulement 60 varient sur les 1852 observées pour la fraction albumines globulines et 20 sur un total de 1298 pour la fraction amphiphiles. Parmi ces protéines variantes, plusieurs sucroses synthases ont été augmentées et une sous unité de l'AGPase diminuée chez toutes les formes isogéniques waxy. L'expression de plusieurs serpinines et HSP a aussi été diminuée chez les formes isogéniques waxy. Toutes ces différences ont permis d'apporter des précisions quant aux régulations de la voie de biosynthèse de l'amidon ayant lieu chez les individus possédant un ou plusieurs allèles nuls des GBSS.

Peu de différences ont été observées entre les sept formes partiellement ou totalement waxy. La présence d'un, deux, ou trois allèles nuls semble aboutir aux mêmes régulations chez toutes les formes isogéniques.

**V. ANALYSES PROTÉOMIQUES DES ALBUMINES,  
GLOBULINES ET PROTÉINES AMPHIPHILES DES  
LIGNÉES ISOGÉNIQUES WAXY**

**Analyses of albumins, globulins and amphiphilic proteins by proteomic approach give new insights on waxy wheat starch metabolism\*\***

Clément Debiton<sup>1</sup>, Marielle Merlino<sup>1</sup>, Christophe Chambon<sup>2</sup>, Emmanuelle Bancel<sup>1</sup>, Mélanie Decourteix<sup>3</sup>, Véronique Planchot<sup>4</sup> and Gérard Branlard<sup>1\*</sup>

1-INRA UMR-1095, 234 avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France

2-INRA UR-370 PFEM-Plateau Protéomique, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

3-PIAF UMR-547, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière, France

4-INRA Unité Biopolymères Interactions Assemblages, 44316 Nantes, France

Corresponding Author (\*): Gérard Branlard

**Keywords:** Starch metabolism, waxy, bi-dimensional electrophoresis, *Triticum aestivum*

**Abbreviations:** 2DE: 2-dimensional electrophoresis; AGPase: ADP-Glucose pyrophosphorylase; DArT: diversity arrays technology; DW: dry weight; GBSS: granule bound starch synthase; NIL: near isogenic lines; PVPP: polyvinylpyrrolidone; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Susy: Sucrose synthase; TKW: thousand kernel weight; Wx: waxy

**\*\* Article proposé dans Journal of Cereal Science (en révision)**



## A. ABSTRACT

Starch is composed of two types of glucose polymers: amylose and amylopectin. The *Waxy* (*Wx*) locus controls amylose synthesis in the wheat kernel. Hexaploid wheat has three *Wx* loci located on chromosomes 7A (*Wx-A1*), 4A (*Wx-B1*), and 7D (*Wx-D1*). Eight near isogenic lines (NILs) of *Triticum aestivum* cv. Tremie with one, two or three *Wx* null alleles were used. The albumin-globulin fraction, and amphiphilic proteins were separated using 2-dimensional electrophoreses (2DE) allowing the changes in the waxy kernel to be identified. Albumin-globulin fraction showed overexpression of sucrose synthases in the waxy NILs compared to the normal form of Tremie and a decrease in many proteins related to stress and defence metabolism such as serpins. A subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), which is known to play a major role in the starch synthesis, was also shown to be down-regulated in the waxy NILs. Amphiphilic proteins confirmed the observations made on the albumin-globulin fraction with a decrease in a stress-related protein. These different regulations linked to observations made on wheat kernel (thousand kernel weight (TKW), protein amount per grain, size and distribution of the starch granules) led to formulate the hypothesis that waxy endosperm does not reach maturity of the wild-type endosperm.

## B. INTRODUCTION

Wheat is the most widely-grown cereal in Europe and the second in the world after rice. Wheat starch is composed of approximately 28% amylose and 72% amylopectin, and is the major component of the grain representing 72% of grain weight (Buléon et al., 1998). In wheat grains, amylose content depends on the expression of the *waxy* genes: *Wx-A1*, *Wx-B1* and *Wx-D1*, which code for the granule bound starch synthase (GBSS) (Murai et al., 1999). These three genes are located on the short arm of the chromosome 7A, the long arm of the chromosome 4A, and the short arm of the chromosome 7D respectively (Yamamori et al., 1994). Amylose free starches have been created by introgression of null forms for each of the three *waxy* alleles in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) (Nakamura et al., 1995) and their effect on starch composition and flour properties was reported (Yamamori and Quynh, 2000; Graybosch et al., 2003).

Understanding the mechanism involved in the synthesis of wheat starch granules still remains an important objective of wheat research and proteomic analysis of the amyloplast has been reported (Balmer et al., 2006; Dupont, 2008). Near isogenic lines of hexaploid waxy wheat for each of the three *waxy* null alleles (*Wx-A1b*, *Wx-B1b* and *Wx-D1b*) have been created in the agronomic cultivar Tremie using the Kanto 107 wheat, which lacks the *Wx-A1* and *Wx-B1* proteins, and Bai Huo partially waxy wheat, which lacks the *Wx-D1* protein. The analysis of the response of the genome to the introduction of the three *waxy* null alleles may provide an opportunity to understand the mechanism associated with starch synthesis in wheat, notably amylose synthesis.

In the present study, proteomic analysis was used to analyze the albumin-globulin fraction and amphiphilic proteins in NILs with one, two or three *waxy* genes in the cultivar Tremie. These genetic responses have never been analyzed by proteomic analysis in the wheat endosperm. Most enzymes that occur in the endosperm belong to the albumin-globulin

**Table 19.** Name and allelic composition of the eight different isogenic lines for each of the three waxy null alleles in the french wheat cultivar Tremie.

	Name	Allelic Composition		
		Wx-A1	Wx-B1	Wx-D1
Normal form	ABD	a (+)	a (+)	a (+)
Single null form	AB nD	a (+)	a (+)	b (-)
	AD nB	a (+)	b (-)	a (+)
	DB nA	b (-)	a (+)	a (+)
Double null form	A nBnD	a (+)	b (-)	b (-)
	B nAnD	b (-)	a (+)	b (-)
	D nAnB	b (-)	b (-)	a (+)
Triple null form	nAnBnD	b (-)	b (-)	b (-)

fraction or are amphiphilic proteins. Several proteomic approaches have been successfully used to analyze the albumin-globulin proteins, which are water and salt-water soluble (Vensel et al., 2005; Merlino et al., 2009). This group of proteins is highly diversified due to their physicochemical properties in terms of amino acid composition, isoelectric point and molecular mass. They are involved in grain formation and in the accumulation of endosperm storage proteins and starch (Vensel et al., 2005). Amphiphilic proteins are detergent-soluble membrane proteins and were also studied using the same proteomic approach (Amiour et al., 2002). Most of amphiphilic proteins are lipid binding proteins and some of them are strongly linked to technological applications such as dough foaming properties. Proteomic analysis of these two groups of proteins was performed to understand the physiological response to the presence of *waxy* alleles compared to the normal form in the synthesis of endosperm starch. Albumin-globulin and amphiphilic proteins contain the major enzymes present in the grain and allow the description of the main events of the different metabolism pathway.

## C. EXPERIMENTAL

### 1. Plant material

A waxy hexaploid wheat was created using the partially waxy mutant Kanto 107 (K107), which lacks the *Wx-A1* and *Wx-B1* proteins and Bai Huo, which lacks the *Wx-D1* protein (Nakamura et al., 1995). These two hexaploid partially waxy wheats were used as progenitors to create eight NILs with null alleles at either one, two or three loci of the *waxy* genes in the French cultivar Tremie (Table 19). BC2 and BC3 were assisted with 36 SSR and 972 diversity arrays technology (DArT) markers (Pty Ltd, Yarralumla, Australia) to increase the isogenicity of each NILs with the remnant Tremie parent. The different NILs had reached from 96 to 99% of isogenicity. The BC3 lines were grown in soil in greenhouse conditions in 2008 with controlled temperature, day/night normal light,

fertilizer plus full fungicide protection. Four plants for each NILs of Tremie were grown and harvested individually. We used mature grains of the BC3 self-pollinated NILs of Tremie for the three *waxy* null alleles to perform proteomic analyses of two protein fractions of the endosperm: the albumin-globulin fraction and amphiphilic proteins. The embryos were manually excised from the grain before the milling process. The absence of the *waxy* protein at either one, two or three locus was confirmed using SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) for the eight NILs.

## **2. Protein extraction**

Albumin-globulin fraction and amphiphilic proteins were extracted three times for each of the eight NILs and two gel replicates were run for each extract. This way 48 2DE were made for the albumin-globulin fraction and 48 for the amphiphilic proteins.

### 2.1 Albumins-globulins extraction

Albumins and globulins were extracted from 250 mg of wholemeal flour of wheat kernels whose embryo were handily removed. The kernels were ground in a Cyclotec® mill 1093 (Foss electric, Hilleröd, Denmark). Albumins and globulins were extracted in a saline solution (Phosphate 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7.8, 4°C) supplemented with a protease inhibitor cocktail for plant cell and tissue extracts P9599 (Sigma, St Louis, MO, USA). The supernatant containing albumins and globulins was separated from the pellet, which was retained for amphiphilic extraction. Albumins and globulins were precipitated with ice-cold acetone and the pellet was washed several times with acetone before drying.

### 2.2 Amphiphilic proteins extraction

The amphiphiles were extracted from the pellet after extraction of the albumin-globulin fraction. The amphiphilic proteins were solubilized using Tris Triton X114 buffer (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.25 M, EDTA 5 mM, Triton X114 2% (v/v), pH 7.8, 4°C)

supplemented with the antiprotease cocktail (Sigma, St Louis, MO, USA), according to Amiour et al. (2001). After stirring and centrifugation, the supernatant was warmed for 30 minutes at 37°C for phase partitioning. The detergent rich phase was precipitated overnight in a solution of diethylether and ethanol 1/3 v/v at -20°C. The precipitate was washed three times with 5 mL of diethylether/ethanol solution and twice with 5 mL of ice-cold diethylether to remove detergent, lipids and salts.

The different fractions were solubilized in a buffer (CHAPS 4% (w/v), Urea 7 M, Thiourea 2 M, IPG buffer pH 3-11 NL 1% (v/v) and DTT 70 mM), before isofocusing.

The protein concentration of the different fractions was measured using Bradford protein assay (Sigma, St Louis, MO, USA).

### **3. Bi-dimensional electrophoresis**

Twenty-four cm long immobiline strips (pH 3-11 NL) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) were first rehydrated overnight at room temperature with 450 µl of rehydration solution (CHAPS 4% (w/v), Urea 7 M, thiourea 2 M, IPG buffer (pH 3-11 NL) 1% (v/v), Destreak reagent (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 12µl/mL). Protein extracts weighing 150 µg were deposited on the strip using cup loading with sample cups for manifold Ref:80649895 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), allowing a good separation without any streaking on the basic side of the 2D-gels. Isofocusing was carried out at 20°C until 90 kV-hour with an Ettan IPGphor 2 unit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). After pH equilibration for 15 min in a solution of Urea 6 M, Tris-HCL 50 mM at pH 8.8, glycerol 30% (v/v) and SDS 2% (w/v) containing 1% of DTT (w/v), the proteins were alkylated for 15 min in the same solution containing 2.5% of iodoacetamide (w/v). The strips were deposited on SDS-Polyacrylamide gel with the following parameters (T=14%, C=2.1%) for albumin-globulin and amphiphilic fractions. Gels were stained overnight with colloidal Coomassie brilliant blue G250.

#### **4. Image analysis**

For each of the eight NILs, two replicates of three extracts were performed for the albumin-globulin and amphiphilic fractions. Gels were scanned using GS-800 scanner and Quantity one software (Biorad, Richmond, VA, USA). Images were analyzed using Samespot v3.2 (Nonlinear Dynamics, UK). Proteins were considered significantly different when the p-value of the ANOVA test was under 0.05, and when the q-value, which distinguished false positive results, was under 0.05. The statistical test and the hierarchical clustering analysis (HCA) were performed on the normalized volumes calculated by the software Samespot v3.2 on the basis that the total spot volume from gel to gel should be equal since the same amount of proteins was loaded. The normalization procedure allows possible variations between gels such as gel staining, scanner settings to be corrected.

#### **5. Protein identification**

The protein spots were excised manually from 2 gels (150  $\mu\text{g}$  of protein extract/gel). The spots were de-stained, digested and loaded onto the MALDI target as described by Merlino et al. (2009). The matrix solution (5  $\text{mg ml}^{-1}$   $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile (v/v) and 0.1% trifluoroacetic acid (v/v)) was added immediately and allowed to dry at room temperature.

Peptide mass fingerprinting was performed using a Voyager DE-Pro model of MALDI-TOF mass spectrometer (Perspective BioSystems, Farmingham, MA, USA) used in positive-ion reflector mode. External calibration was performed with a standard peptide solution (ProteomiX 3, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was

performed using peptides resulting from auto-digestion of trypsin. Monoisotopic peptide masses were compared to *Viridiplantae*/ nrNCBI (06/2009, 1 201 934 seq) protein sequence databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/>) using MASCOT 2.2 software [<http://www.matrixscience.com/> <<http://www.matrixscience.com/>> ] last accessed June 2009 as described by Merlino et al. (2009); the only difference in Mascot search parameters in the present study was partial carbamidomethylation instead of partial pyridylethylation. The monoisotopic peptide masses were also used for the interrogation of the database named *est wheat*/ as described by Debiton et al. (2010). Peptide mass fragmentation was obtained by Ion Trap-MS (LCQ DECA, ThermoFisher, Les Ulis, France). The LC-MSMS system and the parameters allowing protein identification with MS-MS spectra are also described in detail in Merlino et al. (2009).

## **6. Grain and starch granule characterization**

Thousand kernel weight and protein content were performed four times for the triple null NIL (nAnBnD) and the normal line of Tremie (ABD). Grain protein content (GPC) was evaluated using near infrared reflectance spectrometry (NIRS) from wholemeal flour produced on Cyclotec 14920 mill (Hilleröd, Denmark). The NIR spectra were acquired using a NIRSystems 6500 spectrometer (NIRSystems, Inc., MD, USA) and grain protein content estimated using the AACC method 39-10 (AACC 1995) with Kjeldahl calibration.

Starch granules were manually extracted from 10 plump grains and the granule size distribution was monitored using the Malvern Mastersizer laser-diffraction analyser 2000 E (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) for the triple null NIL and the normal line according to Bancel et al. (2010). At least 3 independent measurements were performed for granules size distribution.



## **7. Determination of sugar content**

Sugars were extracted on *ca.* 10 mg of wholemeal flour by a method derived from Moing et al. (1992) in which the purification procedure was as follows. The extracts were purified on polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Sigma, St Louis, MO, USA) to eliminate polyphenols and on anion exchangers (AG1\*8 100-200Mesh Biorad -  $\text{HCO}_3^-$  form). Extracts were desiccated and then dissolved in ultra-pure water for HPLC analyses. Soluble sugar concentrations (glucose, sucrose) were quantified using a Metrohm Bioscan system (Metrohm France, Courtaboeuf, France) equipped with a Metrosep Carbo 1 250 x 4.6 mm column (Metrohm France, Courtaboeuf, France) and a pre-column Metrosep Carbo 1 (Metrohm France, Courtaboeuf, France), at 32°C, with a flow rate of 0.8 ml/min of 0.16 N NaOH. Detection was performed by amperometry, and the results are expressed as specific contents in mg/g dry weight (DW).

From the pellet obtained after extraction of soluble sugars, starch content was quantified as glucose equivalent after hydrolysis with amyloglucosidase Boehringer® (Mannheim, Germany) and absorbance measurement at 340 nm on a microplate scanning spectrophotometer Power Wave 200 (Bio-tek Instrument, Seralbo Technologie, Bonneuil sur Marne, France). The values were obtained from two extracts with two technical replicates. The difference of means statistical test was performed to determine if the waxy triple null form was significantly different from the normal form of Tremie.

## **8. Susy and AGPase activities**

For both enzymatic assays, the crude extract was obtained as described by Dai et al. (2009). Ten grains were weighed and crushed with a pestle in a pre-cooled mortar. 5-10 ml of ice-cooled extraction buffer (50 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 2 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% (w/v) PVP) was added to the obtained powder and gently mixed for 15 min at 4°C.

The homogenate was centrifuged 10 000 *g* at 4°C for 10 min, and the resulting supernatant was used for SuSy and AGPase activities. Protein content was determined by Bradford protein assay (Sigma, USA), using bovine serum albumin as standard.

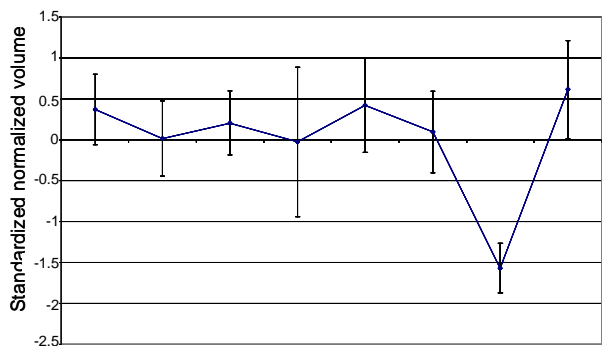
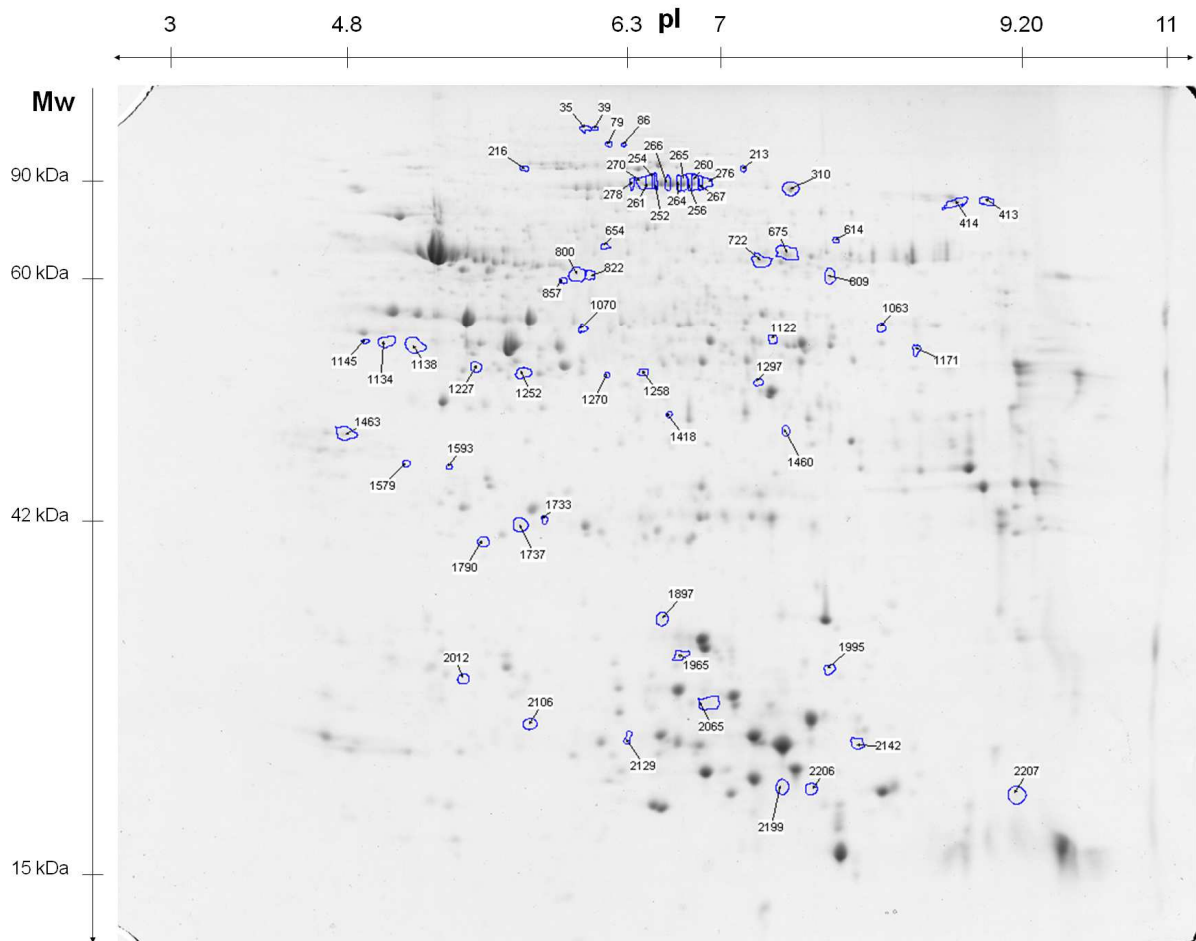
The AGPase (EC 2.7.7.27) assay was carried out according to Dai et al. (2009) in 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 1.2 mM ADPG, 5 mM PPI, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, and 3 mM DTT. The production of glucose-1-phosphate was estimated by measuring the reduction of NADP<sup>+</sup> in presence of phosphoglucomutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The activity was determined by measuring the increase in absorbance at 340 nm.

The Susy (EC 2.4.1.13) assay was carried out according to Baroja-Fernandez et al. (2003) in the direction of sucrose breakdown. A volume of 50 µl of crude extract was added to 250 µl of the reaction mixture [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KCl, 500 mM sucrose, 2 mM ADP]. After 20 min incubation at 30°C, the reaction was stopped by boiling for 1 min. Fructose content was determined spectrophotometrically employing the commonly used hexokinase/phosphoglucoisomerase/glucose-6-phosphate dehydrogenase coupling method (Lever, 1972). A volume of 100 µl of the reaction was incubated 10 min at 30°C together with 100 µl of 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NAD<sup>+</sup>, 0.01 U µl<sup>-1</sup> of hexokinase, phosphoglucoisomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction was stopped by boiling for 1 min. The activity was determined by measuring the increase in absorbance at 340 nm.

## **D. RESULTS**

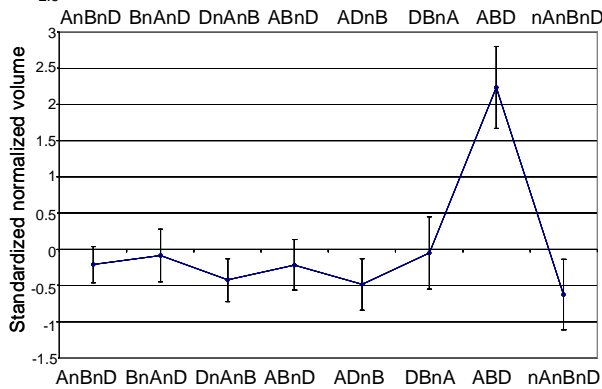
### **1. Protein variations in the albumin-globulin fraction**

Proteomic analysis, performed on 48 2-dimensional electrophoreses (6 gels per near isogenic form) revealed 1852 protein spots (Figure 45). The bi-dimensional analyses of the albumin-globulin fraction showed a high similarity between the eight different NILs and



**Group 1:**

35, 39, 79, 86, 252, 254, 256, 260, 261, 264, 265, 266, 267, 270, 276, 278, 310, 414, 675, 722, 809, 1063, 1297, 1790, 2012



**Group 2:**

213, 800, 822, 1122, 1134, 1138, 1145, 1171, 1227, 1252, 1258, 1270, 1418, 1593, 1965, 2065, 2129, 2142, 2206

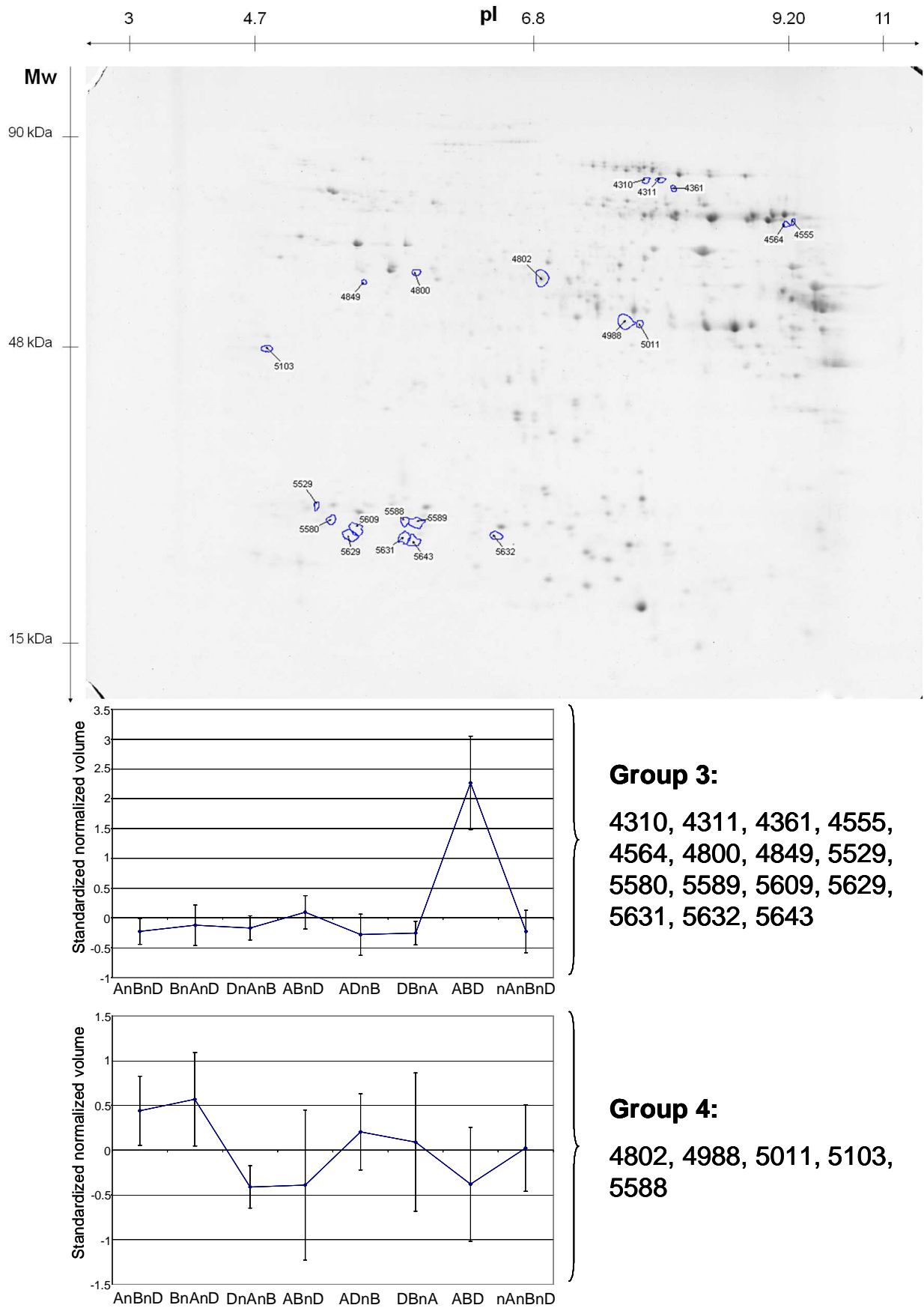
**Figure 45.** Image gel (IPG x SDS-Page) analyses of the albumin-globulin fraction of the waxy triple null form of Tremie. Spots that differed significantly ( $p$ -value $<0.05$  and  $q$ -value $<0.05$ ) are encircled. Each curve represents the average of the standardized normalized volumes of the spots having the same expression between each genotype.

identified reliable differences only for minor spots. No qualitative differences (presence versus absence) were detected by the image analysis and ANOVA revealed that 60 spots were significantly different between NILs and normal cultivar Tremie using  $p$ -value $<0.05$  and  $q$ -value $<0.05$  as acceptance criteria. These 60 spots were distributed on the whole gel: between 15 kDa and 100 kDa with respect to their molecular weight (MW) and 4.6 and 9.2 with respect to their isoelectric point (pI).

Hierarchical clustering analysis revealed four different groups of proteins. The first group was composed of 25 proteins overexpressed in the lines lacking one, two or three *waxy* null alleles compared to the normal Tremie (Figure 45 group 1). The second group was composed of 19 proteins down-regulated in the waxy NILs (Figure 45 group 2). The third and fourth clusters were composed of 9 and 7 proteins respectively that had irregular profiles with at least two NILs being significantly different. Proteins belonging to the third and fourth groups could not be linked to a particular *waxy* allele.

Thirty proteins were identified using MALDI-TOF and MS-MS mass spectrometry (Table 20A). The highest number of proteins identified was in the sucrose synthase type 2 isoform family. Eleven sucrose synthases (Figure 45 spots 252, 256, 260, 261, 264, 265, 266, 267, 270, 276, 278) were located on 2D gels between a pI of 6.3 and 7 and at a MW of 90 kDa. These sucrose synthases were up-regulated by an average of 59% in the waxy NILs compared to the normal form of Tremie. One fructose 1-6 biphosphate aldolase (Figure 45 spot 1063) was also overexpressed by 69% in the waxy NILs compared to the normal form of Tremie. Two globulins 2 (Figure 45 spots 675 and 809) were also increased by 65% in the near isogenic forms.

Three serpins (Figure 45 spots 1134, 1138, 1252) were down-regulated by respectively 74%, 50% and 42% in the waxy NILs compared to the normal form of Tremie and were located between pI 4.8 and 5.8 and at apparent MW of 52 kDa. Spot 800 (Figure 45), which



**Figure 46.** Image gel (IPG x SDS-Page) analyses of amphiphilic proteins of the waxy triple null form of Tremie. Spots that differed significantly ( $p$ -value $<0.05$  and  $q$ -value $<0.05$ ) are encircled. Each curve represents the average of the standardized normalized volumes of the spots having the same expression between each genotype.

was identified as a large subunit of an ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), was also down-regulated by 35% in the near isogenic forms and was located at pI 6.10 and a MW of 58 kDa. A dimeric alpha-amylase inhibitor (Figure 45 spot 213) decreased by 63% in the near isogenic forms compared to the normal form of Tremie. Spot 1418 (Figure 45), which was identified as an O-methyl transferase, was also down-regulated by 57%. One heat shock protein class 1 (Figure 45, spot 1965) was also down-regulated by 46% in the NILs compared to the normal form of Tremie.

Among the proteins that were differentially expressed depending on the near isogenic forms of Tremie, none could be linked to the expression of one, two or three *waxy* null alleles. Spot 1737 (Figure 45), which was identified as a triose phosphate isomerase, was observed at pI 5.7 and MW 42 kDa and was down-regulated by 39% in the normalD normalB nullA (denoted DB nA, see Table 19) form compared to the triple null form. One heat shock protein class IV (Figure 45 spot 614) was up-regulated by 52% in the B nullA nullD form compared to the A nullB nullD. Spot 1297 (Figure 45), identified as a serine/threonine phosphatase, was also up-regulated by 65% in the DB nullA form compared to the normal form of Tremie. A putative late embryogenesis protein (Figure 45 spot 414) was up-regulated by 56% in the AB nullD form compared to the normal form of Tremie.

## **2. Protein variations in the amphiphilic fraction**

Proteomic analysis performed on 48 2-dimensional electrophoreses revealed 1298 protein spots (Figure 46). As for the albumin-globulin fraction no qualitative differences were observed in the amphiphilic protein fraction.

**Table 20.** Identification of albumins, globulins (A) and amphiphilic proteins (B) differentially expressed in the isogenic lines of Tremie using mass spectrometry MALDI-TOF and MS-MS

**A**

Spot number	Database	Taxonomy	Reference	Protein name	Mascot score	Identified peptides (MS/MS)	E value	Coverage rate	Number of matched peptides (number of unmatched peptides)	Theoretical mass value	Theoretical pI value
<b>Spots differentially expressed in the isogenic lines</b>											
414 <sup>MS/MS</sup>	viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gij154759403]	Putative late embryogenesis abundant protein	93	(GKDVTVSTGGTAAEYAK)		3%	1	52190	7.0
614	est wheat	<i>Zea mays</i>	gij195644560]	Heat shock protein class IV	82		0.039	49%	8(42)	22886	6.0
1297	est wheat	<i>Vitis vinifera</i>	gij147796432]	Serine/threonine phosphatases	89		0.0082	32%	6 (21)	31130	6.3
1463	est wheat	<i>Oryza sativa</i>	gij125548166]	Hypothetical protein	87		0.012	55%	8 (42)	33703	5.0
1579	est wheat	<i>Oryza sativa</i>	gij125548166]	Hypothetical protein	86		0.016	68%	6 (30)	33703	5.0
1737	viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gij1785948]	Cytosolic triosephosphate isomerase	77		0.018	33%	7 (43)	26720	5.4
1995	est wheat	<i>Oryza sativa</i>	gij125601547]	Hypothetical protein	94		0.0027	51%	7 (43)	33703	5.0
<b>Spots down regulated in the isogenic lines</b>											
213 <sup>MS/MS</sup>	viridiplantae	<i>Aegilops speltoides</i>	gij114215850]	Dimeric alpha-amylase inhibitor	181	(LQCNGSKVPEAVLR) (LPVVVDASGDGAYVCK+ Carbamidomethyl (C))		24%	2	13272	7.5
800	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij110729318]	ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	96		0.00021	27%	10 (40)	57772	6.1
1134	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij1885346]	Serpin	93		0.00063	28%	8 (42)	42954	5.2
1138	viridiplantae	<i>Unknown species</i>	gij1885346]	Serpin	74		0.035	31%	10 (40)	42954	5.2
1171	est wheat	<i>Zea mays</i>	gij228310]	Globulin2	110		6.30E-05	48%	10 (24)	49923	6.2
1252	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij75282265]	Serpin	73		0.045	30%	8 (42)	43091	5.6
1418	est wheat	<i>Oryza sativa</i>	gij115480932]	O-methyltransferase	116		1.60E-05	47%	9 (41)	40327	5.3
1965	est wheat	<i>Zea mays</i>	gij195626536]	Heat shock protein class I	83		0.029	48%	8 (42)	17786	5.6
<b>Spots up regulated in the isogenic lines</b>											
252	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	Q43223	Sucrose synthase type 2	206		1.60E-14	32%	29 (27)	92608	6.2
256	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	135		2.90E-08	26%	19 (31)	92549	6.2
260	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	72		0.06	12%	9 (41)	92549	6.2
261	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	83		0.0043	21%	15 (35)	92549	6.2
264	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	132		6.10E-08	25%	18 (28)	92549	6.2
265	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	185		2.80E-13	29%	24 (26)	92549	6.2
266	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	102		6.10E-05	18%	17 (30)	92549	6.2
267	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	77		0.019	15%	9 (21)	92549	6.2
270	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	145		2.80E-09	26%	20 (30)	92549	6.2
276	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij1196837]	Sucrose synthase type 3	82		0.0051	13%	10 (40)	93151	6.2
278	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij3393044]	Sucrose synthase type 2	77		0.019	10%	7 (15)	92549	6.2
675	est wheat	<i>Zea mays</i>	gij228310]	Globulin2	117		1.20E-05	64%	12 (38)	49923	6.2
722	est wheat	<i>Oryza sativa</i>	gij34495244]	Globulin like protein	146		1.60E-08	56%	14 (28)	52066	6.8
809	est wheat	<i>Zea mays</i>	gij228310]	Globulin2	95		0.0021	53%	10 (40)	49923	6.2
1063	est wheat	<i>Oryza sativa</i>	gij115463789]	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	81		0.046	50%	9 (41)	36232	6.6

**B**

Spot number	Database	Taxonomy	Reference	Protein name	Mascot score	E value	Coverage rate	Number of matched peptides (number of unmatched peptides)	Theoretical mass value	Theoretical pI value
<b>Spots down regulated in the isogenic lines</b>										
4310	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij215398470]	Globulin 3	83	0.006	25%	14 (36)	66310	7.8
4555	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij215398470]	Globulin 3	146	3.00E-09	33%	20 (30)	66310	7.8
4564	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	gij215398470]	Globulin 3	128	9.90E-07	62%	12 (38)	66310	7.8
4849	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij75282265]	Serpin	80	0.0086	25%	6 (36)	43091	5.6
5589	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	gb ACJ65514.1]	Globulin 3	82	0.044	61%	6 (44)	66349	7.8
5609	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	gij215398470]	Globulin 3	91	0.0047	58%	8 (26)	66310	7.8
5631	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij215398470]	Globulin 3	155	3.80E-10	36%	21 (29)	66310	7.8
5632	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	gb ACJ65514.1]	Globulin 3	82	0.043	44%	6 (44)	66349	7.8
<b>Spots differentially expressed in the isogenic lines</b>										
4802	viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gij148508784]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	73	0.049	23%	7 (43)	36626	7.1
5103	est wheat	<i>Lindernia brevidens</i>	gij169159968]	Desiccation-related protein	92	0.0036	55%	6 (44)	25059	5.5

Statistical analysis revealed 20 spots that differed significantly between the NILs and the normal cultivar. These spots were located between pI 4.7 and 9.2 and between 20 kDa and 70 kDa with respect to their molecular weight.

Two different groups were distinguished using hierarchical clustering analysis. Fifteen spots were down-regulated in the different near isogenic forms compared to the normal form of Tremie (Figure 46 group 3) and five spots showed irregular profiles between the different NILs (Figure 46 group 4). No spots of this amphiphilic protein fraction were shown to be up-regulated in the NILs compared to the normal form of Tremie.

Ten proteins were identified using MALDI-TOF mass spectrometry (Table 20B). Seven proteins (Figure 46 spots 4310, 4555, 4564, 5589, 5609, 5631, 5632), all identified as globulin 3, were down-regulated by an average of 53% in the near isogenic forms of Tremie compared to the normal form. One serpin (Figure 46 spot 4849) was also decreased by 64% in the near isogenic forms compared to the normal form of Tremie.

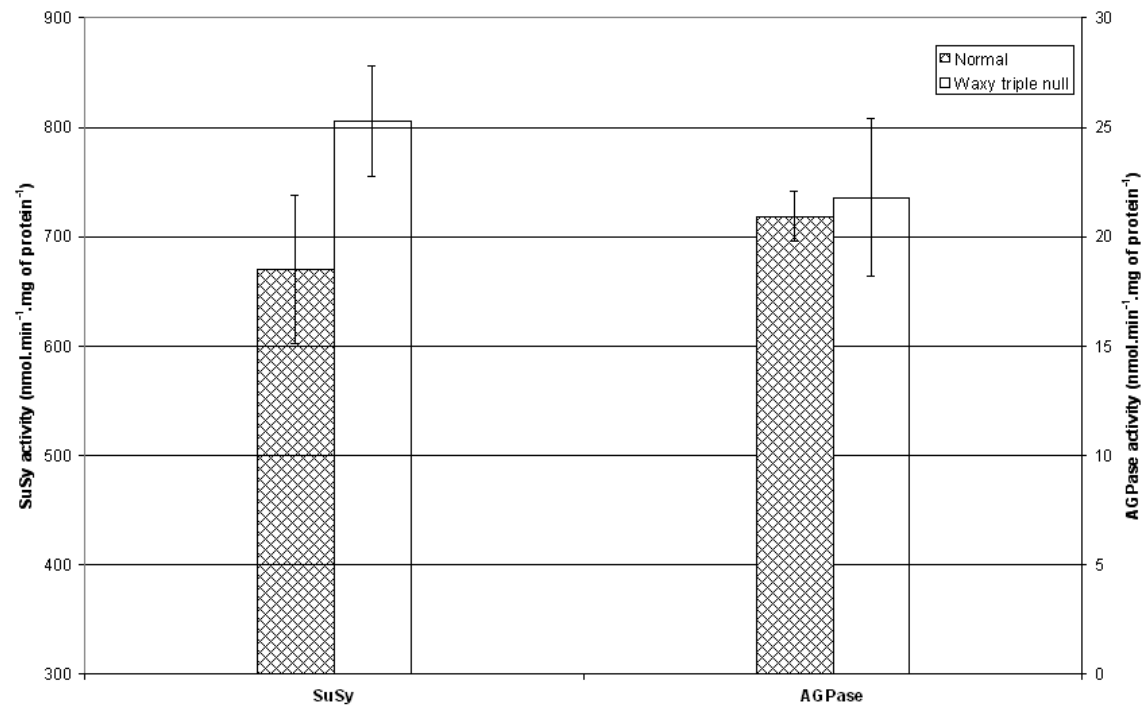
Among the proteins differentially expressed depending on the near isogenic forms, two were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Spot 4802 (Figure 46), identified as glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, was up-regulated by 150% in the B nullA nullD compared to the normal form of Tremie. Spot 5103 (Figure 46), identified as a desiccation-related protein, was up-regulated by 50% in the waxy triple null form compared to the DB nullA form of Tremie.

Comparison of 2DE gels for both fractions, albumin-globulin and amphiphilic proteins, revealed 116 common spots in the normal form of Tremie. These common spots represent 6.3% of albumin-globulin spots and 8.9% of the amphiphilic spots. The expression profiles of these common spots between the NILs were the same in both fractions. Only the sucrose synthases which were up-regulated in the albumin-globulin fraction of the NILs



**A**

Name	Glucose mg/g DW	Sucrose mg/g DW	Starch mg/g DW
Normal (ABD)	0.195 ± 0.07	6.22 ± 0.70	560.21 ± 11.83
Waxy triple null (nAnBnD)	0.12 ± 0.13	8.41 ± 1.05	530.9 ± 11.84
P-Value	0.078	0.0132	0.0128

**B**

**Figure 47.** Starch and Sugar content of wholemeal flour (A) and AGPase and Susy activity (B) for the waxy triple null isogenic form and the normal form of Tremie.

compared to the normal form of Tremie were not significantly different when analysed in the amphiphilic fraction. This discrepancy may be explained by the huge difference found for the amount of these sucrose synthase spots between the albumin-globulin extract and the amphiphilic protein fraction. More efficiently extracted in the albumin-globulin fraction, they have a spot volume on the 2DE gels 2.4 times higher compared to the 2DE gels of the amphiphilic extract.

### **3. Sugar content, Susy activity and AGPase activity**

Sugar content measured by HPLC revealed significant differences (Figure 47A) between the triple null form and the normal form of Tremie. The waxy triple null form had less starch than the normal form of Tremie, 531 mg/g DW and 560 mg/g DW (P-Value=0.013) respectively, but had more sucrose: 8.4 mg/g DW and 6.2 mg/g DW (P-Value=0.013) respectively. The glucose content in the waxy triple null form was not significantly different than that of the normal form of Tremie.

The sucrose synthase activity was measured and a significant difference between the normal form and the waxy triple null form was noticed (P-value=0.049) (Figure 47B). The activity of this enzyme in the triple null form was increased by 20.2% whereas on the gel the spot volumes were increased by an average of 59%. AGPase activity was also measured in these two forms and no significant difference was determined (Figure 47B).

## **E. DISCUSSION**

The different NILs showed only a few differences compared to the normal form of Tremie. The similarity in the response for the NILs compared to the normal form of Tremie was much higher than expected from the observed level of isogenicity 87.5% between near isogenic BC3 lines. Using DArT and marker assisted selection, each lines had reached at least

96% of isogenicity. Only 60 spots (3%) out of a total of 1852 varied significantly with respect to the albumin-globulin fraction and only 20 (1.5%) out of a total of 1298 varied significantly in the amphiphilic fraction. The proteins identified by mass spectrometry are primarily related to starch and sugar metabolism and storage metabolism, but also included some proteins involved in stress and defence metabolism such as serpins, which were down-regulated in the albumin-globulin fraction as well as in the amphiphilic fraction. Heat shock proteins were either down-regulated or differentially expressed, depending on the NILs. These stress and defence metabolism proteins help to maintain the conformation of the enzymes in response to a stress (Garavaglia et al., 2009). This result indicates that a waxy kernel could be less adapted to stress than a normal kernel.

A putative late embryogenesis abundant protein and a desiccation-related protein were also shown to be differently expressed in the different near isogenic forms. These proteins are linked to tolerance to cellular dehydration (Hundertmark and Hinch, 2008). A dimeric alpha-amylase inhibitor was down-regulated in the near isogenic forms compared to the normal form of Tremie. This protein is involved in starch and sugar metabolism and prevents breakdown of starch by alpha amylase (Wang et al., 2006). Previous studies showed that this protein may be also involved in the defence against insects by preventing the digestion of starch (Chrispeels et al., 1997).

Beyond the 60 spots that differed in the albumins and globulins, three spots were identified as serpins. These spots were down-regulated up to 74% in the waxy null forms. These proteins are mainly involved in response to stress in the wheat kernel endosperm (Roberts and Hejgaard, 2008) by preventing enzymatic oxidation in the cell. During the wheat kernel development serpins are accumulated until the grain is fully dehydrated (Vensel et al., 2005, Hurkman et al., 2009). In regard to the serpin accumulation the NILs could not be as

mature as the normal wheat kernel resulting in a lower protection against oxidation phenomena.

Regarding the enzymes involved in the carbohydrates metabolism, AGPase is known to be regulated by several ways; one large subunit was decreased in the triple null form of Tremie. AGPase is a key enzyme in the starch synthesis pathway (Preiss, 1996). This enzyme catalyzes the conversion of Glucose-1P and ATP into ADP-glucose and inorganic pyrophosphate (Pi). It is composed of two large subunits and two small subunits (Morell et al., 1987). The AGPase large subunit is encoded at orthologous *Agp2* genes located on long arm of chromosomes 1A, 1B, 1D about 80 cM from the centromere (Ainsworth et al., 1995). Hence, the lower amount of one AGPase large subunit is not associated to any linkage with the *Wx* genes located on the chromosome 4A, 7A and 7D. The enzymatic assays did not reveal any significant differences in the activity of this particular enzyme in the triple waxy null form compared to the normal form of Tremie (Figure 47B). During the wheat grain development this enzyme is expressed during the grain filling to accumulate starch and then decreases until the grain is fully mature and dehydrated (Vensel et al., 2005; Hurkman et al., 2009). Even if our observations have been obtained from mature kernels, the decrease (down-regulated by 35% on 2DE) of this major enzyme for the starch metabolism could indicate a decrease of the ADP-Glucose amount involved in the starch synthesis, decreasing the starch content for the waxy endosperm as compared to the normal wheat kernel. This hypothesis was confirmed by the measurement of starch content in the triple null form of Tremie, which was slightly lower (5.3%) than in the normal form (Figure 47A).

The sucrose synthase commonly catalyzes the reversible conversion of sucrose with UDP to UDP-glucose and fructose but can also, in heterotrophic tissue, catalyze the reversible conversion of sucrose with ADP to ADP-glucose and fructose (Baroja-Fernandez et al., 2003; Munoz et al., 2005). The sucrose synthases were shown to be up-regulated in the NILs

**Table 21.** Grain and starch granule characteristics for the waxy triple null isogenic form and the normal form of Tremie.

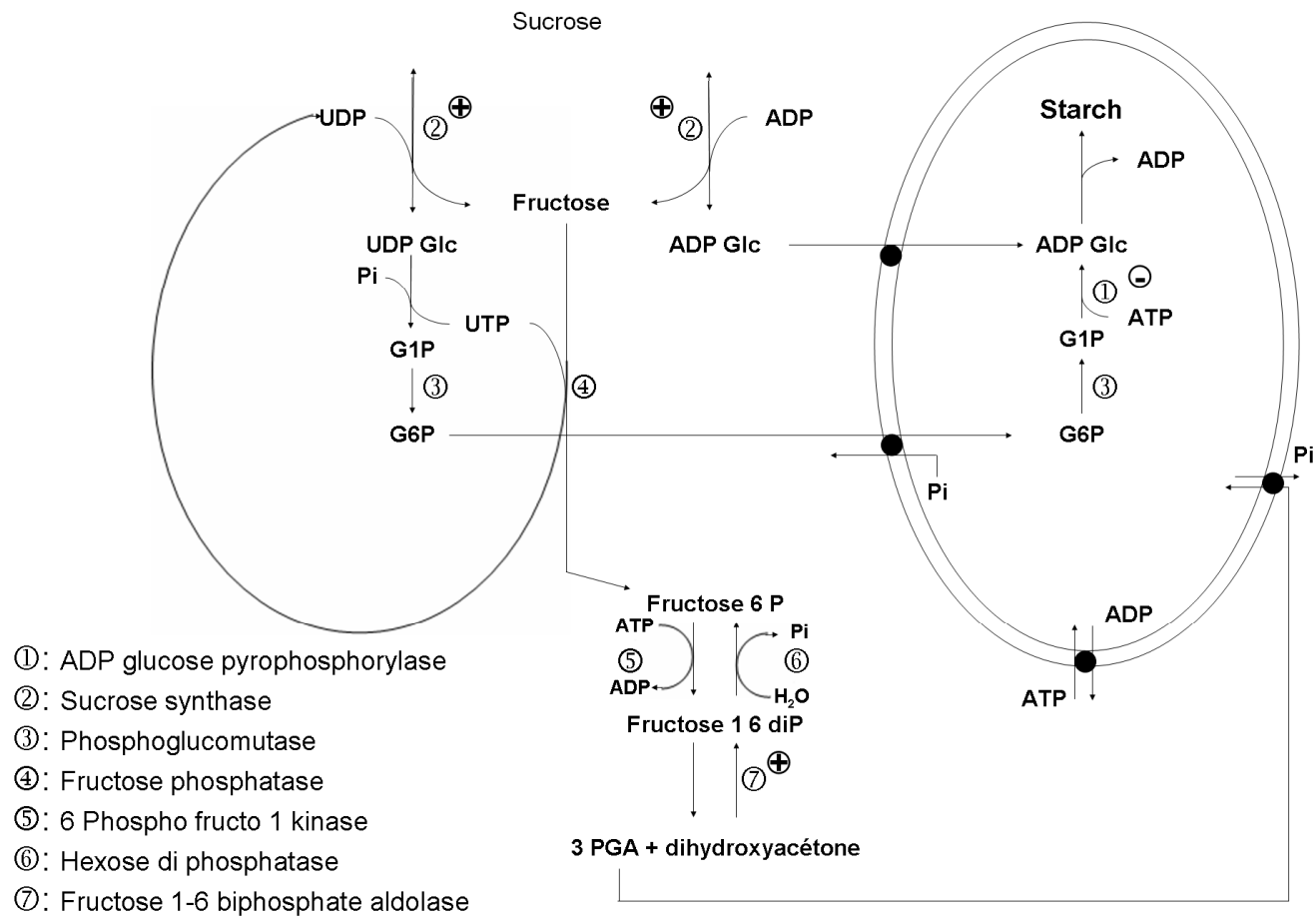
Name	Thousand kernel weight (g)	Average size of the Type A granules ( $\mu\text{m}$ )	Type A granules (Volume in %)	Type B granules (Volume in %)	Type C granules (Volume in %)	Protein quantity (mg/grain)
Normal (ABD)	51.13 $\pm$ 0.39	26.28 $\pm$ 0.92	84.13 $\pm$ 1.1	15.28 $\pm$ 1.05	0.59 $\pm$ 0.05	5.34 $\pm$ 0.04
Waxy triple null (nAnBnD)	49.28 $\pm$ 0.43	20.61 $\pm$ 0.22	74.03 $\pm$ 0.08	24.19 $\pm$ 0.08	1.79 $\pm$ 0.01	5.29 $\pm$ 0.046
Probability of Difference <sup>a</sup>	***	***	***	***	***	ns

a: ns: not significantly different ; \*\*\*: significantly different at  $p < 0.001$

Size of Type A granules is superior to 10 $\mu\text{m}$ ; size of Type B granules is between 2 and 10 $\mu\text{m}$ ; size of Type C granules is below 2 $\mu\text{m}$

compared to the normal line of Tremie as well as their enzyme activity and the sucrose content (Figure 47A). The sucrose synthases were reported as increasing throughout wheat grain development until grain desiccation process (Vensel et al., 2005). The wheat grain metabolism at this last step of development would shift to an oxidized state to spare any resources available by generating NADPH generated in the pentose pathway. This shift to the pentose phosphate pathway is corroborated by the overexpression of the fructose 1,6 biphosphate aldolase in the waxy and partially waxy NILs compared to the normal line of Tremie. This enzyme catalyzes the reversible transformation of fructose 1-6 biphosphate into 3 P-glycerate and dihydroxyacetone phosphate.

The glucose from ADP-glucose is polymerised in starch into two different macromolecules: amylose synthesized by the GBSS and amylopectin synthesized by multiple complexes such as the starch synthases and starch branching enzymes complexes. In the case of the waxy triple null NIL, almost no amylose is formed and the enzymes involved in the amylopectin synthesis were shown not to be affected by null *waxy* alleles. This phenomenon was already observed in maize (*Zea mays* L.) (Grimaud et al., 2008). The absence of amylose has an impact on the average size and the size distribution of starch granules (Geera et al., 2006). For example granules A (>10µm) from triple null NIL had average diameter 21.6% smaller than the average diameter of normal Tremie and their cumulative volume in the granule fraction was much lower as well (Table 21). Moreover starch content and the TKW were also lower in the waxy triple null NIL which was not the case for the amount of protein per grain (Figure 47A and Table 21). These observations on starch granules, TKW and starch content indicate that starch granules have not reached the normal size when amylose synthesis is missing. The variation of the protein quantity observed in the enzymes associated with starch and sucrose metabolism led us to propose the enzyme mechanism, which could be active in the waxy wheat kernel (Figure 48). The glucose from ADP-glucose which is



**Figure 48.** Starch and sugar metabolism in the wheat kernel. Overexpression of enzymes in the Waxy wheat are designated with ⊕ and down-regulation with a ⊖.

normally polymerised in amylose when GBSS is present could be converted to sucrose by sucrose synthase in the waxy triple null NIL. The high sucrose content 8.41 mg/g DW, the increase by 69 % of the sucrose synthase spot volume, and the increase by 20.2 % of the sucrose synthase activity in the waxy triple null isogenic lines corroborate this hypothesis. The above observations would indicate that partially and totally waxy wheat grains are finishing their development sooner as compared to the normal wheat grain development.

The introgression of three *waxy* null alleles in the agronomic cultivar Tremie resulted in modifications mainly involving proteins from starch and sucrose metabolism but also those involved in stress and defence. Amylose content was related to GBSS amounts as revealed using proteomic approach on these NILs (Debiton et al., 2010). Further proteomic analyses could be carried out using these isogenic lines particularly during their grain development.

### **Acknowledgements**

Agnès Guilliot, Brigitte Girard, Marc Vandame and Marc Bonhomme who participated in the sugar and enzymes determination are gratefully acknowledged.



## F. REFERENCES

- Aacc, American Association of Cereal Chemists, Approved methods of the AACC, ninth ed., 1999 The American Association of Cereal Chemistry, St Paul, MN
- Ainsworth, C., Hosein, F., Tarvis, M., Weir, F., Burrell, M., Devos, K.M., Gale, M.D., 1995. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase genes in wheat: differential expression and gene mapping. *Planta* 197, 1-10.
- Amiour, N., Merlino, M., Leroy, P., Branlard, G., 2002. Proteomic analysis of amphiphilic proteins of hexaploid wheat kernels. *Proteomics* 2, 632-641.
- Balmer, Y., Vensel W.H., Dupont, F.M., Buchanan B.B., Hurkman W.J., 2006. Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. *Journal of Experimental Botany* 57, 1591-1602.
- Bancel, E., Rogniaux, H., Debiton, C., Chambon, C., Branlard, G., 2010. Extraction and proteome analysis of starch granule-associated proteins in mature wheat kernel (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteome Research* 9, 3299-3310.
- Baroja-Fernandez, E., Munoz, F.J., Saikusa, T., Rodriguez-Lopez, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J., 2003. Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant and Cell Physiology* 44, 500-509.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S., 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.
- Chrispeels, M.J., de Sa, M.F.G., Higgins, T.J.V., 1997. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids W-168 Symposium on Seed Biology and Technology - Applications and Advances. Ft Collins, Colorado, pp. 257-263.
- Dai, Z., Yin, Y., Wang, Z., 2009. Activities of key enzymes involved in starch synthesis in grains of wheat under different irrigation patterns. *Journal of Agricultural Science* 147, 437-444.
- Debiton, C., Bancel, E., Chambon, C., Rhazi, L., Branlard, G., Effect of the three waxy null alleles on enzymes associated to wheat starch granules using proteomic approach. Accepted for publication in *Journal of Cereal Science* Ref.: Ms. No. JCS10-169R1.
- Dupont, F.M., 2008. Metabolic pathways of the wheat (*Triticum aestivum*) endosperm amyloplast revealed by proteomics. *Bmc Plant Biology* 8, 39-57.
- Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., Ottado, J., 2009. Hsp70 and Hsp90 expression in citrus and pepper plants in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *European Journal of Plant Pathology* 123, 91-97.

- Geera, B.P., Nelson, J.E., Souza, E., Huber, K.C., 2006. Composition and properties of A- and B-type starch granules of wild-type, partial waxy, and waxy soft wheat. *Cereal Chemistry* 83, 551-557.
- Graybosch, R.A., Souza, E., Berzonsky, W., Baenziger, P.S., Chung, O., 2003. Functional properties of waxy wheat flours: genotypic and environmental effects. *Journal of Cereal Science* 38, 69-76.
- Grimaud, F., Rogniaux, H., James, M.G., Myers, A.M., Planchot, V., 2008. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59, 3395-3406.
- Hundertmark, M., Hinch, D.K., 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118-140.
- Hurkman, W.J., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Whitehand, L., Altenbach, S.B., 2009. Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain. *Journal of Cereal Science* 49, 12-23.
- Lever, M., 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 47, 273-279.
- Merlino, M., Leroy, P., Chambon, C., Branlard, G., 2009. Mapping and proteomic analysis of albumin and globulin proteins in hexaploid wheat kernels (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118, 1321-1337.
- Moing, A., Carbonne, F., Rashad, M.H., Gaudillere, J.P., 1992. Carbon fluxes in mature peach leaves. *Plant Physiology* 100, 1878-1884.
- Morell, M.K., Bloom, M., Knowles, V., Preiss, J., 1987. Subunit structure of spinach leaf adp-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* 85, 182-187.
- Munoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Moran-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Etxeberria, E., Alonso-Casajus, N., Pozueta-Romero, J., 2005. Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant and Cell Physiology* 46, 1366-1376.
- Murai, J., Taira, T., Ohta, D., 1999. Isolation and characterization of the three Waxy genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene* 234, 71-79.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., Nagamine, T., 1995. Production of waxy (amylose-free) wheats. *Molecular and General Genetics* 248, 253-259.
- Preiss, J., 1996. Specific functions of the starch biosynthetic enzymes. *Carbohydrates in Europe* 15, 11-14.
- Roberts, T.H., Hejgaard, J., 2008. Serpins in plants and green algae. *Functional & Integrative Genomics* 8, 1-27.

Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Cai, N., Wong, J.H., Buchanan, B.B., Hurkman, W.J., 2005. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5, 1594-1611.

Wang, J.R., Yan, Z.H., Wei, Y.M., Nevo, E., Baum, B.R., Zheng, Y.L., 2006. Molecular characterization of dimeric alpha-amylase inhibitor genes in wheat and development of genome allele-specific primers for the genes located on chromosome 3BS and 3DS. *Journal of Cereal Science* 43, 360-368.

Yamamori, M., Nakamura, T., Endo, T.R., Nagamine, T., 1994. Waxy protein-deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 179-184.

Yamamori, M., Quynh, N.T., 2000. Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 32-38.

## Introduction à la seconde étude du protéome des lignées waxy

Les changements observés sur l'expression des enzymes de la voie de synthèse de l'amidon chez les lignées isogéniques n'ont pas permis de mettre en évidence des différences entre les lignées isogéniques. Le métabolisme des sucres a été modifié quelque soit le nombre d'allèles nuls exprimés.

La différence entre les formes isogéniques intervient essentiellement sur l'expression des GBSS (codés par les gènes *waxy*) localisées dans et à la surface des granules d'amidon. L'analyse de la fraction des protéines associées aux granules d'amidon a donc été entreprise afin de déterminer dans quelle proportion chacune des GBSS varie et quels effets sont observables sur les autres enzymes associées aux granules d'amidon.

Ce second article met en évidence que contrairement aux fractions des albumines globulines et des amphiphiles, la fraction des protéines associées aux granules d'amidon possède un nombre de protéines variant significativement beaucoup plus important. Ainsi 86 protéines sur les 352 présentes étaient exprimées différemment en fonction des formes isogéniques *waxy*.

Les variations les plus importantes ont pu être observées pour les GBSS qui représentent la majeure partie des protéines présentes dans les granules d'amidon. Cependant il est à noter qu'aucune enzyme de la voie de synthèse de l'amylopectine n'a vu son expression varier chez les lignées isogéniques *waxy*.

L'étude des volumes de ces enzymes présentes sur les gels bidimensionnels a permis de montrer la non additivité de l'expression des différents gènes *waxy*.

Par ailleurs, une corrélation entre le volume des GBSS, mesuré sur le gel, et le taux d'amylose a aussi été mise en évidence.

Enfin, plusieurs protéines variantes ont été identifiées par spectrométrie de masse comme étant des produits de l'expression de l'allèle nul *Wx-D1b*.

**VI. EFFETS DES TROIS ALLÈLES NULS DES GÈNES  
WAXY SUR LES ENZYMES ASSOCIÉES AUX  
GRANULES D'AMIDON**

**Effect of the three *waxy* null alleles on enzymes associated to wheat starch granules using proteomic approach\*\***

Clément Debiton<sup>1</sup>, Emmanuelle Bancel<sup>1</sup>, Christophe Chambon<sup>2</sup>, Larbi Rhazi<sup>3</sup> and Gérard Branlard<sup>1\*</sup>

1-INRA UMR 1095, 234 avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France

2-INRA UR 370 PFEM-Plateau Protéomique, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

3-Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, 19 rue Pierre Waguet, 60026 Beauvais, France

Corresponding Author (\*): Gérard Branlard

**Keywords:** starch granules, *waxy*, two-dimensional electrophoresis, *Triticum aestivum*

**Abbreviations:** DArT: diversity arrays technology; DTT: dithiothreitol; CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; GBSS: granule bound starch synthase; IPG: immobiline pH gradient; NIL: near isogenic line; 2DE: two-dimensional electrophoresis; SDS: Sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

**\*\* Article paru dans Journal of Cereal Science 52 (2010) 466-474**

**doi:10.1016/j.jcs.2010.07.012**

## A. ABSTRACT

In bread wheat (*Triticum aestivum* L.), *waxy* genes are present at three loci (*Wx-A1*, *Wx-B1* and *Wx-D1*) and are responsible for amylose synthesis in the grain. Near isogenic lines (NILs) of the agronomic cultivar Tremie with either one, two or three *waxy* null alleles were used to study the genome response to these null alleles through proteomic analysis of starch granule associated proteins of mature grain. Among the 352 spots that were revealed, 86 varied significantly between NILs. The main differences were observed for the granule bound starch synthase (GBSS), product of the *waxy* genes. A strong relation ( $R^2= 0.94$ ) between the amount of GBSS per gram of starch granule and the amylose quantity in the grain was revealed through quantification of the GBSS in each NIL. The analysis of GBSS quantity for each NILs invalidated the additive hypothesis for the expression of this enzyme in (*Wx-A1a Wx-D1a Wx-B1b*), (*Wx-D1a Wx-B1a Wx-A1b*) and the normal form of Tremie. In addition, four proteins identified as inactive GBSS were increased (+144.9%) in the triple null isogenic form compared to the normal form of Tremie. The quantitative variations of the proteins present in starch granules support the idea of regulatory mechanisms between genomes.

## B. INTRODUCTION

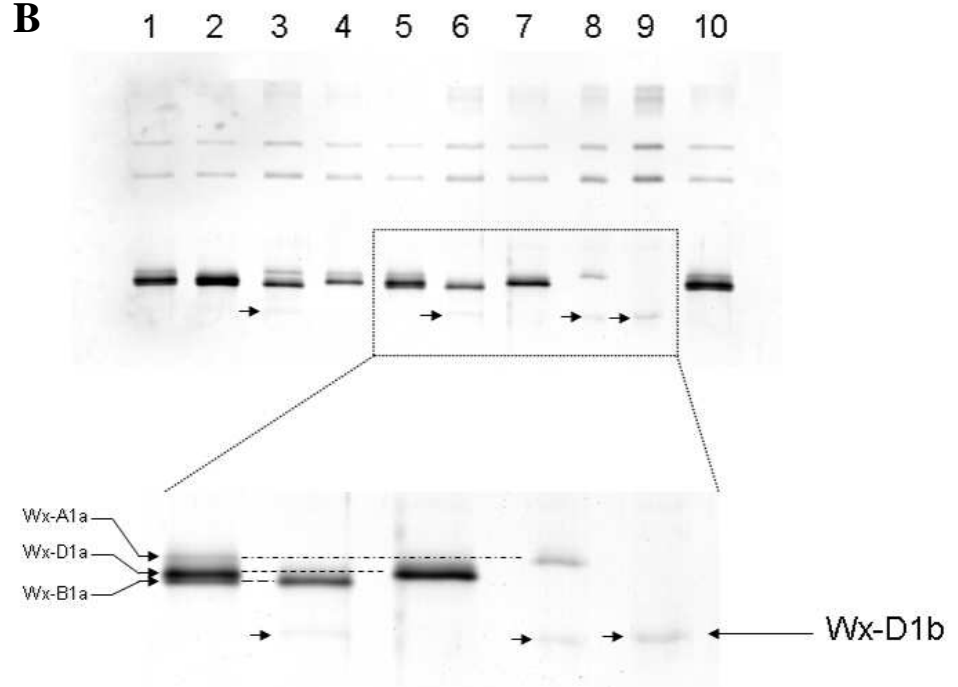
Starch is the major component of the wheat grain and is composed of starch granules trapped in a protein matrix. Three classes of granules can be distinguished: type A granules with a diameter greater than 10  $\mu\text{m}$  and a lenticular shape, type B granules between 5 and 10  $\mu\text{m}$  with a spherical shape and type C granules which are smaller than 5  $\mu\text{m}$ . Starch granules are composed of 28% of amylose, which is a linear molecule of glycosyl monomers joined via  $\alpha$ -1,4 linkages, and of 72% of amylopectin, which is composed of glycosyl monomers of which 5% are joined with  $\alpha$ -1,6 linkages (Buléon et al. 1998; Denyer et al. 2001). The amylopectin is synthesized by the coordinated action of a set of isoenzymes: starch branching enzymes (SBE), starch synthases (SS) and starch debranching enzymes (SDBE) (Morell et al. 1997, 2001; Tetlow et al. 2008; Hennen-Bierwagen et al. 2009). The formation of amylose is mainly due to the granule bound starch synthase (GBSS) coded by the *waxy* genes (De Fekete et al. 1960; Nelson and Rines 1962; Tsai 1974) named *Wx-A1*, *Wx-B1* and *Wx-D1* (Echt and Schwartz 1981; Murai et al. 1999). GBSS catalyze the elongation of the amylose molecule using ADP-glucose. These enzymes are coded by three genes located on the short arm of chromosome 7A, on the long arm of chromosome 4A and the short arm of chromosome 7D (Yamamori et al. 1994; Yamamori and Endo, 1996). *Waxy* null alleles have been found at each of the three loci; in Kanto 107 wheat, which lacks the *Wx-A1* and *Wx-B1* proteins, and in Bai Huo partially *waxy* wheat, which lacks the *Wx-D1* protein (Nakamura et al. 1995). These two lines were used as progenitors to obtain a homozygous hexaploid *waxy* wheat that possesses the three *waxy* null alleles (Nakamura et al. 1995). This homozygous wheat was then crossed with a French wheat cultivar, Tremie, to obtain eight isogenic lines possessing one, two, or three *waxy* null alleles.

The proteins associated with starch granules and their roles in the starch metabolism are well defined (Smith 1999; Smith et al. 2003; Dupont 2008). The effect of the wheat



**A**

	Name	Lane	Allelic Composition		
			Wx-A1	Wx-B1	Wx-D1
Normal form	ABD	1 ; 5 ; 10	a (+)	a (+)	a (+)
Single null form	DB nA	2	b (-)	a (+)	a (+)
	AB nD	3	a (+)	a (+)	b (-)
	AD nB	4	a (+)	b (-)	a (+)
Double null form	B nAnD	6	b (-)	a (+)	b (-)
	D nAnB	7	b (-)	b (-)	a (+)
	A nBnD	8	a (+)	b (-)	b (-)
Triple null form	nAnBnD	9	b (-)	b (-)	b (-)

**B**

**Figure 49.** Name, allelic composition (A) and SDS-PAGE (B) of the eight different near isogenic lines for each of the three *waxy* null alleles in the French wheat cultivar Tremie. Arrows indicate the presence of the Wx-D1b protein that was found only in genotypes in which the *Wx-D1b* allele was present. 1: Normal line; 2: DBnA; 3: ABnD; 4: ADnB; 5: Normal line; 6: BnAnD; 7: DnAnB; 8: AnBnD; 9: Waxy triple null; 10: Normal line.

(*Triticum aestivum* L.) *waxy* null alleles on the starch composition and flour properties was also studied (Miura et al. 1999; Yamamori et al. 2000; Graybosch et al. 2003) but their effect on the enzymes of carbohydrate metabolism is not well known. In analyzing the enzymes present within starch granules the aim of the present study is to understand the response to the *waxy* alleles cumulated in the cultivar Tremie using proteomic approach.

## C. EXPERIMENTAL

### 1. Plant material

A homozygous progenitor possessing three *waxy* null alleles was created using the partial *waxy* mutant Kanto 107 (K107), which lacks the Wx-A1a and Wx-B1a proteins, and Bai Huo (kindly provided by Dr Jia G. CAAS, Beijing), which lacks the Wx-D1a protein (Nakamura et al. 1995). This progenitor was crossed with the French cultivar Tremie. Eight isogenic lines with homozygous null alleles at either one, two or three loci of the *waxy* genes with the genetic background of the cultivar Tremie were created (Figure 49A). Development of the BC2 and BC3 were assisted with 36 SSR and 972 diversity arrays technology (DART) markers (Pty Ltd, Yarralumla, Australia) to increase the isogenicity of each isogenic lines with the recurrent Tremie parent. The different isogenic lines had reached from 96 to 99% of isogenicity using DART markers and marker assisted selection. The BC3 self-pollinated lines were grown in greenhouse conditions in 2008 with control temperature, day/night normal light, fertilizer plus full fungicide protection.

Mature grains of the BC3 self-pollinated NILs of *Triticum aestivum* cv. Tremie were used to study the effect of the three *waxy* null alleles on the enzymes associated to starch granules using a proteomic approach.

## **2. Purification of starch granules**

Purified starch granules were obtained from mature grain for each of the eight NILs using the procedure describe by Bancel et al. (2010). Grains were milled by hand and soaked overnight in 1 mL of ultra pure water. Bran fragments were separated using a gravity gradient with an 80% cesium chloride (w/v) solution. The pellets were then washed twice for 30 minutes with 1 mL of a Tris SDS (sodium dodecyl sulfate) buffer (55 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3% (w/v) SDS, 1% (w/v) DTT (dithiothreitol), 10% (v/v) glycerol) and then 3 times for one hour. Sonication (Vibracell, VC50, Bioblock Scientific, Illkirch, France) of each individual sample was performed at 20 W for 20 seconds between each washing. The samples were washed three times with water and then twice with ice cold acetone. The purified extracts were finally dried at room temperature and stored at -20°C.

## **3. Protein extraction for one dimensional electrophoresis**

The specific extraction of GBSS for one dimensional electrophoresis screening was performed as previously described by Caballero et al. in 2008 on 20 mg of purified starch granules. A 250 µl solution containing 62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2.3% (w/v) SDS, 1% (w/v) DTT, 10% (v/v) glycerol, 0.02% w/v bromophenol blue was added to the purified granules. This mixture was heated for 5 minutes in boiling water and cooled in ice for 5 minutes. The tubes were then centrifuged for 15 minutes at 17000 g. A 10 µl sample of the supernatant was loaded on SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) T=12% C=0.44% and migration was performed at 30 mA per gel for 4h30. Proteins were revealed by silver staining using the PlusOne Silver Staining Kit for proteins (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

#### **4. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis**

Proteins were extracted twice using 1 g of purified starch granules for each NIL. The procedure was adapted from that of Bancel *et al.* 2010. After the swelling of the starch granules and the precipitation of the protein and sugars with a TCA 30% w/v in acetone, the obtained pellets were cut into four, crushed in a mortar and divided into Eppendorf tubes to facilitate solubilization in 1 ml sucrose solution containing 0.1M Tris HCl buffer, pH 8.0, 30% (w/v) sucrose, 2% (w/v) SDS, and 5% (v/v) 2-beta mercaptoethanol. After one hour of solubilization, 500 µl of phenol (Tris buffered, pH 8.0, Sigma, St. Louis, MO, USA) was added and vortexed for 5 minutes then centrifuged at 17,000 g for 5 minutes at 20°C. The upper phase was placed in a new tube, five volumes of 0.1M ammonium acetate in methanol were added and the solution was stored at -20°C overnight to allow the proteins to precipitate. The pellet containing the proteins was then centrifuged and washed twice with the ammonium acetate solution and twice with an ice cold 80% acetone solution. The pellet was dried and solubilized in a buffer (CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) 4%, Urea 7 M, Thiourea 2 M, IPG (immobiline pH gradient) buffer pH 3-11 NL 1% and DTT 70 mM), before isofocusing. The protein concentration was measured using Bradford assay (Sigma, St Louis, MO, USA).

#### **5. Two-dimensional electrophoresis**

The 24 centimeters immobiline pH gel strips (pH 3-11 NL) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) were rehydrated overnight at room temperature with 450 µl of rehydration solution (CHAPS 4%, Urea 7 M, thiourea 2 M, IPG buffer (pH 3-11 NL) 1%, DTT 70 mM) containing the protein extract (100µg). Isofocusing was carried out until 90 kV-hour at 20°C with an Ettan IPGphor 2 unit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The proteins were equilibrated for 15 minutes in a solution (Urea 6 M, Tris-HCL 50 mM pH 8.8, glycerol 30% and SDS 2%)

containing 1% of DTT, and were then alkylated for 15 minutes in the same solution containing 2.5% of iodoacetamide. The strips were deposited on SDS polyacrylamide gel with the following parameters: T=14%, C=2.1%. Gels were stained overnight with colloidal Coomassie Brilliant Blue G250 stain.

## **6. Image analysis**

Two replicates of two extracts were performed for each of the eight NILs. Gels were scanned using a GS-800 scanner and Quantity One Software (Biorad, Richmond, VA, USA). Images were analyzed using Samespot v3.2 (Nonlinear Dynamics, UK). The spot volume, corresponding to the intensity of the spot integrated on its surface, was normalized and standardized by the software for each replicates of the eight NILs. The standardized normalized procedure allowed possible variations between gels such as gel staining and scanner settings to be corrected. This procedure allowed performing precise qualitative (presence/absence) and quantitative comparison between the NILs. The statistical tests were performed on the standardized normalized volumes calculated by the software Samespot v3.2 on the basis that the total spot volume from gel to gel should be equal since the same amount of proteins was loaded. Proteins were considered significantly different when the p-value of the ANOVA test was  $< 0.05$ , with at least a 2-fold difference of standardized normalized volume and with a q-value under 0.05 that allowed false positive results to be distinguished.

## **7. Protein identification**

The protein spots were excised manually from 2 gels (100  $\mu$ g of protein extract/gel). The spots were destained with two solutions (25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5% acetonitrile for 30 min and 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50% acetonitrile twice for 30 min). The spots were dehydrated in 100% acetonitrile and dried, 100-200 ng of trypsin (V511, Promega, Madison, WI, USA)

were added depending on the spot volume. Digestion was performed overnight at 37°C. The peptides were then extracted using 8-15 µl of acetonitrile. The mixture was sonicated for 5 minutes and 1 µl of peptides were loaded onto the MALDI target. The matrix solution (5mg ml<sup>-1</sup> α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) was added immediately and allowed to dry at room temperature. Peptide mass fingerprinting was performed using a Voyager DE-Pro model of MALDI-TOF mass spectrometer (Perspective BioSystems, Farmingham, MA, USA) in positive-ion reflector mode. External calibration was performed with a standard peptide solution (ProteomiX 3, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was performed using peptides resulting from auto-digestion of trypsin. Monoisotopic peptide masses were compared to *Viridiplantae*/ nrNCBI (06/2009, 1 201 934 seq) protein sequence databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/>) using MASCOT 2.2 software [<http://www.matrixscience.com/> <<http://www.matrixscience.com/>> ] last accessed June 2009 as described by Merlino et al. (2009); the only difference from the Mascot search parameters was partial carbamidomethylation instead of partial pyridylethylation. The monoisotopic peptide masses were also used for the interrogation of the database *est wheat*. The *Triticum aestivum* EST (Expressed Sequence Tag) databank (*est wheat*) was computerized using the SRS (Sequence Retrieval System) from EBI (<http://srs.ebi.ac.uk/>) using a home-made PERL program that follows a classical SRS request [ ((([embl-Division:pln]) & [embl-Class:est]) & ([embl-Organism:Triticum] & [embl-Organism:aestivum])) ]. Partial CDS were also added to the EST databank. With Version 99 of EMBL, we extracted 1 058 516 sequences. The whole databank was masked (strong masked) against Univec 5.1 (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/UniVec/>) and then cleaned for polyA/T and vector contamination; and again masked (soft masked) against the Transposable Element data bank TREP 10.0 (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/>). Masking was performed using Repeatmasker software (using the cross-match engine)

(<http://www.repeatmasker.org/>). Expressed sequence tags were then blasted against nrNCBI to get an identification.

Peptide mass fragmentation was obtained by Ion Trap-MS (LCQ DECA, ThermoFisher, Les Ulis, France). The system LC-MSMS and various parameters allowing protein identification with MS-MS spectra are described in detail in Merlino et al. (2009).

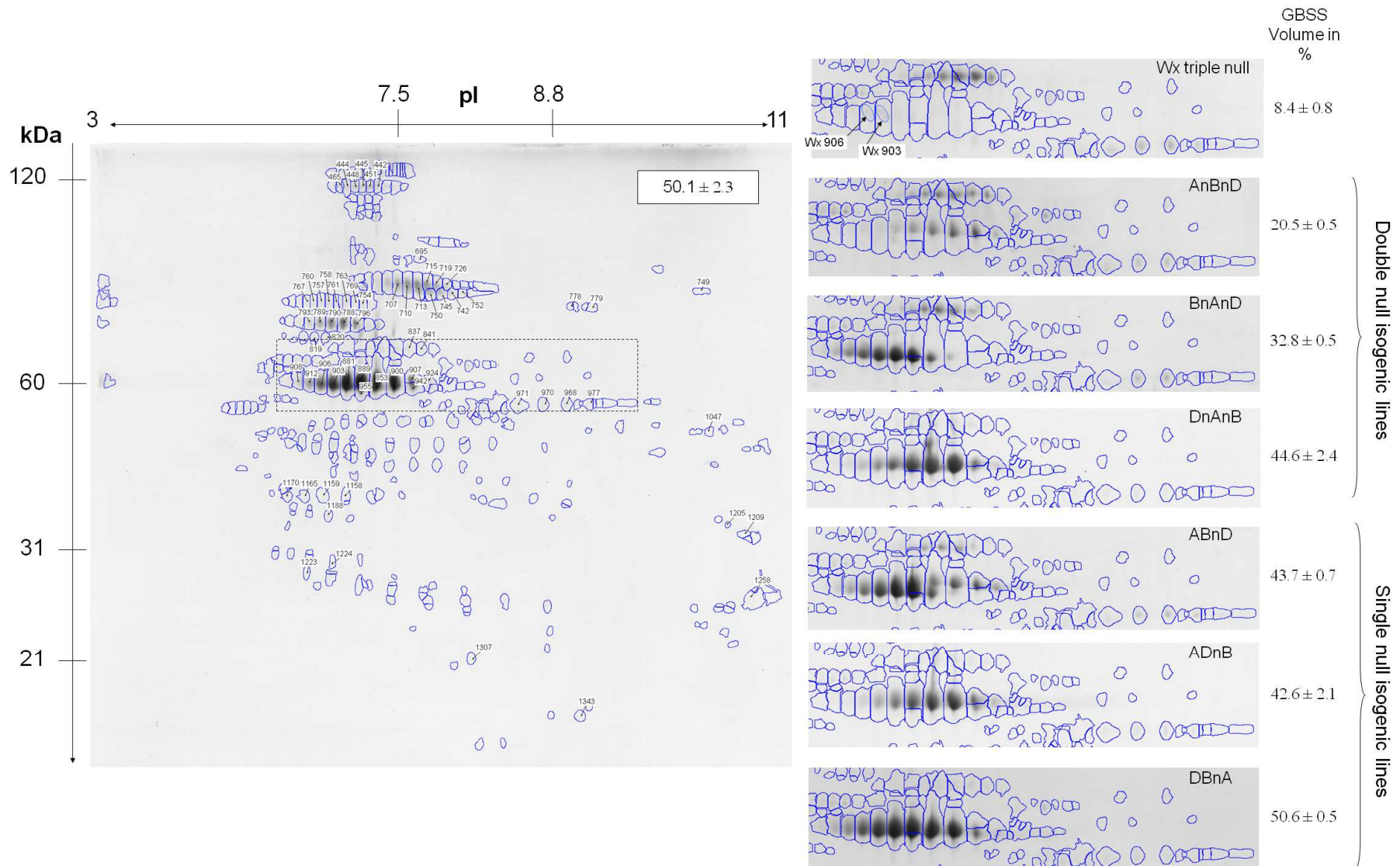
## **8. Amylose determination**

Amylose determination was achieved using dual wavelength iodine binding technique developed by Zhu et al. (2008). Wholemeal flour (60mg) was weighted into 50 ml conic tube. Ethanol (1 mL) was added to the sample. Then, 10 mL of 1N sodium hydroxide solution was added to solubilise wholemeal flour. After 1 hour of agitation, 1 ml of this solution was transferred into 100 mL volumetric flask. Water (51 mL) was added and hydrochloric acid (0.1 N) was used to titrate the solution to neutral. The pH was followed using pH-meter. Then 2 mL of 0.2% iodine solution (2 g potassium iodide and 0.2 g of iodine diluted to 100 mL with distilled water) was added and the volume of sample was adjusted to a fixed volume (80ml). Solution was allowed to sit 30 min to fully develop color and finally difference between absorbance values at 620 nm and 510 nm were used for amylose determination. Standard curves were established using different fractions of amylose and amylopectin purchased from Fluka Analytical (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

## **D. RESULTS**

### **1. One dimensional gel electrophoresis**

Migration on the SDS-PAGE gels of the starch granules associated proteins enabled us to distinguish the different NILs possessing one, two or three bands corresponding to the



**Figure 50.** 2DE gels of the proteins associated with starch granules in the normal line of the French cultivar Tremie. The enhanced windows show the particular area of the GBSS in each of the near isogenic lines. The average of the cumulative GBSS volume is indicated in percentage of total volume for each NILs.

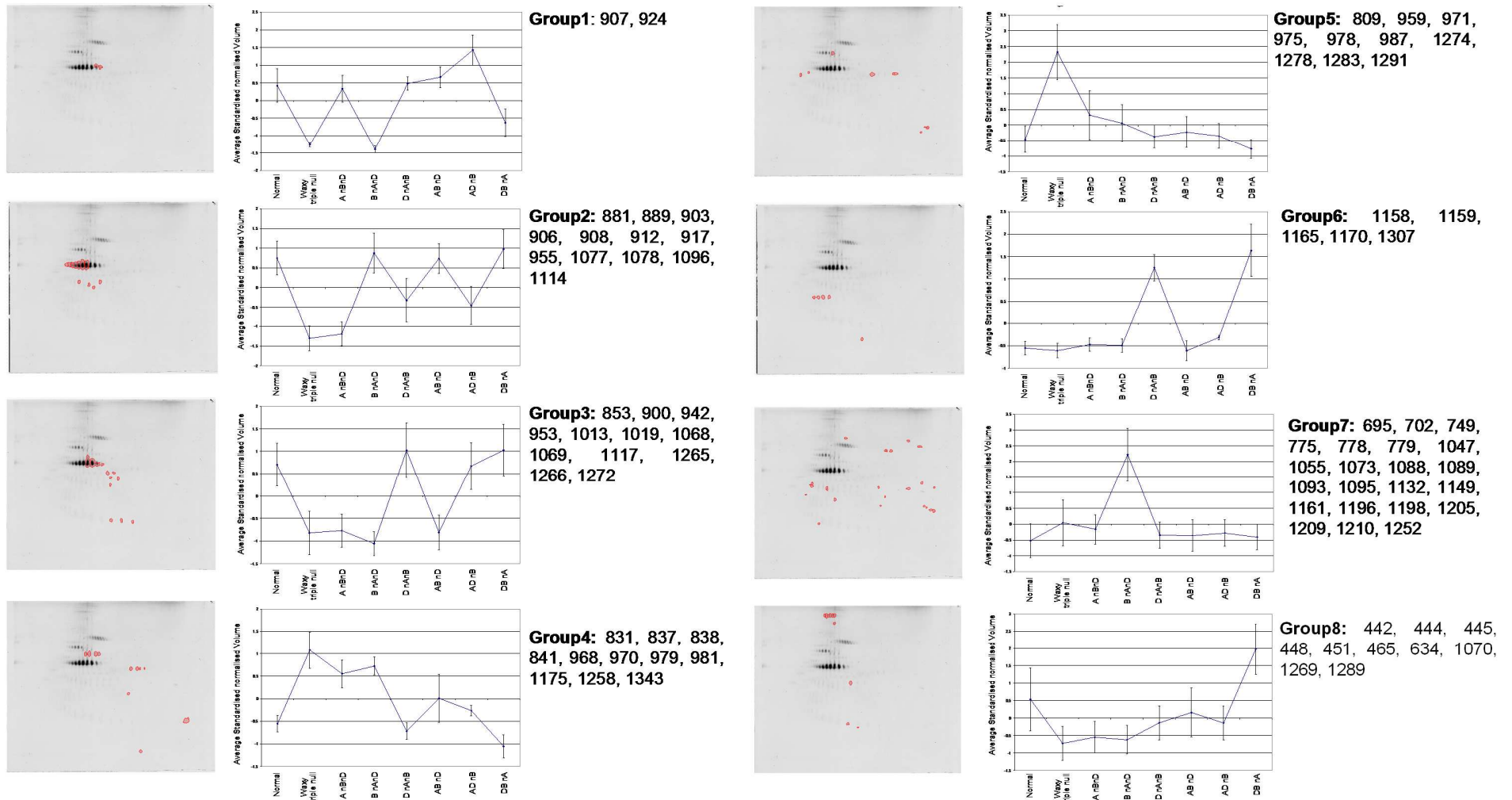


expression of the Wx-A1a, Wx-B1a and Wx-D1a proteins. The slowest band corresponded to the Wx-A1a protein, and the two other bands migrating close to one another corresponded to the Wx-D1a and the Wx-B1a protein, respectively (Figure 49B). This gel also displayed a light band located lower than the three waxy proteins on the NILs ABnD, AnBnD, BnAnD, nAnBnD. This fast moving band could be related to the Wx-D1a protein because when this protein was absent, the band was present. This band could be the Wx-D1b protein, which is an inactive form of GBSS as previously reported by Vrinten et al. in 1999.

## **2. Protein variation on the 2DE gels**

Proteomic analysis performed on 32 2DE gels (4 gels per near isogenic form) revealed 352 protein spots (Figure 50). ANOVA revealed that 86 spots (24.4% out of the 352) differed significantly among the 7 NILs and the normal cultivar Tremie using a  $p$ -value $<0.05$ , a  $q$ -value $<0.05$  and at least a 2-fold difference as acceptance criteria as described in the experimental section. These 86 spots were widely dispersed over the entire gel; located between 21 kDa and 119 kDa with respect to their molecular weight (MW) and 5 and 11 with respect to their isoelectric point (pI). These proteins varying were found in the different NILs and were not preponderant for the waxy triple null form in response to the absence of the major proteins expressed in starch granules. More than 75% of spots remained not significantly varying in the near isogenic forms.

Hierarchical clustering analysis (HCA) revealed nine different groups of proteins. Analysis clearly revealed that the groups were linked to the expression of the three different waxy proteins. One group of two proteins was associated to the Wx-A1a protein in the different NILs (Figure 51 group 1). Another group of 12 proteins was associated to the expression of the Wx-B1a proteins (Figure 51 group 2) and finally a group of 12 proteins was related to the expression of the Wx-D1a proteins (Figure 51 group 3). The five other groups



**Figure 51.** Clustering analysis of the spots significantly varying between the near isogenic lines and their respective location on the 2DE gels.

were attributed to one particular NIL with respect to all the others. Twenty two proteins were increased in the BnAnD form (Figure 51 group 7) and also 10 in the DBnA compared to the other near isogenic forms and normal form of Tremie (Figure 51 group 8). Another set of 5 spots (Figure 51 group 6) was increased in the near isogenic forms containing the Wx-D1a proteins and at least one *waxy* null allele. One group of 10 proteins (Figure 51 group 5) were increased in the triple null form only. Another group of 11 proteins (Figure 51 group 4) were significantly augmented as well in the forms having the *waxy* null allele for the genome D. The last set, composed of two proteins, showed no distinguishable profiles.

### 3. Protein identification

Protein identification revealed a high number of proteins linked to starch metabolism. As expected, granule bound starch synthases, well described in Bancel et al. (2010), (spots 853, 881, 889, 900, 903, 906, 907, 908, 912, 917, 924, 942, 953, 955) were revealed as the major proteins whose quantity varied among the different NILs (Figure 50). The Wx-A1a proteins represented 20.5% of the total volume of the starch granule proteins revealed on the AnBnD gel. Wx-B1a proteins represented 32.8% on the BnAnD gel and Wx-D1a proteins represented 44.6% of the total volume on the DnAnB gel.

Proteins identified (Table 22) as Starch synthases I-1 and I-2 (spots 788, 789, 790, 793, 796, 820 and 819 respectively), starch synthases II-A, II-B and II-D (spots 710 and 742, 745, 750, 752 and 707, 713, 715, 719, 726 respectively) and Starch branching enzymes IIa and IIb (spots 757, 758, 760, 767 and 754, 761, 763, 769 respectively) did not vary significantly among the different NILs.

Two serpins were identified (spots 1188 and 1223) and did not vary significantly among the different NILs.

**Table 22.** Protein identification using mass spectrometry MALDI-TOF and MS-MS. Spots identified using the MS-MS technique are denoted MS-MS. Two spots denoted Wx 903 and Wx 906 correspond to spots that were found in the GBSS zone in the triple null waxy isogenic form.

Spot number	Database	Taxonomy	Reference	Protein name	Mascot score	E value	Coverage rate	Number of matched peptides (number of unmatched peptides)	Theoretical mass value	Theoretical pI value
442	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4760582	Starch synthase (GBSSI)	137	2.00E-08	36%	19 (31)	66303	7.08
444	Viridiplantae	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>Durum</i>	gi 6624287	Starch synthase (GBSSI)	79	0.013	24%	13 (37)	66185	7.08
445	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4760582	Starch synthase (GBSSI)	88	0.0015	23%	11 (18)	66303	7.08
448	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4760582	Starch synthase (GBSSI)	106	2.50E-05	32%	16 (34)	66303	7.08
451	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4760582	Starch synthase (GBSSI)	154	3.90E-10	31%	20 (30)	66303	7.08
465	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 11037536	Granule bound starch synthase I	107	2.00E-05	32%	16 (34)	66284	6.81
695	Viridiplantae	<i>Aegilops tauschii</i>	gi 45533909	HMW glutenin subunit	71	0.08	33%	5 (10)	15779	5.39
707	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943648	Starch synthase II-D	122	6.20E-07	20%	19 (31)	86890	6.14
710	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943644	Starch synthase II-A	147	2.00E-09	25%	21 (29)	87224	6.14
713	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943648	Starch synthase II-D	113	4.90E-06	23%	18 (32)	86890	6.14
715	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943648	Starch synthase II-D	214	3.90E-16	34%	26 (24)	86890	6.14
719	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943648	Starch synthase II-D	183	4.90E-13	34%	25 (25)	86890	6.14
726	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943648	Starch synthase II-D	221	7.80E-17	33%	31 (21)	86890	6.14
742	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943646	Starch synthase II-B	94	0.00043	18%	16 (34)	86741	6.27
745	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943646	Starch synthase II-B	275	3.10E-22	44%	32 (18)	86741	6.27
749	Viridiplantae	<i>Aegilops ventricosa</i>	gi 1188718	y-type high molecular weight glutenin subunit	73	0.048	23%	7 (27)	19683	8.64
750	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943646	Starch synthase II-B	139	1.20E-08	24%	20 (20)	86741	6.27
752	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 82943646	Starch synthase II-B	232	6.20E-18	40%	27 (23)	86741	6.27
754	Viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 3822022	Starch branching enzymellb	120	9.80E-07	21%	18 (32)	93543	5.71
757	Viridiplantae	<i>Aegilops tauschii</i>	gi 13447950	Starch branching enzymella	98	0.00016	21%	16 (34)	92550	5.58
758	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 222353108	Starch branching enzymella	145	3.10E-09	25%	21 (29)	92948	5.5
760	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 1620662	1,4-alpha-D-glucan 6-alpha-D-(1,4-alpha-D-glucanotransferase)	85	3.50E-03	17%	10 (22)	83389	5.59
761	Viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 3822022	Starch branching enzymellb	108	1.60E-05	17%	18 (50)	93543	5.71
763	Viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 3822022	Starch branching enzymellb	80	0.0096	16%	15 (35)	93543	5.71
767	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 13447952	Starch branching enzymella variant	151	7.80E-10	28%	21 (29)	87375	5.37
769	Viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 3822022	Starch branching enzymellb	92	0.00055	10%	9 (5)	93543	5.71
778	Viridiplantae	<i>Aegilops tauschii</i>	gi 46981764	HMW glutenin subunit Dty10	102	6.20E-05	38%	9 (18)	27040	8.2
779	Viridiplantae	<i>Aegilops tauschii</i>	gi 46981764	HMW glutenin subunit Dty10	112	6.20E-06	38%	9 (13)	27040	8.2
788	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 9369334	Starch synthase I-1	243	4.90E-19	43%	25 (16)	70960	5.76
789	Viridiplantae	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>Dicoccoides</i>	gi 6624283	Starch synthase (GBSSI)	99	0.00012	22%	10 (40)	66982	7.49
790	Viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 7188796	Starch synthase I	146	2.50E-09	33%	20 (30)	70471	5.76
793	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 9369334	Starch synthase I-1	120	9.80E-07	31%	17 (33)	70960	5.76
796	Viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 7188796	Starch synthase I	110	9.80E-06	30%	17 (33)	70471	5.76
819	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 42560550	Starch synthase I-2	77	0.022	15%	8 (13)	70960	5.83
820	Viridiplantae	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 7188796	Starch synthase I	107	2.00E-05	23%	12 (12)	70471	5.76
924	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gb AAG27624.1 AF286320_1	Granule bound starch synthase I	92	0.00057	24%	13 (26)	66284	6.81
968	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4588609	Granule-bound starch synthase precursor	201	7.80E-15	40%	25 (50)	63226	8.84
970	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4588609	Granule-bound starch synthase precursor	159	1.20E-10	38%	21 (29)	63226	8.84
971	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4588607	Granule-bound starch synthase precursor	94	0.00043	22%	12 (16)	62647	7.86
977	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4588609	Granule-bound starch synthase precursor	143	4.90E-09	37%	20 (30)	63226	8.84
1047	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	gi 215398470	Globulin 3	106	1.60E-04	51%	10 (27)	66310	7.78
1158	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	AF250137	Mutant granule bound starch synthase I (waxy) mRNA	80	0.058	25%	12 (29)	58896	5.6
1159	Viridiplantae	<i>Hordeum bogdarii</i>	gi 48716089	Granule bound starch synthase I	79	0.012	22%	10 (18)	66228	6.16
1165	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 11037536	Granule bound starch synthase I	76	0.026	28%	13 (47)	66284	6.81
1170	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 4760582	Starch synthase (GBSSI)	84	0.0043	19%	9 (41)	66303	7.08
1188	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 871551	Serpin	76	0.023	36%	10 (40)	43091	5.6
1205	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	gi 215398470	Globulin 3	100	0.00063	46%	6 (22)	66310	7.78
1209	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	gi 215398470	Globulin 3	92	0.0037	28%	6 (14)	66310	7.78
1223	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 11885350	Serpin	81	0.008	27%	7 (43)	43006	5.44
1224	est wheat	<i>Triticum aestivum</i>	gi 11037536	Granule bound starch synthase I	100	0.00064	55%	8 (17)	66326	6.81
1258	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 391929	RNA N glucosylase	152	6.20E-10	63%	13 (18)	29594	9.7
1307	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 11037536	Granule bound starch synthase I	61	0.8	13%	8 (13)	66284	6.81
1343	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 225042	Alpha amylase inhibitor	79	0.012	51%	8 (42)	19621	6.77
1158 <sup>MSMS</sup>	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	Q9S7N5	Granule-bound starch synthase	349	2.96E-43	-	4	66270	7.49
837 <sup>MSMS</sup>	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	AF286320	Granule Bound starch synthase	148	3.13E-20	-	3	66326	6.81
841 <sup>MSMS</sup>	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	B3V9H7	Waxy	105	2.13E-16	-	2	66526	7.5
Wx 903	Viridiplantae	<i>Triticum aestivum</i>	gi 32400764	Beta amylase	114	3.90E-06	55%	13 (37)	30872	8.6
Wx 906	est wheat	<i>Hordeum vulgare</i>	P82993.1	Beta amylase	116	1.60E-05	62%	11 (39)	59639	5.66

Seven proteins increased in the triple null near isogenic form compared to the normal form of Tremie were identified. Four of them (spots 968, 970, 971, 977) were increased by respectively 210%, 173.3%, 116.4% and 80% compared to the normal form of Tremie and were identified as inactive GBSS, product of the *Wx-D1b* gene. Two other proteins (spots 837 and 841) were identified as GBSS I (*Wx-A1a* protein). This unexpected result can be explained by the fact that the sequences of the *Wx-A1a* protein and of the *Wx-A1b* protein are very similar and the peptides used to identify the spot were common to the two proteins. The last protein (spot 1343) was increased by 348.8% and was identified as an alpha amylase inhibitor.

Six proteins (spots 442, 444, 445, 448, 451, 465) were decreased by an average of 70% in the NILs AnBnD, BnAnD, DnAnB, ABnD, ADnB and the triple null form compared to the normal form of Tremie and the DBnA form. These proteins were identified as GBSS and were located at a molecular weight of 110 kDa, which is almost twice that of the 59 kDa weight of GBSS in wheat. GBSS have never been reported in a dimerized form. Such erroneous identification would probably result from contamination by the high amount of GBSS which caused a smear at the top of the gel where these six spots of 110 kDa were located. Unfortunately no protein mixture resulted from the MS profile of any of them.

Seven proteins were increased in the BnAnD form compared to the other NILs. Four of them (spots 695, 749, 778, 779) were increased by 749.5%, 251.2%, 158.7% and 349% respectively and were identified as high molecular weight glutenin subunits. The other three proteins (spots 1047, 1205, 1209) were increased by 183.1%, 106% and 101.3% respectively and identified as globulin 3.

Another group of five proteins (spots 1158, 1159, 1165, 1170 and 1307) were augmented in the forms possessing normal GBSS encoded at the Wx-D1 locus and at least one *waxy* null allele at another locus. The spots were identified as GBSS.

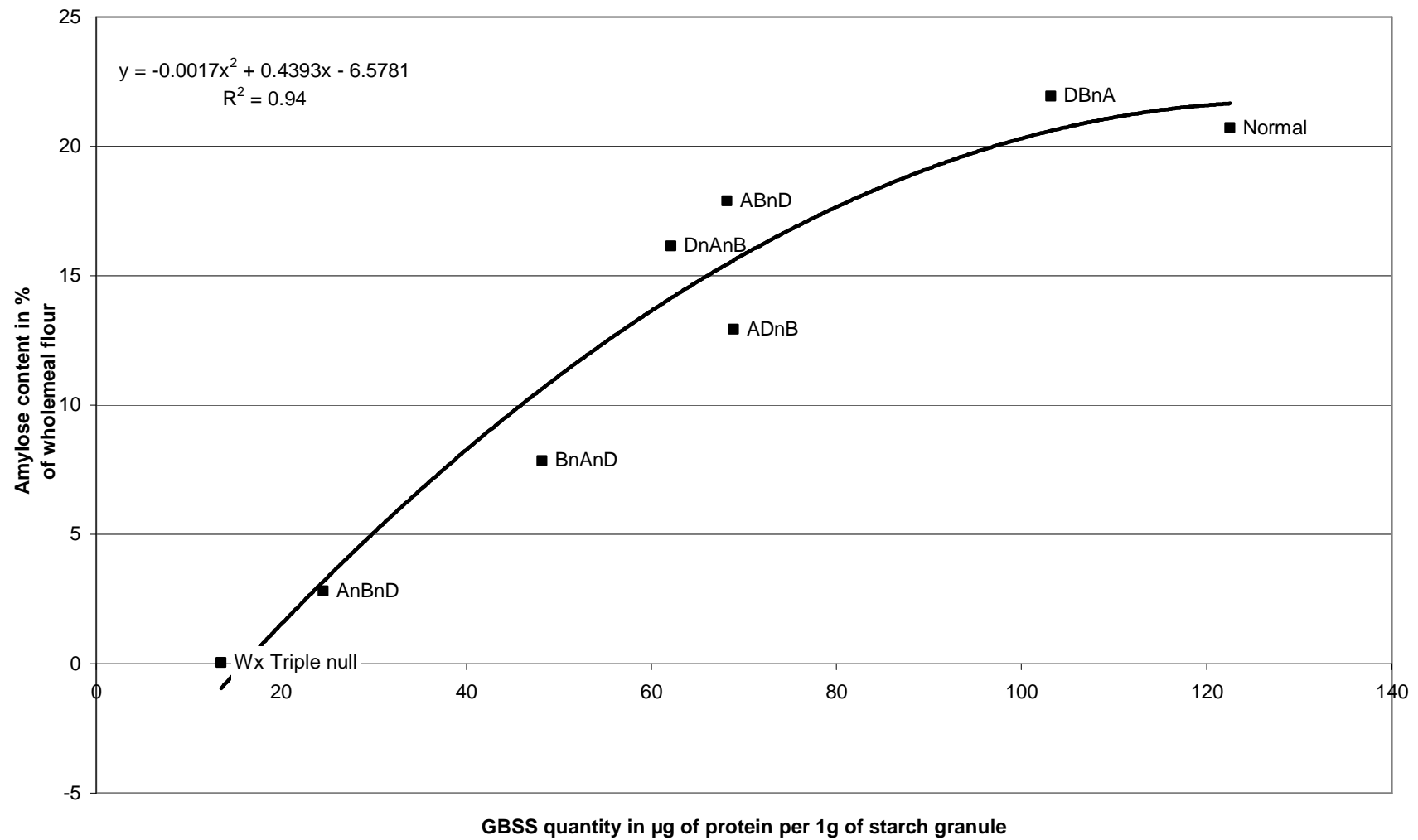
Two proteins (Wx 903 and Wx 906) excised from gels of the triple null near isogenic form in the area where the GBSS were focused, were identified as beta amylases. These proteins may be also expressed in the other near isogenic forms but the GBSS masked them and quantification was thus impossible.

One RNA N glycosidase (spot 1258) was also identified but the expression of this protein could not be linked to a particular *waxy* null allele.

## **E. DISCUSSION**

Proteins involved in starch metabolism and known to play a role in amylopectin synthesis did not differ significantly between the NILs and the normal form of Tremie. Starch synthases I-1 and I-2, starch synthases II-A, II-B and II-D and starch branching enzymes IIa and IIb remained qualitatively and quantitatively unchanged. As shown in corn (*Zea Maize* L.) by Grimaud et al. 2008, these enzymes are not regulated by the *waxy* null alleles, confirming that the amylopectin formation pathway is not affected by lack of either one, two, or three *waxy* alleles.

The main qualitative variations (presence/absence) in protein expression in the NILs were related to the three different *waxy* proteins. The proportion of the cumulative spot volume corresponding to the GBSS found in the normal form was 50.1% (Figure 50). This proportion is much lower than the value (85 to 90%) reported by Bulleon et al. in 1998. It should be noted that not only the major spots corresponding to the three bands on 1D gel were identified as GBSS on 2DE gels. Indeed, many other small spots have already been identified

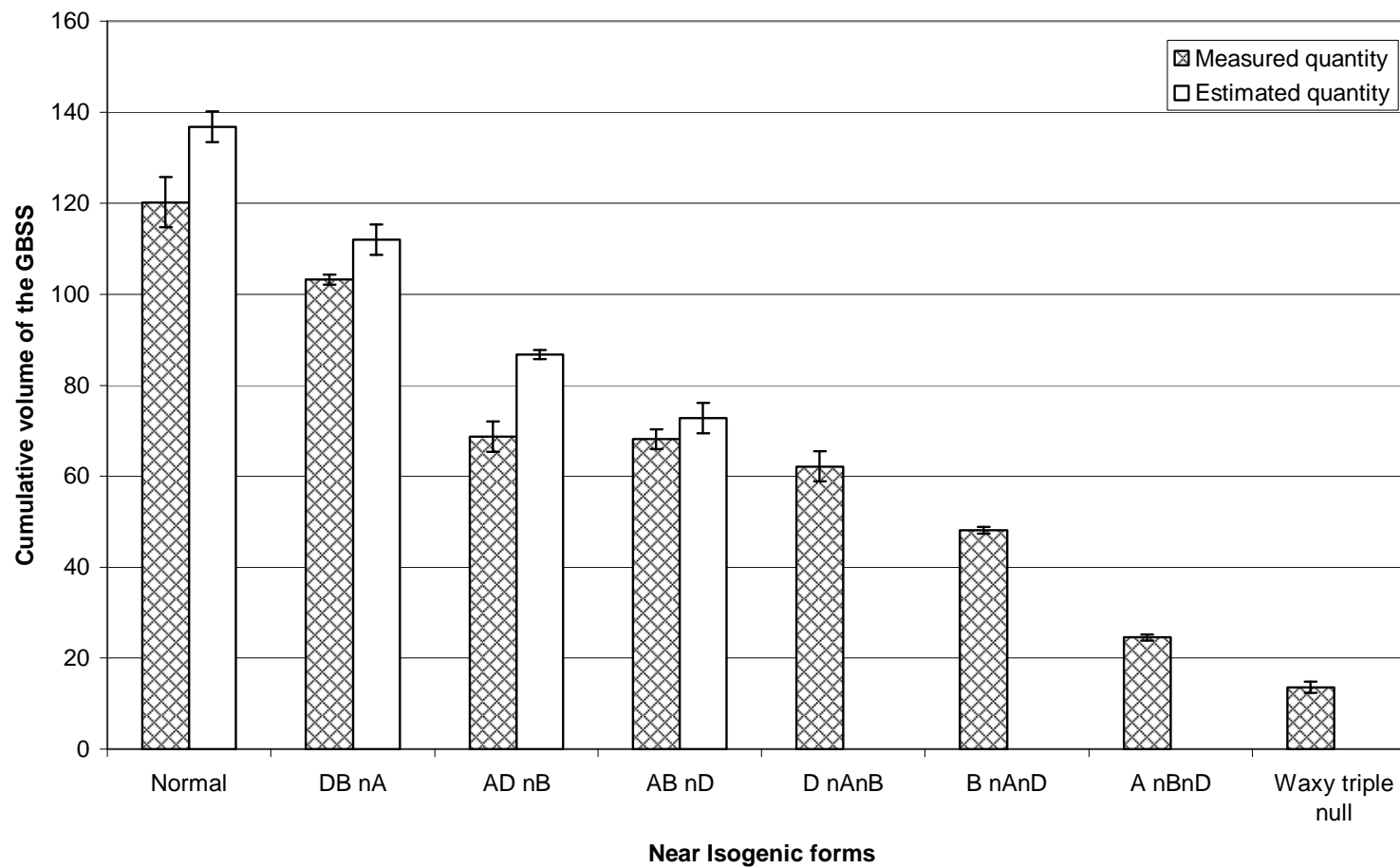


**Figure 52.** Relation between the GBSS quantity measured on 2D gels and amylose content for each near isogenic lines.

as GBSS on 2DE gels (Bancel et al. 2010) and these spots may account for part of this difference. Concerning the other NILs, those possessing only one *waxy* null allele (ABnD, ADnB and DBnA) had a total volume of GBSS of 43.7%, 42.6% and 50.6% respectively. In lines possessing two *waxy* null alleles, the cumulative volume of GBSS differed considerably depending on the form. In the DnAnB form, the volume of the GBSS spots represented 44.6% of the total amount deposited on the gel, which is as much as the volume of the GBSS spots in the single null NILs. The two other double null NILs AnBnD and BnAnD had a cumulative volume of 20.5% and 32.8%, respectively. The DnAnB near isogenic form appeared to be closer to the single null near isogenic forms in terms of the quantity of GBSS expressed. The *waxy* triple null NILs showed 8.4% spot volume in the GBSS area. This percentage can be explained by some small and faint spots focusing in this particular gel zone.

The GBSS are mainly responsible for the synthesis of amylose in endosperm and may each account for a different amount of amylose in the grain. The proteins focusing in the GBSS area were essentially identified as GBSS. The total quantity of these proteins focusing in the GBSS area as measured on 2DE gels and expressed per gram of starch granules vary between 13.5 $\mu$ g and 122.6 $\mu$ g. This quantity was highly correlated with the amount of amylose using polynomial regression (Figure 52). In 1999, using 1D gel electrophoresis and amylose assay with the colorimetric iodine method, Miura et al. demonstrated that the amount of amylose synthesized by the three different genes differed, and that Wx-A1a protein produced less amylose than Wx-D1a and Wx-B1a. In their study, Wx-B1a proteins were responsible for the most amylose synthesis in the grain (21-22%) compared to Wx-D1a (20-21%). In the present study, results obtained in the different NILs of Tremie using a proteomic approach, revealed that Wx-A1a proteins were also less effective compared to the Wx-B1a and Wx-D1a but that Wx-D1a proteins produce more amylose than Wx-B1a. This difference may be due to the genotype used to create the NILs.





**Figure 53.** GBSS quantity measured on 2D gels and their estimated value based on the additive hypothesis. The quantity of GBSS in the double null forms (AnBnD, BnAnD and DnAnB) was used to extrapolate the measurement under this hypothesis. Vertical bars: standard deviation computed on four 2DE replicates for each NILs.

Measuring the different levels of expression of GBSS in the double null NILs (AnBnD, BnAnD and DnAnB) made it possible to estimate the level of expression of GBSS in the other partial waxy forms under the hypothesis of an additive effect. Figure 53 presents the different GBSS quantity in the near isogenic forms and their estimated quantity under the additive hypothesis. The estimated values were based on the GBSS quantity measured on the 2DE gels for the double null near isogenic forms (i.e. AnBnD, BnAnD and DnAnB). The ABnD form had an estimated GBSS quantity close to that observed on the 2DE gels, indicating that the *Wx-A1a* and *Wx-B1a* alleles do have an additive effect. However in the three following forms, i.e. normal (ABD), ADnB and DBnA, the estimated quantity was higher than the measured quantity of GBSS. These significant differences were due to the unexpectedly high quantity of the *Wx-D1a* proteins. In these three near isogenic forms, the quantity of GBSS is thus not additive. This finding indicates that the expression of the different *waxy* genes would be regulated by a mechanism which would limit the amount of GBSS encoded by *Wx-D1a*. This regulation remains to be analyzed.

The four proteins increased in the triple null near isogenic forms compared to the normal form of Tremie were identified as inactive granule bound starch synthase and reported as the *Wx-D1b* protein in the NCBI databank (gi4588609). This identification resulted from the matching of four specific peptides of this particular *Wx-D1b* protein. This protein lacks the N terminal end of the active form of the *Wx-D1a* proteins. The second glycosyl transferase domain is truncated and explains the inactivity of the protein. These four inactive GBSS proteins were located at the same molecular weight as the band shown on the 1D gel for the NILs possessing the *Wx-D1b* allele (Figure 49B).

In the waxy triple null near isogenic form, two beta amylases were also found on 2DE gels in the area where the GBSS migrate. These proteins involved in the starch degradation were already identified by Bancel et al. in 2010 in normal starch granule.

Some high molecular weight glutenin subunits, which should have been removed during the washing steps, were also revealed to be present in the NIL BnAnD. These proteins, which are known to present be in the protein matrix surrounding the starch granules, appear to be more tightly bound to the starch granules in the BnAnD form than in the other NILs.

In conclusion, the proteomic approach used on the eight different NILs for the three *waxy* null alleles enabled us to identify qualitative and quantitative variations in the proteins associated with starch synthesis. Variations in the main GBSS spots showed a correlation with the amylose content of the different lines. Wx-D1a proteins were revealed to be more abundant than the waxy proteins encoded at the two other *Wx-A1a* and *Wx-B1a* alleles. These Wx-D1a proteins had the highest impact on amylose synthesis in the wheat endosperm. Based on the results of our study of the double null NILs, only two genes, Wx-A1 and Wx-B1, were additive while Wx-D1 was not. Further analysis of the regulation mechanisms involved in the expression of the three *waxy* genes would first require focusing on their respective transcriptional and proteomic expression during starch accumulation, and second analysing and comparing their promoter sequences. Such studies should elucidate the higher expression of *Wx-D1a* allele. This favourable allele also could be transferred through homeologous recombination on the short arm of chromosome 7A. Full chromosome substitution and duplication, using nullitetrasomic lines did not reveal any dosage effect, particularly for nulli 7A tetra 7D line (Miura and Sugawara 1996). Translocation of 7DS segment using homeologous recombination on 7AS of the 7DS segment, containing the *Wx-D1* locus, without any other 7D genes encoding enzymes associated to starch synthesis, would be

interesting to be tested in order to increase amylose content. Such a recombination -which was successfully used for the *Glu-D1* locus on group 1 chromosome (Dumur et al. 2009)- would make it possible to obtain a double dosage of this high yielding GBSS. This could be a complementary approach to increase the quantity of amylose in the grain without using genetically transformed lines for the enzymes that are associated with amylopectin synthesis (Regina et al. 2006; Lafiandra et al. 2008).

## F. REFERENCES

- Bancel E, Rogniaux H, Debiton C, Chambon C, Branlard G (2010) Extraction and proteome analysis of starch granule-associated proteins in mature wheat kernel (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteome Research* 9, 3299-3310.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S., 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.
- Caballero, L., Bancel, E., Debiton, C., Branlard, G., 2008. Granule-bound starch synthase (GBSS) diversity of ancient wheat and related species. *Plant Breeding* 127, 548-553.
- De Fekete M.A.R., Leloir L.F., Cardini C.E., 1960. Mechanism of Starch Biosynthesis. *Nature* 187, 918-919
- Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A.M., 2001. The control of amylose synthesis. *Journal of Plant Physiology* 158, 479-487.
- Dumur, J., Branlard, G., Tanguy, A.M., Dardevet, M., Coriton, O., Huteau, V., Lemoine, J., Jahier, J., 2009. Development of isohomoeoallelic lines within the wheat cv. Courtot for high molecular weight glutenin subunits: transfer of the Glu-D1 locus to chromosome 1A. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 119, 471-481.
- Dupont, F.M., 2008. Metabolic pathways of the wheat (*Triticum aestivum*) endosperm amyloplast revealed by proteomics. *Bmc Plant Biology* 8 : 39.
- Echt, C.S., Schwartz, D., 1981. Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the waxy locus in maize. *Genetics* 99, 275-284.
- Graybosch, R.A., Souza, E., Berzonsky, W., Baenziger, P.S., Chung, O., 2003. Functional properties of waxy wheat flours: genotypic and environmental effects. *Journal of Cereal Science* 38, 69-76.
- Grimaud, F., Rogniaux, H., James, M.G., Myers, A.M., Planchot, V., 2008. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59, 3395-3406.
- Hennen-Bierwagen, T.A., Lin, Q., Grimaud, F., Planchot, V., Keeling, P.L., James, M.G., Myers, A.M., 2009. Proteins from Multiple Metabolic Pathways Associate with Starch Biosynthetic Enzymes in High Molecular Weight Complexes: A Model for Regulation of Carbon Allocation in Maize Amyloplasts. *Plant Physiology* 149, 1541-1559.
- Lafiandra, D., Sestili, F., Bucelli, A.S., Silvestri, M., Ambrogio, E.d., 2008. Genetic modification of starch composition in wheat *Cereal science and technology for feeding ten billion people: genomics era and beyond*. Proceedings of the meeting of the Eucarpia Cereal Section, Lleida, Spain, 13-17 November 2006, pp. 267-270.

- Merlino, M., Leroy, P., Chambon, C., Branlard, G., 2009. Mapping and proteomic analysis of albumin and globulin proteins in hexaploid wheat kernels (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118, 1321-1337
- Miura, H., Araki, E., Tarui, S., 1999. Amylose synthesis capacity of the three Wx genes of wheat cv. Chinese Spring. *Euphytica* 108, 91-95.
- Miura, H., Sugawara, A., 1996. Dosage effects of the three Wx genes on amylose synthesis in wheat endosperm, *Theoretical and Applied Genetics* 93, 1066-1070.
- Morell, M.K., Blennow, A., Kosar-Hashemi, B., Samuel, M.S., 1997. Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiology* 113, 201-208.
- Morell, M.K., Li, Z., Rahman, S., 2001. Starch biosynthesis in the small grained cereals: Wheat and barley. *Starch: Advances in Structure and Function*, 129-137.
- Murai, J., Taira, T., Ohta, D., 1999. Isolation and characterization of the three Waxy genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene* 234, 71-79.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., Nagamine, T., 1995. Production of waxy (amylose-free) wheats. *Molecular and General Genetics* 248, 253-259.
- Nelson O.E., Rines H.W., 1962. The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochemical and biophysical research communications* 9, 297-300
- Regina, A., Kosar-Hashemi, B., Li, Z.Y., Pedler, A., Mukai, Y., Yamamoto, M., Gale, K., Sharp, P., Morell, M.K., Rahman, S., 2005. Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-syntenic locus. *Planta* 222, 899-909.
- Smith, A.M., 1999. Making starch. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 223-229.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Smith, S.M., 2003. Starch mobilization in leaves. *Journal of Experimental Botany* 54, 577-583.
- Tetlow, I., Liu, F., Emes, M., 2008. Protein-protein interactions among enzymes of starch synthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 150, S186-S186.
- Tsai, C.Y., 1974. The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochemical Genetics* 11, 83-96.
- Vrinten, P., Nakamura, T., Yamamori, M., 1999. Molecular characterization of waxy mutations in wheat. *Molecular and General Genetics* 261, 463-471.
- Yamamori, M., Nakamura, T., Endo, T.R., Nagamine, T., 1994. Waxy protein-deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 179-184.

Yamamori, M., Endo, T.R., 1996. Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 275-281.

Yamamori, M., Quynh, N.T., 2000. Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 32-38.

Zhu, T.M., Jackson, D.S., Wehling, R.L., Geera, B., 2008. Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. *Cereal Chemistry* 85, 51-58.

## **VII. DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



Les programmes d'amélioration de la qualité du blé tendre se sont essentiellement concentrés sur la qualité boulangère et biscuitière. Ces deux utilisations dépendent essentiellement du taux de protéines, de la dureté de l'albumen et de la composition en protéines de réserves.

Cependant ces critères de sélection interviennent de manière indirecte sur l'amélioration du blé pour la production de bioéthanol. En effet, cette nouvelle utilisation dépend essentiellement du taux de sucres fermentescibles pouvant être extraits des grains. Ainsi l'amidon et sa composition apparaissent comme étant les cibles principales de l'amélioration du blé tendre.

Les objectifs de cette thèse étaient :

- de mettre en évidence les autres caractéristiques technologiques favorablement corrélées à la production de bioéthanol afin de fournir aux sélectionneurs de nouvelles cibles pour améliorer le blé destiné à la production de biocarburant.
- d'étudier plus particulièrement l'effet de la composition de l'amidon grâce aux lignées isogéniques waxy (possédant un, deux ou trois allèles nuls des gènes codant pour les GBSS) sur le rendement en éthanol et de déterminer les modifications de la voie métabolique de l'amidon chez ces lignées.

## **A. DÉTERMINATION D'UN TYPE DE BLÉ ADAPTÉ À LA PRODUCTION DE BIOETHANOL**

### **1. Le taux de protéines : indicateur de la quantité de sucres fermentescibles**

L'essai multilocal et pluriannuel a permis d'étudier un ensemble de variétés françaises choisies de manière à présenter des différences pour plusieurs des caractéristiques technologiques du grain. Parmi ces variétés, certaines étaient connues des filières brassicole et maltière pour avoir un bon rendement alcoolique. C'est le cas de la variété Glasgow qui est déjà largement utilisée dans cette filière. L'ensemble des variétés était donc déjà relativement adapté à cette transformation du blé. Ceci peut expliquer pourquoi les écarts relevés sur les rendements en glucose et éthanol en kg/t et L/t sont relativement faibles entre ces variétés. En effet, l'amplitude de variations pour le rendement en glucose est inférieure à 60 kg/t et celle pour le rendement en éthanol est inférieure à 30 L/t. En prenant des variétés au hasard, les écarts auraient été très certainement plus importants. Cependant, malgré cette première sélection, des différences de rendements en glucose et éthanol entre les variétés

françaises existent, et ont permis d'effectuer une analyse des facteurs potentiellement impliqués dans ces rendements.

L'analyse des caractéristiques technologiques du grain a évidemment montré la relation largement décrite entre le taux de protéines et les rendements en glucose et éthanol (Smith et al., 2006 ; Swanston et al., 2007 ; Kindred et al., 2008 ; Agu et al., 2009). En effet le taux de protéines a été montré comme corrélé négativement avec les rendements en glucose et éthanol de manière significative dans 6 des 8 lieux de l'étude. Ceci est évidemment à rapprocher de la quantité d'amidon présente dans le grain de blé car plus le taux de protéines est important, plus la quantité d'amidon et donc de sucres fermentescibles est faible. Les variétés destinées à la production de bioéthanol doivent donc être sélectionnées pour leur faible taux de protéines ce qui est diamétralement opposé aux objectifs de sélection des blés destinés aux usages alimentaires. Cette nouvelle utilisation du blé tendre nécessite par ailleurs de changer les conditions de culture dans le but d'augmenter la taille du grain tout en diminuant le taux de protéines. Ainsi la fertilisation azotée doit être réduite afin d'éviter une accumulation de protéines de réserves trop importante au sein du grain de blé.

Cette caractéristique du grain est celle qui est la plus fortement corrélée aux rendements en glucose et éthanol et permet d'appréhender la quantité d'amidon pouvant être transformé en éthanol.

## **2. La dureté et la distribution des granules d'amidon : impacts sur l'efficacité d'hydrolyse**

L'analyse des régressions multiples a permis de mettre en évidence plusieurs autres paramètres ayant un effet sur les rendements en glucose et éthanol. Ces paramètres concernent principalement l'efficacité de transformation de l'amidon en sucres fermentescibles puis en éthanol. Ces caractéristiques technologiques ont néanmoins des effets moins importants que celui du taux de protéines qui reste la caractéristique du grain la plus déterminante dans le but de l'amélioration du blé pour cette nouvelle utilisation.

Ainsi la distribution de la taille des granules d'amidon et la dureté des grains ont un effet sur les rendements en glucose et éthanol du grain. Dans une moindre mesure, le poids spécifique et la composition en gluténines de haut et faible poids moléculaires ont aussi des effets significatifs mais moins importants que ceux des deux caractéristiques sus-citées.

La distribution de la taille des granules d'amidon conduit à un meilleur rendement lorsque la proportion de granules de petites tailles (Type B et Type C) est importante. Ceci peut s'expliquer par la surface plus importante pouvant être en contact avec les enzymes lors

de l'hydrolyse de l'amidon. L'amidon, lors de l'étape d'hydrolyse sera dégradé plus efficacement en sucres simples qui pourront ensuite être transformés en éthanol.

La dureté possède aussi un léger effet sur les rendements en éthanol. Les variétés dont l'indice de dureté est faible produisent plus d'éthanol que les variétés dont la dureté est élevée. Les lignées isogéniques pour la dureté 10-10-13-2-1S (soft) et 10-10-13-2-4H (Hard) possèdent respectivement un rendement en glucose de 726.8 kg/t et 714.9 kg/t. Outre le fait que les variétés possédant une dureté faible nécessiteront moins d'énergie lors de l'étape du broyage et offrent donc un intérêt économique pour les industriels ; la dureté faible joue également sur la granulométrie du broyage et par conséquent sur son hydrolyse.

La distribution de la taille des granules d'amidon et la dureté sont deux caractéristiques technologiques du grain corrélées entre elles. En effet, plus une variété possède une dureté élevée plus la quantité de granules de petite taille qu'elle contient est importante. Ainsi, les variétés destinées à la production d'éthanol possédant à la fois une dureté faible et une quantité importante de granules de petite taille, sont peu nombreuses. Il convient donc d'étudier parmi les variétés possédant une quantité d'amidon élevée celles qui s'écartent de la corrélation entre la dureté et la taille des granules d'amidon et de rechercher plus particulièrement les variétés possédant une dureté faible tout en présentant une proportion de granules de type B et C importante. Dans cette optique de sélection, l'accumulation de l'amidon au sein des variétés ayant une dureté élevée doit être précisée, notamment en étudiant l'impact du gène majeur *Ha* et des nombreux autres gènes mineurs (Sourdille et al., 1996 ; Li et al., 2009) sur la distribution de la taille des granules d'amidon.

### **3. La composition en protéines de réserves et la teneur en arabinoxylanes : deux paramètres à considérer**

L'accessibilité des enzymes aux substrats et l'efficacité d'hydrolyse semblent être donc les points les plus importants après la quantité d'amidon pour améliorer la production de bioéthanol. Celles-ci pourront aussi être améliorées par la diminution des composés gênant l'hydrolyse de l'amidon, tels que les sucres autres que l'amidon (arabinoxylanes) et les protéines de réserves. Ainsi le triticale qui résulte du croisement entre le blé et le seigle n'est pas conseillé car généralement le génome R du seigle apporte plus d'arabinoxylanes.

Les protéines de réserves (gluténines et gliadines) ont quant à elles la capacité de former un réseau glutineux pouvant gêner l'hydrolyse enzymatique. L'étude des rendements en glucose et éthanol a permis de mettre en évidence un effet significatif des allèles nuls de *Glu-A1* et *Glu-A3* ainsi que certains allèles contribuant à une taille de polymères faible. Il conviendra donc d'étudier plus précisément l'effet de la présence d'allèles nuls aux autres loci des sous unités de gluténines de haut et faible poids moléculaires afin de déterminer si certains de ces allèles ont des effets notables sur le rendement en éthanol.

#### **4. Les lignées isogéniques waxy et les rendements en glucose et éthanol**

L'étude des lignées isogéniques possédant un, deux ou trois allèles nuls des gènes *waxy* ont permis d'apprécier l'effet du contenu en amylose sur les différentes caractéristiques technologiques du grain ainsi que sur les rendements en glucose et en éthanol. Plusieurs différences avec les lignées possédant les trois allèles fonctionnels des gènes *waxy* ont été mises en évidence et les principales concernaient les lignées presque totalement dépourvues d'amylose (possédant les trois allèles nuls).

La plus importante concerne la taille des granules et leur distribution. Ainsi les lignées isogéniques possédant les trois allèles nuls ont, d'une part, un contenu en granules de type B plus important que les lignées normales et, d'autre part, des granules de type A avec un diamètre plus faible de l'ordre de 20%. Cette diminution du diamètre moyen des granules d'amidon ainsi que l'augmentation du nombre de granules de petite taille (types B et C) chez les lignées triples nulles fut déjà observé par Geera et al., en 2006. Ces résultats suggèrent une diminution du remplissage des granules d'amidon. La croissance des granules semble donc incomplète du fait de l'absence de synthèse d'amylose dans le grain de blé. Les rendements en glucose et en éthanol de la lignée triple nulle confirment cette diminution de quantité d'amidon hydrolysable. En effet, la lignée triple nulle de Trémie possède un rendement en glucose de 707.6 kg/t contre 728 kg/t pour la forme normale de Trémie. Cette diminution de la quantité d'amidon chez les lignées *waxy* et par conséquent du rendement en éthanol fut déjà observée par Zhao et al., en 2009.

Cependant, un phénomène intéressant peut être noté pour ces lignées isogéniques : le temps de chute de Hagberg est très faible pour les lignées triples nulles ( $62,4s < t < 68,5s$ ) par rapport aux formes normales ( $218,5s < t < 362,2s$ ). D'une manière générale le temps de chute reflète l'activité  $\alpha$ -amylasique ayant lieu dans le grain de blé et renseigne sur l'état de germination de ce grain. Cependant Graybosch et al. ont montré que dans le cas des lignées *waxy*, il n'y a aucune relation avec l'activité des  $\alpha$ -amylases. C'est donc l'absence d'amylose

qui induit une diminution de la viscosité du moût lors de la gélatinisation de l'amidon, le rendant plus liquide. Ceci explique le temps de chute de Hagberg plus faible. Cette modification de la viscosité permet aux lignées isogéniques waxy d'avoir un meilleur taux de conversion de l'amidon en sucres fermentescibles par rapport aux lignées normales (Zhao et al., 2009). Cette caractéristique des lignées waxy montre bien que la quantité d'amidon pouvant être hydrolysé est le facteur le plus important dans le rendement en éthanol puisque ces lignées possédant un taux de conversion de l'amidon meilleur que les lignées normales produisent *in fine* moins d'éthanol du fait de leur plus faible teneur en amidon.

## **B. EFFETS DES ALLÈLES NULS WAXY SUR LA PHYSIOLOGIE DU GRAIN DE BLÉ**

Les rendements en glucose et éthanol des lignées waxy sont plus faibles que ceux des lignées normales car la quantité d'amidon présente dans ces lignées est moins importante. Cette différence s'explique en grande partie par l'arrêt de la synthèse de l'amylose qui représente dans un grain de blé normal environ 28% de l'amidon.

### **1. Effets des allèles nuls des trois gènes waxy sur les enzymes associées aux granules d'amidon**

L'effet des trois allèles nuls des gènes waxy a été étudié dans la fraction des enzymes associées aux granules d'amidon où les GBSS sont majoritairement présentes (50% des protéines). L'étude des différentes lignées isogéniques, possédant un, deux ou trois allèles nuls, a permis de déterminer l'effet de chacun des allèles sur la composition enzymatique des granules de ces lignées et sur la composition de l'amidon.

Comme démontré sur le maïs par Grimaud et al., en 2008, les allèles nuls des gènes waxy n'ont pas d'effet sur l'expression des gènes des enzymes impliquées dans la synthèse de l'amylopectine. Une diminution de la synthèse de l'amylose n'a pas d'effet sur l'expression des enzymes de la voie de synthèse de l'amylopectine.

Cependant, la mise en relation entre le contenu en amylose des différentes lignées et le niveau d'expression des GBSS a permis de quantifier avec précision l'effet de chacun des trois gènes des GBSS. Ainsi le gène associé au génome D (*Wx-D1a*) a un effet plus important sur la synthèse de l'amylose que le gène associé au génome B (*Wx-B1a*) qui lui-même a un effet beaucoup plus important que le gène associé au génome A (*Wx-A1a*). Ces observations sont proches de celles faites par Miura et al., en 1994 qui ont montré un faible effet de *Wx-A1a* sur la synthèse d'amylose en comparaison de *Wx-D1a* et *Wx-B1a*. Par

ailleurs, la mesure précise de la quantité d'amylose et du niveau d'expression des GBSS dans les lignées possédant deux allèles nuls ont permis de montrer que *Wx-D1a* n'a pas un effet additif contrairement à *Wx-B1a* et *Wx-A1a*.

Le gène associé au génome D conduit donc à un niveau d'expression des GBSS et de production d'amylose plus élevés que les gènes associés aux génomes A et B. La translocation d'un fragment du bras court du chromosome 7D contenant le locus *Wx-D1* et ses séquences promotrices sur le bras court du chromosome 7A permettrait vraisemblablement d'augmenter le contenu en amylose. Cette recombinaison déjà réussie pour le locus *Glu-D1* (Dumur et al., 2009) rendrait possible le doublement d'un gène aboutissant à l'augmentation de la quantité de GBSS au sein d'un même génotype. Cette approche permettrait d'augmenter la quantité d'amylose dans le grain sans utiliser des lignées transformées génétiquement pour les enzymes associées à la synthèse de l'amylopectine (Regina et al., 2006).

## **2. Effets des allèles nuls sur le métabolisme des sucres et de l'amidon**

L'étude par approche protéomique des fractions albumines-globulines et protéines amphiphiles des lignées isogéniques tend à confirmer l'hypothèse de croissance incomplète du grain de blé totalement dépourvu d'amylose.

En effet, les analyses protéomiques ont montré une baisse de l'expression de protéines qui normalement augmentent tout au long du développement du grain de blé. Parmi ces protéines, les serpinines ont été montrées comme systématiquement diminuées chez les lignées isogéniques waxy. Ces protéines intervenant dans les mécanismes de stress et de défense sont normalement accumulées tout au long du développement du grain de blé. (Vensel et al., 2005 ; Hurkman et al., 2009). Cette diminution suggère une accumulation incomplète de ces protéines pouvant s'expliquer par un retard de la croissance du grain par rapport à la lignée possédant les trois allèles fonctionnels.

Cette hypothèse de retard de croissance s'appuie par ailleurs sur les observations de la quantité d'amidon dans le grain ainsi que du poids de mille grains qui sont plus faibles chez les lignées waxy. L'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon confirme en partie cet état de fait. En effet, la baisse de l'expression de l'AGPase, enzyme catalysant la transformation du Glc-1P et de l'ATP en ADP-Glc (substrat de la synthèse de l'amidon), entraîne une diminution de la synthèse de l'amidon dans la lignée totalement waxy. Cette modification de l'expression d'une enzyme majeure de la synthèse de l'amidon conduit par conséquent à un remplissage du grain moins important.

D'autres enzymes de la voie métabolique des sucres et des pentoses voient elles aussi leur expression modifiée en réponse à la présence d'allèles nuls pour les gènes *waxy*. C'est le cas des sucroses synthases dont l'expression est constamment augmentée durant le développement du grain (Vensel et al., 2005). Dans le cas des lignées isogéniques *waxy*, l'expression de la sucrose synthase (Susy) est plus importante que chez la lignée possédant tous les allèles fonctionnels. Cette enzyme catalyse généralement la transformation du saccharose et de l'UDP en UDP-Glc et fructose mais peut aussi utiliser l'ADP pour former de l'ADP-Glc (Mukerjea et al., 2003 ; Munoz et al., 2005). Afin de compenser la diminution de l'expression de l'AGPase, responsable de la formation d'ADP-Glc dans le grain, l'expression d'une enzyme (Susy) pouvant produire le même sucre est donc augmentée chez les lignées isogéniques *waxy* afin de compenser la diminution de la quantité d'ADP-Glc et par conséquent d'amidon présent dans le grain.

Toutes ces observations de modifications d'expression d'enzymes de la voie de biosynthèse de l'amidon ont été faites sur grain mature. Afin de confirmer les changements d'expression d'enzymes chez les lignées isogéniques *waxy*, il conviendra d'étudier ces mêmes lignées isogéniques au cours du développement du grain. Cette étude permettra de confirmer les hypothèses émises quant à la participation des sucroses synthases à la fabrication d'ADP-Glc jamais observée dans les organes de réserves mais déjà démontrée dans les feuilles.

L'étude d'autres mutants complémentaires possédant la SGP-1 nulle et donc un taux d'amylose très élevé dans le grain (de l'ordre de 60%) constitue également une perspective intéressante. Elle offrirait la possibilité de préciser l'effet de ces mutants SGP-1 nuls sur les enzymes de la biosynthèse de l'amidon. Ces mutants permettraient d'accroître la variabilité pour la teneur en amylose, sucre lent ayant cette fois-ci un grand intérêt pour la nutrition et la santé humaine.

## **VIII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



**AACC, American Association of Cereal Chemists**, Approved methods of the AACC, ninth ed., 1999 The American Association of Cereal Chemistry, St Paul, MN

**ADEME**, 2010. Analyses de Cycle de Vie appliquées aux biocarburants de première génération consommés en France. [http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/rapport\\_final\\_acv\\_Biocarburants\\_France\\_version-definitive.pdf](http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_final_acv_Biocarburants_France_version-definitive.pdf)

**ADEME/DIREM/PriceWaterHouseCooper**, 2002. Bilans énergétiques et gaz à effet de serre des filières de production de biocarburants en France. [http://www.ademe.fr/partenaires/agriculture/publications/documents\\_francais/synthese\\_bilans\\_energetiques\\_fr.pdf](http://www.ademe.fr/partenaires/agriculture/publications/documents_francais/synthese_bilans_energetiques_fr.pdf)

**Agu, R.C., Bringham, T.A., Brosnan, J.M., Jack, F.R.**, 2008. Effect of process conditions on alcohol yield of wheat, maize and other cereals. *Journal of the Institute of Brewing* 114, 39-44.

**Agu, R.C., Swanston, J.S., Walker, J.W., Pearson, S.Y., Bringham, T.A., Brosnan, J.M., Jack, F.R.**, 2009. Predicting alcohol yield from UK soft winter wheat for grain distilling: combined influence of hardness and nitrogen measurements. *Journal of the Institute of Brewing* 115, 183-190.

**Ainsworth, C., Hosein, F., Tarvis, M., Weir, F., Burrell, M., Devos, K.M., Gale, M.D.**, 1995. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase genes in wheat: differential expression and gene mapping. *Planta* 197, 1-10.

**Amiour, N., Merlino, M., Leroy, P., Branlard, G.**, 2002. Proteomic analysis of amphiphilic proteins of hexaploid wheat kernels. *Proteomics* 2, 632-641.

**Amiour, N., Merlino, M., Leroy, P., Branlard, G.**, 2003. Chromosome mapping and identification of amphiphilic proteins of hexaploid wheat kernels. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 62-72.

**Antoine, C., Lullien-Pellerin, V., Abecassis, J., Rouau, X.**, 2002. Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer. *Sciences Des Aliments* 22, 545-556.

**Atkin, N.J., Abeysekera, R.M., Cheng, S.L., Robards, A.W.**, 1998. An experimentally-based predictive model for the separation of amylopectin subunits during starch gelatinization. *Carbohydrate Polymers* 36, 173-192.

**Baldwin, P.M.**, 2001. Starch granule-associated proteins and polypeptides: A review. *Starch-Starke* 53, 475-503.

**Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buleon, A., Colonna, P., Preiss, J.**, 1996. From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 86, 349-352.

**Ball, S.G., Van de Wal, M., Visser, R.G.F.**, 1998. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Science* 3, 462-467.

- Ballicora, M.A., Laughlin, M.J., Fu, Y.B., Okita, T.W., Barry, G.F., Preiss, J., 1995.** Adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato-tuber - significance of the N-terminus of the small-subunit for catalytic properties and heat-stability. *Plant Physiology* 109, 245-251.
- Ballicora, M.A., Frueauf, J.B., Fu, Y.B., Schurmann, P., Preiss, J., 2000.** Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 275, 1315-1320.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A.A., Preiss, J., 2003.** ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 213-225.
- Balmer, Y., Vensel W.H., Dupont, F.M., Buchanan B.B., Hurkman W.J., 2006.** Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. *Journal of Experimental Botany* 57, 1591-1602.
- Bancel, E., Rogniaux, H., Debiton, C., Chambon, C., Branlard, G., 2010.** Extraction and proteome analysis of starch granule-associated proteins in mature wheat kernel (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteome Research* 9, 3299-3310.
- Baroja-Fernandez, E., Munoz, F.J., Saikusa, T., Rodriguez-Lopez, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J., 2003.** Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant and Cell Physiology* 44, 500-509.
- Barredo Moguel, L.H., Rojas de Gante, C., Serna Saldivar, S.O., 2001.** Comparisons between a commercial wort and a waxy sorghum wort fermented into lager beer, with emphasis on yeast growth and ethanol production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 59, 24-27.
- Bechtel, D.B., Zayas, I., Kaleikau, L., Pomeranz, Y., 1990.** Size-distribution of wheat-starch granules during endosperm development. *Cereal Chemistry* 67, 59-63.
- Beckles, D.M., Craig, J., Smith, A.M., 2001.** ADP-glucose pyrophosphorylase is located in the plastid in developing tomato fruit. *Plant Physiology* 126, 261-266.
- Bertoft, E., 2004.** On the nature of categories of chains in amylopectin and their connection to the super helix model. *Carbohydrate Polymers* 57, 211-224.
- Boos, W., Shuman, H., 1998.** Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: Transport, metabolism, and regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 204-229.
- Boyer, C.D., Preiss, J., 1978.** Multiple forms of starch branching enzyme of maize - evidence for independent genetic-control. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 80, 169-175.
- Bradbury, D., MacMasters, M.M., Cull, I.M., 1956.** Structure of the mature wheat kernel.11. Microscopicstructure of pericarp, seed coat, and other coverings of the endosperm and germ of hard red winterwheat. *Cereal Chemistry* 33, 342-360.

**Bradford, M.**, 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

**Branlard, G., Dardevet, M., Saccomano, R., Lagoutte, F., Gourdon, J.**, 2001. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* 119, 59-67.

**Bresolin, N.S., Li, Z., Kosar-Hashemi, B., Tetlow, I.J., Chatterjee, M., Rahman, S., Morell, M.K., Howitt, C.A.**, 2006. Characterisation of disproportionating enzyme from wheat endosperm. *Planta* 224, 20-31.

**Briarty, L.G., Hughes, C.E., Evers, A.D.**, 1979. Developing endosperm of wheat - a stereological analysis. *Annals of Botany* 44, 641-658.

**Brosnan, J.M., Makari, S., Cochrane M.P.**, 1998. What makes a good distilling wheat? *In* Campbell, ed, Proceedings of the fifth Aviemore conference on malting, brewing and distilling. Institute of Brewing, London.

**Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S.**, 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.

**Burton, R.A., Jenner, H., Carrangis, L., Fahy, B., Fincher, G.B., Hylton, C., Laurie, D.A., Parker, M., Waite, D., van Wegen, S., Verhoeven, T., Denyer, K.**, 2002. Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant Journal* 31, 97-112.

**Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C.M., Seale, R., Nebane, N.M., Edwards, A., Martin, C., Smith, A.M.**, 2004. Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2215-2220.

**Caballero, L., Bancel, E., Debiton, C., Branlard, G.**, 2008. Granule-bound starch synthase (GBSS) diversity of ancient wheat and related species. *Plant Breeding* 127, 548-553.

**Cao H.P., Imparl-Radosevich J., Guan H.P., Keeling P.L., James M.G., Myers A.M.**, 1999. Identification of the soluble starch synthase activities of maize endosperm. *Plant Physiology* 120, 205-215.

**Capouchova, I., Petr, J., Maresova, D.**, 2003. Evaluation of size distribution of starch granules in selected wheat varieties by the Low Angle Laser Light Scattering method. *Plant Soil and Environment* 49, 12-17.

**Carré, B., Gomez, J., Melcion, J.P., Giboulot, B.**, 1994. La viscosité des aliments destinés à l'aviculture. Utilisation pour prédire la consommation et l'excrétion d'eau. *INRA Productions Animales* 7, 369-379.

**Caspar, T., Huber, S.C., Somerville, C.**, 1985. alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiology* 79, 11-17.

**Chao, S., Sharp, P.J., Worland, A.J., Warham, E.J., Koebner, R.M.D., Gale, M.D.,** 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homologous group-7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 78, 495-504.

**Chapman, G.P.,** 2009. Grass evolution and domestication. *Grass evolution and domestication*, xviii + 390 pp.

**Chatterjee, M., Berbezy, P., Vyas, D., Coates, S., Barsby, T.,** 2005. Reduced expression of a protein homologous to glycogenin leads to reduction of starch content in *Arabidopsis* leaves. *Plant Science* 168, 501-509.

**Chen, P.D., Gill, B.S.,** 1984. The origin of chromosome 4A and the B and G genomes of tetraploid wheat. *Acta Agronomica Sinica* 10, 146-153.

**Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D.Q., Goebel, M.G., Roach, P.J.,** 1995. Requirement of the self-glucosylating initiator proteins GLG1P and GLG2P for glycogen accumulation in *Saccharomyces-cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 15, 6632-6640.

**Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S.M., Smith, A.M.,** 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant Journal* 37, 853-863.

**Chrispeels, M.J., de Sa, M.F.G., Higgins, T.J.V.,** 1997. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids W-168 Symposium on Seed Biology and Technology - Applications and Advances. Ft Collins, Colorado, pp. 257-263.

**CITEPA,** 2010, Substances relatives à l'accroissement de l'effet de serre, [http://www.citepa.org/emissions/nationale/Ges/Emissions\\_FRmt\\_GES.pdf](http://www.citepa.org/emissions/nationale/Ges/Emissions_FRmt_GES.pdf)

**Colleoni, C., Dauvillee, D., Mouille, G., Morell, M., Samuel, M., Slomiany, M.C., Lienard, L., Wattebled, F., d'Hulst, C., Ball, S.,** 1999. Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiology* 120, 1005-1013.

**Commuri, P.D., Keeling, P.L.,** 2001. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant Journal* 25, 475-486.

**Conrads, J., Vanberkel, J., Schachtele, C., Steup, M.,** 1986. Non-chloroplast alpha-1,4-glucan phosphorylase from pea leaves - characterization and in situ localization by indirect immunofluorescence. *Biochimica Et Biophysica Acta* 882, 452-463.

**Corpet, F., Gouzy, J., Kahn, D.,** 1999. Recent improvements of the ProDom database of protein domain families. *Nucleic Acids Research* 27, 263-267.

**Craig, J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L., Smith, A.M.,** 1998. Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 10, 413-426.

**Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M., Smith, S.M.,** 2001. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 26, 89-100.

**Cross, J.M., Clancy, M., Shaw, J.R., Greene, T.W., Schmidt, R.R., Okita, T.W., Hannah, L.C.,** 2004. Both subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase are regulatory. *Plant Physiology* 135, 137-144.

**Dai, Z., Yin, Y., Wang, Z.,** 2009. Activities of key enzymes involved in starch synthesis in grains of wheat under different irrigation patterns. *Journal of Agricultural Science* 147, 437-444.

**Debiton, C., Bancel, E., Chambon, C., Rhazi, L., Branlard, G.,** 2010. Effect of the three waxy null alleles on enzymes associated to wheat starch granules using proteomic approach. Accepted for publication in *Journal of Cereal Science* Ref.: Ms. No. JCS10-169R1.

**De Fekete M.A.R., Leloir L.F., Cardini C.E.,** 1960. Mechanism of Starch Biosynthesis. *Nature* 187, 918-919

**Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M.L., Zeeman, S.C.,** 2005. *Arabidopsis* mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant Journal* 41, 815-830.

**Delvallé, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldan, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Merida, A., D'Hulst, C.,** 2005. Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Journal* 43, 398-412.

**Denyer, K., Barber, L.M., Burton, R., Hedley, C.L., Hylton, C.M., Johnson, S., Jones, D.A., Marshall, J., Smith, A.M., Tatge, H., Tomlinson, K., Wang, T.L.,** 1995a. The isolation and characterization of novel low-amylose mutants of *Pisum sativum* L. *Plant Cell and Environment* 18, 1019-1026.

**Denyer, K., Hylton, C.M., Jenner, C.F., Smith, A.M.,** 1995b. Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm. *Planta* 196, 256-265.

**Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H., Smith, A.M.,** 1996a. The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant Journal* 10, 1135-1143.

**Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjornsen, T., Keeling, P., Smith, A.M.,** 1996b. The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiology* 112, 779-785.

**Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A.M.,** 2001. The control of amylose synthesis. *Journal of Plant Physiology* 158, 479-487.

**Denyer, K., Waite, D., Edwards, A., Martin, C., Smith, A.M.,** 1999a. Interaction with amylopectin influences the ability of granule-bound starch synthase I to elongate malto-oligosaccharides. *Biochemical Journal* 342, 647-653.

**Denyer, K., Waite, D., Motawia, S., Moller, B.L., Smith, A.M.,** 1999b. Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochemical Journal* 340, 183-191.

**Dhugga, K.S., Tiwari, S.C., Ray, P.M.,** 1997. A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: Purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7679-7684.

**Dian, W.M., Jiang, H.W., Wu, P.,** 2005. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. *Journal of Experimental Botany* 56, 623-632.

**Dinges, J.R., Colleoni, C., James, M.G., Myers, A.M.,** 2003. Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell* 15, 666-680.

**Doan, D.N.P., Rudi, H., Olsen, O.A.,** 1999. The allosterically unregulated isoform of ADP-glucose pyrophosphorylase from barley endosperm is the most likely source of ADP-glucose incorporated into endosperm starch. *Plant Physiology* 121, 965-975.

**Donovan, J.W.,** 1979. Phase-transitions of the starch-water system. *Biopolymers* 18, 263-275.

**Dubreil, L., Compoin, J.P., Marion, D.,** 1997. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 108-116.

**Dumur, J., Branlard, G., Tanguy, A.M., Dardevet, M., Coriton, O., Huteau, V., Lemoine, J., Jahier, J.,** 2009. Development of isohomoeoallelic lines within the wheat cv. Courtot for high molecular weight glutenin subunits: transfer of the Glu-D1 locus to chromosome 1A. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 119, 471-481.

**Dupont, F.M.,** 2008. Metabolic pathways of the wheat (*Triticum aestivum*) endosperm amyloplast revealed by proteomics. *BMC Plant Biology* 8, 39-57.

**Duwenig, E., Steup, M., Willmitzer, L., Kossmann, J.,** 1997. Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant Journal* 12, 323-333.

**Ebio, european bioethanol fuel association** 2009a. Bioethanol Fuel in the european union. [http://ebio.org/downloads/fact\\_sheets/091116\\_ethanol\\_production.pdf](http://ebio.org/downloads/fact_sheets/091116_ethanol_production.pdf)

**Ebio, european bioethanol fuel association** 2009b. European bioethanol: jobs and growth. [http://ebio.org/downloads/fact\\_sheets/091116\\_jobs\\_&\\_growth.pdf](http://ebio.org/downloads/fact_sheets/091116_jobs_&_growth.pdf)

**Ebio, european bioethanol fuel association** 2010. 2009 showed again growth in fuel ethanol production and consumption. <http://www.ebio.org/uploads/100728%20PR%20on%20P&C%202009%20def.pdf>

**Echt, C.S., Schwartz, D.**, 1981. Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the waxy locus in maize. *Genetics* 99, 275-284.

**Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S.M., Steup, M., Ritte, G.**, 2007. Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial beta-amylases. *Plant Physiology* 145, 17-28.

**Edwards, A., Marshall, J., Sidebottom, C., Visser, R.G.F., Smith, A.M., Martin, C.**, 1995. Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato-tubers. *Plant Journal* 8, 283-294.

**Edwards, A., Borthakur, A., Bornemann, S., Venail, L., Denyer, K., Waite, D., Fulton, D., Smith, A., Martin, C.**, 1999. Specificity of starch synthase isoforms from potato. *European Journal of Biochemistry* 266, 724-736.

**ENERS Energy concept**, 2009. La production de bioéthanol dans l'UE. <http://www.plateforme-biocarburants.ch/infos/eu-bioethanol.php>

**Eriksson, G.**, 1962. Radiation induced reversions of a waxy allele in barley. *Radiation Botany* 2, 35-39.

**Evans, I.D., Haisman, D.R.**, 1982. The effect of solutes on the gelatinization temperature-range of potato starch. *Starke* 34, 224-231.

**Evers, A.D., Bechtel, D.B.**, 1988. Microscopic structure of the wheat grain. *Wheat: chemistry and technology*. Volume I., 47-95.

**Evers, A.D., Blakeney, A.B., O'Brien, L.**, 1999. Cereal structure and composition. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 629-650.

**Evers, T., Millar, S.**, 2002. Cereal grain structure and development: some implication for quality. *Journal of Cereal Science* 36, 261-284.

**FAO**, 2008, Biocarburants : perspectives risques et opportunités, ISBN 978-92-5-205980-6, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100f/i0100f.pdf>

**FAOstat** <http://faostat.fao.org>

**Fincher, G.B.**, 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal-grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 305-346.

**Fox, S.R., Rawsthorne, S., Hills, M.J.**, 2001. Fatty acid synthesis in pea root plastids is inhibited by the action of long-chain acyl-coenzyme as on metabolite transporters. *Plant Physiology* 126, 1259-1265.

**France export céréales** <http://franceexportcereales.org/spip.php?article53>

**French, D.**, 1972. Fine structure of starch and its relationship to the organization of starch granules. *Journal of Japanese Society Starch Science* 19, 8-25.

**French, D.** 1984. Organization of starch granules. In: *Starch: Chemistry and Technology*. R. L. Whistler, J. N. Bemiller, and E. F. Paschall, eds. Academic Press, Orlando, FL. pp183-247

**Fu, Y.B., Ballicora, M.A., Leykam, J.F., Preiss, J.**, 1998. Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25045-25052.

**Fujita, N., Hasegawa, H., Taira, T.**, 2001. The isolation and characterization of a waxy mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Plant Science* 160, 595-602.

**Fujita, N., Kubo, A., Suh, D.S., Wong, K.S., Jane, J.L., Ozawa, K., Takaiwa, F., Inaba, Y., Nakamura, Y.**, 2003. Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. *Plant and Cell Physiology* 44, 607-618.

**Fujita, N., Yoshida, M., Asakura, N., Ohdan, T., Miyao, A., Hirochika, H., Nakamura, Y.**, 2006. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiology* 140, 1070-1084.

**Fujita, N., Yoshida, M., Kondo, T., Saito, K., Utsumi, Y., Tokunaga, T., Nishi, A., Satoh, H., Park, J.H., Jane, J.L., Miyao, A., Hirochika, H., Nakamura, Y.**, 2007. Characterization of SSIIIa-Deficient mutants of rice: The function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiology* 144, 2009-2023.

**Fujita, N., Toyosawa, Y., Utsumi, Y., Higuchi, T., Hanashiro L., Ikegami, A., Akuzawa, S., Yoshida, M., Mori, A., Inomata, K., Itoh, R., Miyao, A., Hirochika, H., Satoh, H., Nakamura, Y.** 2009. Characterization of pullulanase (PUL)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm. *Journal of Experimental Botany* 60, 1009-1023.

**Fulcher, R.G., Wong, S.I.**, 1980. Inside Cereals — a fluorescence microchemical view. In cereals for food and beverages, Inglett GE, Munck L (eds) New York, Academic Press pp 1-26.

**Furukawa, K., Tagaya, M., Inouye, M., Preiss, J., Fukui, T.**, 1990. Identification of lysine-15 at the active-site in *Escherichia coli* glycogen-synthase - conservation of a lys-x-gly-gly sequence in the bacterial and mammalian enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 265, 2086-2090.

**Furukawa, K., Tagaya, M., Tanizawa, K., Fukui, T.**, 1993. Role of the conserved LYS-X-GLY-GLY sequence at the adp-glucose-binding site in *Escherichia-coli* glycogen-synthase. *Journal of Biological Chemistry* 268, 23837-23842.

**Gallant, D.J., Bouchet, B., Baldwin, P.M.**, 1997. Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers* 32, 177-191.



**Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., Ottado, J.,** 2009. Hsp70 and Hsp90 expression in citrus and pepper plants in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *European Journal of Plant Pathology* 123, 91-97.

**Gao, M., Wanat, J., Stinard, P.S., James, M.G., Myers, A.M.,** 1998. Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell* 10, 399-412.

**Geera, B.P., Nelson, J.E., Souza, E., Huber, K.C.,** 2006. Composition and properties of A- and B-type starch granules of wild-type, partial waxy, and waxy soft wheat. *Cereal Chemistry* 83, 551-557.

**GE Healthcare,** 2004. 2-D Electrophoresis : principles and methods. [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/4EE093B6C6B7BB18C1257628001D252E/\\$file/80642960AC.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/4EE093B6C6B7BB18C1257628001D252E/$file/80642960AC.pdf)

**Geigenberger, P., Kolbe, A., Tiessen, A.,** 2005. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany* 56, 1469-1479.

**Gidley, M.J., Bociek, S.M.,** 1985. Molecular-organization in starches - A C-13 CP MAS NMR-study. *Journal of the American Chemical Society* 107, 7040-7044.

**Gidley, M.J., Bulpin, P.V.,** 1987. Crystallization of maltooligosaccharides as models of the crystalline forms of starch - minimum chain-length requirement for the formation of double helices. *Carbohydrate Research* 161, 291-300.

**Gill, B.S., Kimber, G.,** 1974. Giemsa c-banding and evolution of wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 4086-4090.

**Gomez-Casati, D.F., Iglesias, A.A.,** 2002. ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat endosperm. Purification and characterization of an enzyme with novel regulatory properties. *Planta* 214, 428-434.

**Graybosch, R.A., Guo, G., Shelton, D.R.,** 2000. Aberrant falling numbers of waxy wheats independent of alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry* 77, 1-3.

**Graybosch, R.A., Souza, E., Berzonsky, W., Baenziger, P.S., Chung, O.,** 2003. Functional properties of waxy wheat flours: genotypic and environmental effects. *Journal of Cereal Science* 38, 69-76.

**Greene, T.W., Hannah, L.C.,** 1998. Maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase SHRUNKEN2 and BRITTLE2 subunit interactions. *Plant Cell* 10, 1295-1306.

**Grimaud, F., Rogniaux, H., James, M.G., Myers, A.M., Planchot, V.,** 2008. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59, 3395-3406.

**Grimaud, F.,** 2008. Protéomique de l'amyloplaste et de grains d'amidon de maïs sauvages et mutants. Thèse de Doctorat soutenue à l'université de Nantes pp 218.

**Guan, H.P., Preiss, J.,** 1993. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiology* 102, 1269-1273.

**Guan, H.P., Keeling, P.L.,** 1998. Starch biosynthesis: Understanding the functions and interactions of multiple isozymes of starch synthase and branching enzyme. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 10, 307-319.

**Hanashiro, I., Abe, J., Hizukuri, S.,** 1996. A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. *Carbohydrate Research* 283, 151-159.

**Hanson, K.R., McHale, N.A.,** 1988. A starchless mutant of *Nicotiana-sylvestris* containing a modified plastid phosphoglucomutase. *Plant Physiology* 88, 838-844.

**Harrison, C.J., Hedley, C.L., Wang, T.L.,** 1998. Evidence that the rug3 locus of pea (*Pisum sativum* L.) encodes plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *Plant Journal* 13, 753-762.

**Haugen, T.H., Ishaque, A., Preiss, J.,** 1976. Biosynthesis of bacterial glycogen .16. characterization of subunit structure of *Escherichiacoli*  $\beta$ -glucose-1-phosphate adenylyltransferase (EC 2.7.7.27). *Journal of Biological Chemistry* 251, 7880-7885.

**Hendriks, J.H.M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., Geigenberger, P.,** 2003. ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiology* 133, 838-849.

**Hennen-Bierwagen, T.A., Lin, Q., Grimaud, F., Planchot, V., Keeling, P.L., James, M.G., Myers, A.M.,** 2009. Proteins from Multiple Metabolic Pathways Associate with Starch Biosynthetic Enzymes in High Molecular Weight Complexes: A Model for Regulation of Carbon Allocation in Maize Amyloplasts. *Plant Physiology* 149, 1541-1559.

**Hinton J.J.C.,** 1955. Resistance of the testa to entry of water into wheat kernel. *Cereal Chemistry* 32, 296-306.

**Hirose, T., Terao, T.,** 2004. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 220, 9-16.

**Hizukuri, S., Takeda, Y., Yasuda, M., Suzuki, A.,** 1981. Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrate Research* 94, 205-213.

**Hizukuri, S.,** 1986. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research* 147, 342-347.

**Hizukuri, S., Takeda, Y., Maruta, N., Juliano, B.O.,** 1989. Molecular-structures of rice starch. *Carbohydrate Research* 189, 227-235.

**Hizukuri, S.,** 1993. Towards an understanding of the fine structure of starch molecules. *Denpun Kagaku* 40, 133-147.

- Hovenkamp-Hermelink, J.H.M., Jacobsen, E., Ponstein, A.S., Visser, R.G.F., Vosscheperkeuter, G.H., Bijmolt, E.W., Devries, J.N., Witholt, B., Feenstra, W.J., 1987.** Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L). *Theoretical and Applied Genetics* 75, 217-221.
- Hundertmark, M., Hinch, D.K., 2008.** LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118-140.
- Hurkman, W.J., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Whitehand, L., Altenbach, S.B., 2009.** Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain. *Journal of Cereal Science* 49, 12-23.
- Hussain, H., Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bornemann, S., Smith, A.M., Martin, C., Bustos, R., 2003.** Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell* 15, 133-149.
- Igrejas, G., Gaborit, T., Oury, F.X., Chiron, H., Marion, D., Branlard, G., 2001.** Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationship to technological properties in French bread wheats. *Journal of Cereal Science* 34, 37-47.
- Imberty, A., Buleon, A., Tran, V., Perez, S., 1991.** Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch-Starke* 43, 375-384.
- Inouchi, N., Glover, D.V., Takaya, T., Fuwa, H., 1983.** Development changes in fine-structure of starches of several endosperm mutants of maize. *Starke* 35, 371-376.
- Isshiki, M., Nakajima, M., Satoh, H., Shimamoto, K., 2000.** Dull: rice mutants with tissue-specific effects on the splicing of the waxy pre-mRNA. *Plant Journal* 23, 451-460.
- James, M.G., Robertson, D.S., Myers, A.M., 1995.** Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* 7, 417-429.
- James, M.G., Denyer, K., Myers, A.M., 2003.** Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 215-222.
- Jayakody, L., Hoover, R., 2008.** Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins - A review. *Carbohydrate Polymers* 74, 691-703.
- Jenkins, P.J., Cameron, R.E., Donald, A.M., Bras, W., Derbyshire, G.E., Mant, G.R., Ryan, A.J., 1994.** In-situ simultaneous small and wide-angle x-ray-scattering - a new technique to study starch gelatinization. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* 32, 1579-1583.
- Jenkins, P.J., Donald, A.M., 1995.** The influence of amylose on starch granule structure. *International Journal of Biological Macromolecules* 17, 315-321.
- Jeon, J.S., Ryoo, N., Hahn, T.R., Walia, H., Nakamura, Y., 2010.** Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant physiology and Biochemistry* 48, 383-392.

**Johnson, P.E., Patron, N.J., Bottrill, A.R., Dinges, J.R., Fahy, B.F., Parker, M.L., Waite, D.N., Denyer, K.,** 2003. A low-starch barley mutant, Riso 16, lacking the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiology* 131, 684-696.

**JRC,** 2008. Description and detailed energy and GHG balance of individual pathways. WTT Appendix 2.

<http://ies.jrc.ec.europa.eu/uploads/media/WTT%20App%202%20v30%20181108.pdf>

**Karapantsios, T.D., Sakonidou, E.P., Raphaelides, S.N.,** 2002. Water dispersion kinetics during starch gelatinization. *Carbohydrate Polymers* 49, 479-490.

**Kindred, D.R., Verhoeven, T.M.O., Weightman, R.M., Swanston, J.S., Aguc, R.C., Brosnan, J.M., Sylvester-Bradley, R.,** 2008. Effects of variety and fertiliser nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and protein content, and protein composition of winter wheat. *Journal of Cereal Science* 48, 46-57.

**Kleczkowski, L.A., Volland, P., Luthi, E., Olsen, O.A., Preiss, J.,** 1993. Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiology* 101, 179-186.

**Knight, M.E., Harn, C., Lilley, C.E.R., Guan, H.P., Singletary, G.W., Mu-Forster, C.M., Wasserman, B.P., Keeling, P.L.,** 1998. Molecular cloning of starch synthase I from maize (W64) endosperm and expression in *Escherichia coli*. *Plant Journal* 14, 613-622.

**Koliatsou, M., Palmer, G.H.,** 2003. A new method to assess mealiness and steeliness of barley varieties and relationship of mealiness with malting parameters. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 61, 114-118.

**Kossman, J. and Lloyd, J.,** 2000. Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Reviews in Plant Science* 19, 171-226.

**Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M., Ritte, G.,** 2005. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiology* 137, 242-252.

**Kubo, A., Fujita, N., Harada, K., Matsuda, T., Satoh, H., Nakamura, Y.,** 1999. The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiology* 121, 399-409.

**Kubo, A., Rahman, S., Utsumi, Y., Li, Z., Mukai, Y., Yamamoto, M., Ugaki, M., Harada, K., Satoh, H., Konik-Rose, C., Morell, M., Nakamura, Y.,** 2005. Complementation of sugary-1 phenotype in rice endosperm with the wheat *isoamylase1* gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiology* 137, 43-56.

**Lafiandra, D., Sestili, F., Bucelli, A.S., Silvestri, M., Ambrogio, E.D.,** 2008. Genetic modification of starch composition in wheat Cereal science and technology for feeding ten billion people: genomics era and beyond. Proceedings of the meeting of the Eucarpia Cereal Section, Lleida, Spain, 13-17 November 2006, pp. 267-270.

**Lang, X.S., Hill, G.A., MacDonald, D.G., 2001.** Recycle bioreactor for bioethanol production from wheat starch I. Cold enzyme hydrolysis. *Energy Sources* 23, 417-425.

**Lee, S.K., Hwang, S.K., Han, M., Eom, J.S., Kang, H.G., Han, Y., Choi, S.B., Cho, M.H., Bhoo, S.H., An, G., Hahn, T.R., Okita, T.W., Jeon, J.S., 2007.** Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 65, 531-546.

**Les cahiers de global chance, 2007.** Energies renouvelables développement et environnement : discours, réalités et perspectives pp112-114

**Lever, M., 1972.** A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 47, 273-279.

**Li, Y., Song, Y., Zhou, R., Branlard, G., Jia, J., 2009.** Detection of QTLs for bread-making quality in wheat using a recombinant inbred line population. *Plant Breeding* 128, 235-243

**Li, Z., Rahman, S., Kosar-Hashemi, B., Mouille, G., Appels, R., Morell, M.K., 1999.** Cloning and characterization of a gene encoding wheat starch synthase I. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 1208-1216.

**Li, Z.Y., Mouille, G., Kosar-Hashemi, B., Rahman, S., Clarke, B., Gale, K.R., Appels, R., Morell, M.K., 2000.** The structure and expression of the wheat starch synthase III gene. Motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase III gene family. *Plant Physiology* 123, 613-624.

**Li, Z., Sun, F., Xu, S., Chu, X., Mukai, Y., Yamamoto, M., Ali, S., Rampling, L., Kosar-Hashemi, B., Rahman, S., Morell, M.K., 2003.** The structural organisation of the gene encoding class II starch synthase of wheat and barley and the evolution of the genes encoding starch synthases in plants. *Functional & Integrative Genomics* 3, 76-85.

**Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C.R., Preiss, J., 1988.** A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADP glucose pyrophosphorylase activity lacks one of the 2 subunits of the enzyme. *Plant Physiology* 88, 1175-1181.

**Lloyd, J.R., Blennow, A., Burhenne, K., Kossmann, J., 2004.** Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiology* 134, 1347-1354.

**Lorberth, R., Ritte, G., Willmitzer, L., Kossmann, J., 1998.** Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nature Biotechnology* 16, 473-477.

**Mangelsdorf, P.C., 1947.** The inheritance of amylaceous sugary endosperm and its derivatives in maize. *Genetics* 32, 448-458

- Martre, P., Jamieson, P.D., Semenov, M.A., Zyskowski, R.F., Porter, J.R., Triboi, E.,** 2006. Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *European Journal of Agronomy* 25, 138-154.
- McKevith, B.,** 2004. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin* 29, 111-142.
- Merlino, M., Leroy, P., Chambon, C., Branlard, G.,** 2009. Mapping and proteomic analysis of albumin and globulin proteins in hexaploid wheat kernels (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118, 1321-1337.
- Miles, M.J., Morris, V.J., Orford, P.D., Ring, S.G.,** 1985. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research* 135, 271-281.
- Miura, H., Tanii, S., Nakamura, T., Watanabe, N.,** 1994. Genetic-control of amylose content in wheat endosperm starch and differential-effects of 3 *wx* genes. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 276-280.
- Miura, H., Sugawara, A.,** 1996. Dosage effects of the three *Wx* genes on amylose synthesis in wheat endosperm. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 1066-1070.
- Miura, H., Araki, E., Tarui, S.,** 1999. Amylose synthesis capacity of the three *Wx* genes of wheat cv. Chinese Spring. *Euphytica* 108, 91-95.
- Mizuno, K., Kawasaki, T., Shimada, H., Satoh, H., Kobayashi, E., Okumura, S., Arai, Y., Baba, T.,** 1993. Alteration of the structural-properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. *Journal of Biological Chemistry* 268, 19084-19091.
- Mizuno, K., Kobayashi, E., Tachibana, M., Kawasaki, T., Fujimura, T., Funane, K., Kobayashi, M., Baba, T.,** 2001. Characterization of an isoform of rice starch branching enzyme, RBE4, in developing seeds. *Plant and Cell Physiology* 42, 349-357.
- Moing, A., Carbonne, F., Rashad, M.H., Gaudillere, J.P.,** 1992. Carbon fluxes in mature peach leaves. *Plant Physiology* 100, 1878-1884.
- Morell, M.K., Bloom, M., Knowles, V., Preiss, J.,** 1987. Subunit structure of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* 85, 182-187.
- Morell, M.K., Blennow, A., Kosar-Hashemi, B., Samuel, M.S.,** 1997. Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiology* 113, 201-208.
- Morell, M.K., Li, Z., Rahman, S.,** 2001. Starch biosynthesis in the small grained cereals: Wheat and barley. *Starch: Advances in Structure and Function*, 129-137.
- Morell, M.K., Kosar-Hashemi, B., Cmiel, M., Samuel, M.S., Chandler, P., Rahman, S., Buleon, A., Batey, I.L., Li, Z.Y.,** 2003. Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant Journal* 34, 172-184.

**Mu-Forster, C., Huang, R.M., Powers, J.R., Harriman, R.W., Knight, M., Singletary, G.W., Keeling, P.L., Wasserman, B.P.,** 1996. Physical association of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm - Granule-associated forms of starch synthase I and starch branching enzyme II. *Plant Physiology* 111, 821-829.

**Mua, J.P., Jackson, D.S.,** 1997. Relationships between functional attributes and molecular structures of amylose and amylopectin fractions from corn starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3848-3854.

**Mukerjea, R., Robyt, J.F.,** 2003. Starch biosynthesis: sucrose as a substrate for the synthesis of a highly branched component found in 12 varieties of starches. *Carbohydrate Research* 338, 1811-1822.

**Müller-Röber, B.T., Kossmann, J., Hannah, L.C., Willmitzer, L., Sonnewald, U.,** 1990. One of 2 different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Molecular & General Genetics* 224, 136-146.

**Munoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Moran-Zorzano, M.T., Viale, A.M., Etxeberria, E., Alonso-Casajus, N., Pozueta-Romero, J.,** 2005. Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant and Cell Physiology* 46, 1366-1376.

**Murai, J., Taira, T., Ohta, D.,** 1999. Isolation and characterization of the three Waxy genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene* 234, 71-79.

**Myers, A.M., Morell, M.K., James, M.G., Ball, S.G.,** 2000. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology* 122, 989-997.

**Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S.,** 1993. Identification of 3 wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L). *Biochemical Genetics* 31, 75-86.

**Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., Nagamine, T.,** 1995. Production of waxy (amylose-free) wheats. *Molecular and General Genetics* 248, 253-259.

**Nakamura, Y.,** 1996. Some properties of starch debranching enzymes and their possible role in amylopectin biosynthesis. *Plant Science* 121, 1-18.

**Nakamura, Y.,** 2002. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: Rice endosperm as a model tissue. *Plant and Cell Physiology* 43, 718-725.

**Nelson O.E., Rines H.W.,** 1962. The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochemical and biophysical research communications* 9, 297-300

**Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.,** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric-focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.

**Nielsen, T.H., Krapp, A., Roper-Schwarz, U., Stitt, M.,** 1998. The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant Cell and Environment* 21, 443-454.

**Nishi, A., Nakamura, Y., Tanaka, N., Satoh, H.,** 2001. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiology* 127, 459-472.

**O'Farell, P.,** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological Chemistry* 250, 4007-4021.

**Ohdan, T., Francisco, P.B., Sawada, T., Hirose, T., Terao, T., Satoh, H., Nakamura, Y.,** 2005. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *Journal of Experimental Botany* 56, 3229-3244.

**Okita, T.W.,** 1992. Is there an alternative pathway for starch synthesis? *Plant Physiology* 100, 560-564.

**Okita, T.W., Nakata, P.A., Anderson, J.M., Sowokinos, J., Morell, M., Preiss, J.,** 1990. The subunit structure of potato-tuber ADP glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* 93, 785-790.

**ONIGC** <http://www.onigc.fr/>

**Oostergetel, G.T., Van Bruggen, E.F.J.,** 1989. On the origin of a low-angle spacing in starch. *Starch-Starke* 41, 331-335.

**Oostergetel, G.T., Van Bruggen, E.F.J.,** 1993. The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. *Carbohydrate Polymers* 21, 7-12.

**Osborne T.B.,** 1907. The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institute, Washington DC Publication 84, 1-119.

**Osborne T.B.,** 1924. The vegetables proteins 2nd edition. Longmans, Green & Co edition London, England, pp 154.

**Pan, D., Nelson, O.E.,** 1984. A debranching enzyme deficiency in endosperms of the *sugary-1* mutants of maize. *Plant Physiology* 74, 324-328.

**Park, Y.K., Rivera, B.C.,** 1982. Alcohol production from various enzyme-converted starches with or without cooking. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 495-500.

**Patron, N.J., Smith, A.M., Fahy, B.F., Hylton, C.M., Naldrett, M.J., Rossnagel, B.G., Denyer, K.,** 2002. The altered pattern of amylose accumulation in the endosperm of low-amylose barley cultivars is attributable to a single mutant allele of granule-bound starch synthase I with a deletion in the 5'-non-coding region. *Plant Physiology* 130, 190-198.

**Patron, N.J., Greber, B., Fahy, B.E., Laurie, D.A., Parker, M.L., Denyer, K.,** 2004. The *lys5* mutations of barley reveal the nature and importance of plastidial ADP-Glc transporters for starch synthesis in cereal endosperm. *Plant Physiology* 135, 2088-2097.



**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 high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Research Communications* 11, 29-35.

**Peat, S., Whelan, W.J., Thomas, G.J.**, 1952. Evidence of multiple branching in waxy maize starch. *Journal of Chemist Society* 4546–4548.

**Peat, S., Whelan, W.J., Thomas, G.J.**, 1956. The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XXII. Evidence of multiple branching in waxy-maize starch. *Journal of Chemist Society* 3025–3030.

**Pomeranz, Y.**, 1988. Chemical composition of kernel structures. *Wheat: chemistry and technology*. Volume I., 97-158.

**Popov, D., Buleon, A., Burghammer, M., Chanzy, H., Montesanti, N., Putaux, J.L., Potocki-Veronese, G., Riekkel, C.**, 2009. Crystal Structure of A-amylose: A Revisit from Synchrotron Microdiffraction Analysis of Single Crystals. *Macromolecules* 42, 1167-1174.

**Preiss, J., Ball, K., Smithwhite, B., Iglesias, A., Kakefuda, G., Li, L.**, 1991. Starch biosynthesis and its regulation. *Biochemical Society Transactions* 19, 539-547.

**Preiss, J.**, 1996. Specific functions of the starch biosynthetic enzymes. *Carbohydrates in Europe* 15, 11-14.

**Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C.**, 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of proteomics* doi:10.1016/j.jprot.2010.05.016

**Raeker, M.O., Gaines, C.S., Finney, P.L., Donelson, T.**, 1998. Granule size distribution and chemical composition of starches from 12 soft wheat cultivars. *Cereal Chemistry* 75, 721-728.

**Rahman, S., Regina, A., Li, Z.Y., Mukai, Y., Yamamoto, M., Kosar-Hashemi, B., Abrahams, S., Morell, M.K.**, 2001. Comparison of starch-branching enzyme genes reveals evolutionary relationships among isoforms. Characterization of a gene for starch-branching enzyme IIa from the wheat D genome donor *Aegilops tauschii*. *Plant Physiology* 125, 1314-1324.

**Rajagopal, D., Zilberman, D.**, 2007. Review of Environmental, Economic and Policy Aspects of Biofuels. World Bank Policy Research Working Paper No. 4341. Available at SSRN: <http://ssrn.com/abstract=1012473>

**Ral, J.P., Colleoni, C., Wattedled, F., Dauvillee, D., Nempont, C., Deschamps, P., Li, Z.Y., Morell, M.K., Chibbar, R., Purton, S., d'Hulst, C., Ball, S.G.**, 2006. Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 142, 305-317.

**Ral, J.P., Derelle, E., Ferraz, C., Wattebled, F., Farinas, B., Corellou, F., Buleon, A., Slomianny, M.C., Delvalle, D., d'Hulst, C., Rombauts, S., Moreau, H., Ball, S., 2004.** Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri* (L.W.). *Plant Physiology* 136, 3333-3340.

**Ratnayake, W.S., Jackson, D.S., 2007.** A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydrate Polymers* 67, 511-529.

**Regina, A., Kosar-Hashemi, B., Li, Z.Y., Pedler, A., Mukai, Y., Yamamoto, M., Gale, K., Sharp, P., Morell, M.K., Rahman, S., 2005.** Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-syntenic locus. *Planta* 222, 899-909.

**Riffkin, H.L., Bringham, T.A., McDonald, A.M.L., Hands, E., 1990.** Utilisation of wheat in the Scotch whisky industry. *Ferment* 3, 3 (5) 288-292.

**Ritte, G., Lloyd, J.R., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J., Steup, M., 2002.** The starch-related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7166-7171.

**Ritte, G., Heydenreich, M., Mahlow, S., Haebel, S., Kotting, O., Steup, M., 2006.** Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *Febs Letters* 580, 4872-4876.

**Roach, P.J., Skurat, A.V., 1997.** Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 57, 289-316.

**Roberts, T.H., Hejgaard, J., 2008.** Serpins in plants and green algae. *Functional & Integrative Genomics* 8, 1-27.

**Robin, J.P., Mercier, C., Charbonn.R, Guilbot, A., 1974.** Lintnerized starches gel-filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry* 51, 389-406.

**Robin, J.P., Mercier, C., Duprat, F., Charbonniere, R., Guilbot, A., 1975.** Lintnerized starches - chromatographic and enzymatic studies of insoluble residues from acid-hydrolysis of various cereal starches, particularly waxy maize starch. *Starke* 27, 36-45.

**Roldan, I., Wattebled, F., Lucas, M.M., Delvalle, D., Planchot, V., Jimenez, S., Perez, R., Ball, S., D'Hulst, C., Merida, A., 2007.** The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant Journal* 49, 492-504.

**Rosti, S., Rudi, H., Rudi, K., Opsahl-Sorteberg, H.G., Fahy, B., Denyer, K., 2006.** The gene encoding the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase in barley endosperm also encodes the major plastidial small subunit in the leaves. *Journal of Experimental Botany* 57, 3619-3626.

**Rydberg, U., Andersson, L., Andersson, R., Aman, P., Larsson, H.,** 2001. Comparison of starch branching enzyme I and II from potato. *European Journal of Biochemistry* 268, 6140-6145.

**Ryoo, N., Yu, C., Park, C.S., Baik, M.Y., Park, I.M., Cho, M.H., Bhoo, S.H., An, G., Hahn, T.R., Jeon, J.S.,** 2007. Knockout of a starch synthase gene *OsSSIIIa/Flo5* causes white-core floury endosperm in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell* 26, 1083-1095.

**Sano, Y.,** 1984. Differential regulation of waxy gene-expression in rice endosperm. *Theoretical and Applied Genetics* 68, 467-473.

**Sasaki, T., Yasui, T., Matsuki, J.,** 2000. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starches from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. *Cereal Chemistry* 77, 58-63.

**Satoh, H., Nishi, A., Yamashita, K., Takemoto, Y., Tanaka, Y., Hosaka, Y., Sakurai, A., Fujita, N., Nakamura, Y.,** 2003. Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiology* 133, 1111-1121.

**Satoh, H., Shibahara, K., Tokunaga, T., Nishi, A., Tasaki, M., Hwang, S.K., Okita, T.W., Kaneko, N., Fujita, M., Yoshida, M., Hosaka, Y., Sato, A., Utsumi, Y., Ohdan, T., Nakamura, Y.,** 2008. Mutation of the plastidial alpha-glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *Plant cell* 20, 1833-1849.

**Saulnier, L., Peneau, N., Thibault, J.F.,** 1995. Variability in grain extract viscosity and water-soluble arabinoxylan content in wheat. *Journal of Cereal Science* 22, 259-264.

**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.

**Scheible, W.R., GonzalezFontes, A., Lauerer, M., Müller-Röber, B., Caboche, M., Stitt, M.,** 1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9, 783-798.

**Schulze, T., Krenn, W., Potschacher, P.,** 2005. Basic considerations and concepts in the planning and construction of grain-based bioethanol plants. *Zuckerindustrie* 130, 707-711.

**Schupp, N., Ziegler, P.,** 2004. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. *Plant and Cell Physiology* 45, 1471-1484.

**Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M., Mifflin, B.J.** 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science* 4, 97-106.

**Shimomura, S., Nagai, M., Fukui, T.,** 1982. Comparative glucan specificities of 2 types of spinach leaf phosphorylase. *Journal of Biochemistry* 91, 703-717.

- Sikka, V.K., Choi, S.B., Kavakli, I.H., Sakulsingharoj, C., Gupta, S., Ito, H., Okita, T.W.**, 2001. Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Science* 161, 461-468.
- Singh, N.K., Shepherd, K.W., Cornish, G.B.**, 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science* 14, 203-208.
- Smidansky, E.D., Clancy, M., Meyer, F.D., Lanning, S.P., Blake, N.K., Talbert, L.E., Giroux, M.J.**, 2002. Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 1724-1729.
- Smith, A.M., Denyer, K., Martin, C.**, 1997. The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 65-87.
- Smith, A.M.**, 1999. Making starch. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 223-229.
- Smith, A.M.**, 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules* 2, 335-341.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Smith, S.M.**, 2003. Starch mobilization in leaves. *Journal of Experimental Botany* 54, 577-583.
- Smith, T.C., Kindred, D.R., Brosnan, J.M., Weightman, R.M., Shepherd, M., Sylvester-Bradley, R.**, 2006. Wheat as a Feedstock for Alcohol Production HGCA Research Review No. 61. Home-Grown Cereals Authority, Caledonia House, 223, Pentonville Road, London, N19HY.
- Smith, A.M.**, 2008. Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *Plant Journal* 54, 546-558.
- Sokolov, L.N., Dejardin, A., Kleczkowski, L.A.**, 1998. Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochemical Journal* 336, 681-687.
- Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B., Steup, M.**, 1995. A 2nd L-type isozyme of potato glucan phosphorylase - cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Molecular Biology* 27, 567-576.
- Sosulski, K., Sosulski, F.**, 1994. Wheat as a feedstock for fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45/46, 169-180.
- Sourdille, P., Perretant, M. R., Charmet, G., Leroy, P., Gautier, M. F., Joudrier, P., Nelson, J. C, Sorrells, M. E., and Bernard, M.**, 1996. Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 580-586
- Sowokinos, J.R.**, 1981. Pyrophosphorylases in *Solanum-tuberosum* .2. catalytic properties and regulation of ADP-glucose and UDP-glucose pyrophosphorylase activities in potatoes. *Plant Physiology* 68, 924-929.

**Srichuwong, S., Sunarti, T.C., Mishima, T., Isono, N., Hisamatsu, M.,** 2005. Starches from different botanical sources II: Contribution of starch structure to swelling and pasting properties. *Carbohydrate Polymers* 62, 25-34.

**Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., Kishore, G.M.,** 1992. Regulation of the amount of starch in plant-tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science* 258, 287-292.

**Stinard, P.S., Robertson, D.S., Schnable, P.S.,** 1993. Genetic isolation, cloning, and analysis of a Mutator e induced, dominant antimorph of the Maize amylose extender1 locus. *Plant Cell* 5, 1555-1566.

**Stoddard, F.L.,** 1999. Variation in grain mass, grain nitrogen, and starch B-granule content within wheat heads. *Cereal Chemistry* 76, 139-144.

**Surget, A., et Barron, C.,** 2005. Histologie du grain de blé, *Industrie des céréales* 145, 4-7.

**Sullivan, T.D., Strelow, L.I., Illingworth, C.A., Phillips, R.L., Nelson, O.E.,** 1991. Analysis of maize *brittle-1* alleles and a defective suppressor-mutator-induced mutable allele. *Plant Cell* 3, 1337-1348.

**Swanston, J.S., Newton, A.C., Brosnan, J.M., Fotheringham, A., Glasgow, E.,** 2005. Determining the spirit yield of wheat varieties and variety mixtures. *Journal of Cereal Science* 42, 127-134.

**Swanston, J.S., Smith, P.L., Gillespie, T.L., Brosnan, J.M., Bringham, T.A., Agu, R.C.,** 2007. Associations between grain characteristics and alcohol yield among soft wheat varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 676-683.

**Swinkels, J.J.M.,** 1985. Composition and properties of commercial native starches. *Starke* 37, 1-5.

**Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M.M., Roldan, I., Montero, M., Munoz, F.J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'Hulst, C., Merida, A.,** 2009. Starch Granule Initiation in Arabidopsis Requires the Presence of Either Class IV or Class III Starch Synthases. *Plant Cell* 21, 2443-2457.

**Takaha, T., Okada, S., Smith, S.M.,** 1998. The role of D-enzyme in starch metabolism in plants. *Journal of Applied Glycoscience* 45, 169-175.

**Takaha, T., Smith, S.M.,** 1999. The functions of 4-alpha-glucanotransferases and their use for the production of cyclic glucans. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Vol 16 16, 257-280.

**Takeda, Y., Hizukuri, S., Juliano, B.O.,** 1987. Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. *Carbohydrate Research* 168, 79-88.

**Takeda, Y., Guan, H.P., Preiss, J.,** 1993. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydrate Research* 240, 253-263.

**Takeda, Y., Shibahara, S., Hanashiro, I.,** 2003. Examination of the structure of amylopectin molecules by fluorescent labeling. *Carbohydrate Research* 338, 471-475.

**Taylor, B.R., Roscrow, J.C.,** 1990. Factors affecting the quality of wheat grain for distilling in Northern Scotland. *Aspects of Applied Biology*, 183-191.

**Tester, R.F., Morrison, W.R.,** 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches .1. effects of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chemistry* 67, 551-557.

**Tester, R.F., Karkalas, J., Qi, X.,** 2004. Starch - composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39, 151-165.

**Tetlow, I.J., Bowsher, C.G., Emes, M.J.,** 1996. Reconstitution of the hexose phosphate translocator from the envelope membranes of wheat endosperm amyloplasts. *Biochemical Journal* 319, 717-723.

**Tetlow, I.J., Morell, M.K., Emes, M.J.,** 2004. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 55, 2131-2145.

**Tetlow, I., Liu, F., Emes, M.,** 2008. Protein-protein interactions among enzymes of starch synthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 150, S186-S186.

**Textor, S.D., Hill, G.A., Macdonald, D.G., St Denis, E.,** 1998. Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 76, 87-93.

**Thorbjornsen, T., Villand, P., Denyer, K., Olsen, O.A., Smith, A.M.,** 1996. Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *Plant Journal* 10, 243-250.

**Tickle, P., Burrell, M.M., Coates, S.A., Emes, M.J., Tetlow, I.J., Bowsher, C.G.,** 2009. Characterisation of plastidial starch phosphorylase in *Triticum aestivum* L. endosperm. *Journal of Plant Physiology* 166, 1465-1478.

**Tiessen, A., Hendriks, J.H.M., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farre, E.M., Geigenberger, P.,** 2002. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* 14, 2191-2213.

**Tobias, R.B., Boyer, C.D., Shannon, J.C.,** 1992. Alterations in carbohydrate intermediates in the endosperm of starch-deficient maize (*Zea-mays* L) genotypes. *Plant Physiology* 99, 146-152.

**Tsai, C.Y.,** 1974. The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochemical Genetics* 11, 83-96.

**Tsai, C.Y., Nelson, O.E.,** 1966. Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science* 151, 341-343.

**Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H., Shomura, A., Nakamura, Y.,** 2002. Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1-8.

**Van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buleon, A., Visser, R., Ball, S.,** 1998. Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 22232-22240.

**Vandeputte, G.E., Delcour, J.A.,** 2004. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers* 58, 245-266.

**Vanderleij, F.R., Visser, R.G.F., Oosterhaven, K., Vanderkop, D.A.M., Jacobsen, E., Feenstra, W.J.,** 1991. Complementation of the amylose-free starch mutant of potato (*Solanum tuberosum*) by the gene encoding granule-bound starch synthase. *Theoretical and Applied Genetics* 82, 289-295.

**Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Cai, N., Wong, J.H., Buchanan, B.B., Hurkman, W.J.,** 2005. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5, 1594-1611.

**Villand, P., Olsen, O.A., Kleczkowski, L.A.,** 1993. Molecular characterization of multiple cDNA clones for adp-glucose pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 23, 1279-1284.

**Vrinten, P.L., Nakamura, T.,** 2000. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. *Plant Physiology* 122, 255-263.

**Vrinten, P., Nakamura, T., Yamamori, M.,** 1999. Molecular characterization of waxy mutations in wheat. *Molecular and General Genetics* 261, 463-471.

**Waigh, T.A., Donald, A.M., Heidelbach, F., Riekkel, C., Gidley, M.J.,** 1999. Analysis of the native structure of starch granules with small angle x-ray microfocus scattering. *Biopolymers* 49, 91-105.

**Wang, Y.J., White, P., Pollak, L., Jane, J.,** 1993. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with OH43 inbred line background. *Cereal Chemistry* 70, 171-179.

**Wang, L.Z., White, P.J.,** 1994. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. *Cereal Chemistry* 71, 263-268.

**Wang, S., Sosulski, K., Sosulski, F., Ingledeew, M.,** 1997. Effect of sequential abrasion on starch composition of five cereals for ethanol fermentation. *Food Research International* 30, 603-609.

**Wang, J.R., Yan, Z.H., Wei, Y.M., Nevo, E., Baum, B.R., Zheng, Y.L.,** 2006. Molecular characterization of dimeric alpha-amylase inhibitor genes in wheat and development of genome allele-specific primers for the genes located on chromosome 3BS and 3DS. *Journal of Cereal Science* 43, 360-368.

**Wang, Z.Y., Chen, X.P., Wang, J.H., Liu, T.S., Liu, Y., Zhao, L., Wang, G.Y., 2007.** Increasing maize seed weight by enhancing the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase activity in transgenic maize plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 88, 83-92.

**Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvalle, D., Planchot, R., Berbezy, P., Vyas, D., Colonna, P., Chatterjee, M., Ball, S., D'Hulst, C., 2005.** Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiology* 138, 184-195.

**Weightman, R., Forge, C., Quandalle, C., 2001.** A rapid viscometric screening tool for measuring feed wheat quality and the relationship between the quality of hybrid wheats and their parental lines. *Aspects of Applied Biology* 64, 79-84.

**Wilkins, M., Sanchez, J., Gooley, A., Appel, R., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D., Williams, K., 1995.** Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnological and Genetic Engineering Review* 13, 19-50.

**Wong, K.S., Kubo, A., Jane, J.L., Harada, K., Satoh, H., Nakamura, Y., 2003.** Structures and properties of amylopectin and phytyglycogen in the endosperm of *sugary-1* mutants of rice. *Journal of Cereal Science* 37, 139-149.

**Wrigley, C., Bekes, F., Bushuk, W., 2006.** Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality, edited by AACC international press, 446 pp.

**Wu, X., Zhao, R., Wang, D., Bean, S.R., Seib, P.A., Tuinstra, M.R., Campbell, M., O'Brien, A., 2006.** Effects of amylose, corn protein, and corn fiber contents on production of ethanol from starch-rich media. *Cereal Chemistry* 83, 569-575.

**Yamamori, M., Nakamura, T., Endo, T.R., Nagamine, T., 1994.** Waxy protein-deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 179-184.

**Yamamori, M., Endo, T.R., 1996.** Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 275-281.

**Yamamori, M., Fujita, S., Hayakawa, K., Matsuki, J., Yasui, T., 2000.** Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 21-29.

**Yamamori, M., Quynh, N.T., 2000.** Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 32-38.

**Yeh, J.Y., Garwood, D.L., Shannon, J.C., 1981.** Characterization of starch from maize endosperm mutants. *Starke* 33, 222-230.

**Yoshimoto, Y., Tashiro, J., Takenouchi, T., Takeda, Y., 2000.** Molecular structure and some physicochemical properties of high-amylose barley starches. *Cereal Chemistry* 77, 279-285.



**Young, T.E., Gallie, D.R.,** 2000. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* 44, 283-301.

**Yu, T.S., Kofler, H., Hausler, R.E., Hille, D., Flugge, U.I., Zeeman, S.C., Smith, A.M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W.L., Chen, J.C., Weber, A.,** 2001. The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* 13, 1907-1918.

**Yu, T.S., Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Fulton, D.C., Dunstan, H., Lue, W.L., Hegemann, B., Tung, S.Y., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, D.L., Wang, S.M., Smith, A.M., Chen, J., Smith, S.M.,** 2005.  $\alpha$ -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Biological Chemistry* 280, 9773-9779.

**Yun, S.H., Matheson, N.K.,** 1993. Structure of the amylopectins of waxy, normal, amylose-extender, and wx:ae genotypes and of the phytylglycogen of maize. *Carbohydrate Research* 243, 307-321.

**Zeeman, S.C., Northrop, F., Smith, A.M., Rees, T.,** 1998. A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant Journal* 15, 357-365.

**Zhang, X., Colleoni, C., Ratushna V., Sirghie-Colleoni, M., James, M.G., Myers, A.M.,** 2004. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Molecular Biology* 54, 865-879.

**Zhang, X.L., Myers, A.M., James, M.G.,** 2005. Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiology* 138, 663-674.

**Zhang, X.L., Szydlowski, N., Delvalle, D., D'Hulst, C., James, M.G., Myers, A.M.,** 2008. Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Bmc Plant Biology* 8.

**Zhao, R., Wu, X., Seabourn, B.W., Bean, S.R., Guan, L., Shi, Y.C., Wilson, J.D., Madl, R., Wang, D.,** 2009. Comparison of Waxy vs. Nonwaxy Wheats in Fuel Ethanol Fermentation. *Cereal Chemistry* 86, 145-156.

**Zhong, G., Shibles, R., Keeling, P., Guan, H.,** 2000. Lysine 497 instead of 193 of the conserved KTGGL motif functions as the ADP-glucose binding site of maize starch synthase IIa. Final Program and abstract supplement, *Plant Biology* 2000, the Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists. Poster 600: 127

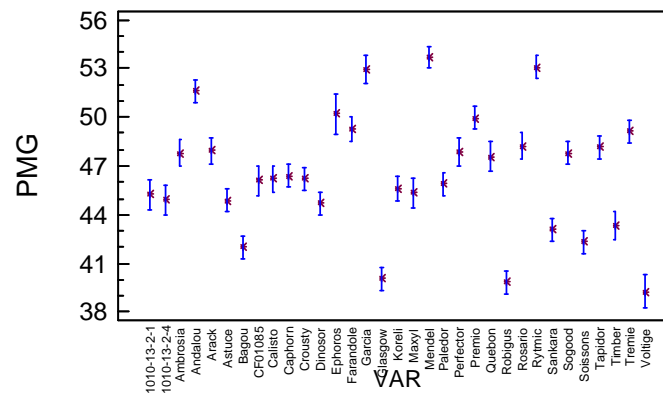
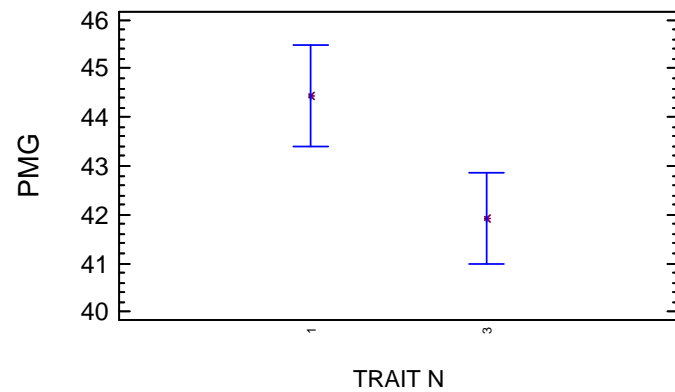
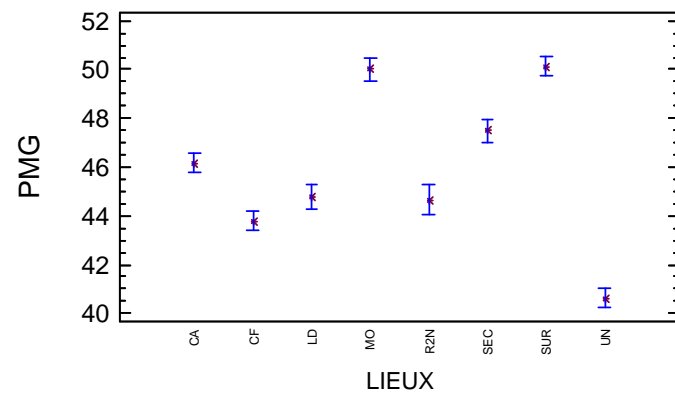
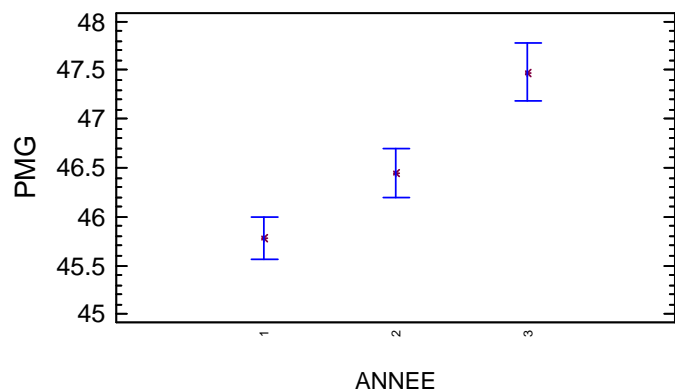
**Zhu, T.M., Jackson, D.S., Wehling, R.L., Geera, B.,** 2008. Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. *Cereal Chemistry* 85, 51-58.

**Zobel, H.F.,** 1988. Molecules to granules - a comprehensive starch review. *Starch-Starke* 40, 44-50.

## **IX. ANNEXES**

## **A. ANNEXES DES VARIÉTÉS FRANÇAISES**

# ANNEXES - PMG pour les variétés françaises en grammes



Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Voltige	9	39.2769	0.760332	X
Robigus	20	39.8297	0.503645	X
Glasgow	19	40.0482	0.520815	X
Bagou	20	42.0276	0.503645	X
Soissons	20	42.3483	0.503645	X
Sankara	20	43.0735	0.503645	X
Timber	14	43.3632	0.610287	XX
Dinosor	20	44.6817	0.503645	XX
Astuce	20	44.8827	0.503645	XXX
1010-13-2-4	12	44.9255	0.659383	XXXX
1010-13-2-1	12	45.2684	0.659383	XXX
Maxyl	13	45.3332	0.629799	XXX
Koreli	18	45.6215	0.532174	XXX
Paledor	20	45.8737	0.503645	XXX
CF01085	12	46.1014	0.662034	XXXXX
Calisto	14	46.2011	0.610287	XXXXXX
Crousty	20	46.2135	0.503645	XXX
Caphorn	20	46.3592	0.503645	XXXX
Quebon	12	47.5898	0.659383	XXXX
Sogood	20	47.7977	0.503645	X
Ambrosia	14	47.8015	0.610287	XXX
Perfector	14	47.8557	0.610287	XX
Arack	14	47.9323	0.610287	X
Tapidor	20	48.1365	0.503645	XX
Rosario	14	48.2352	0.610287	XX
Tremie	20	49.1324	0.503645	XXX
Farandole	18	49.2325	0.532174	XXX
Premio	20	49.961	0.503645	X
Ephoros	6	50.1909	0.928067	XXX
Andalou	20	51.6353	0.503645	XX
Garcia	14	52.9282	0.610287	XX
Rytmic	18	53.0883	0.532174	X
Mendel	20	53.6962	0.503645	X

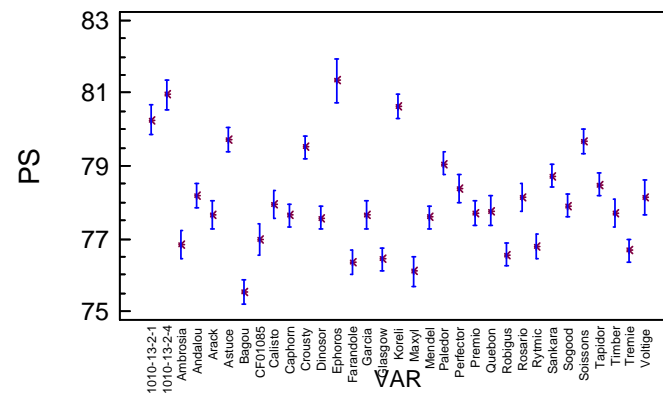
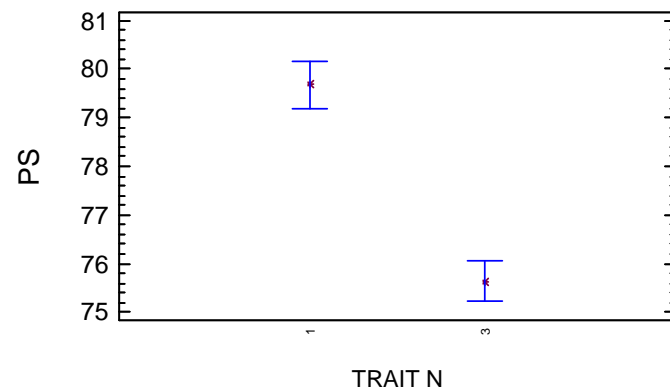
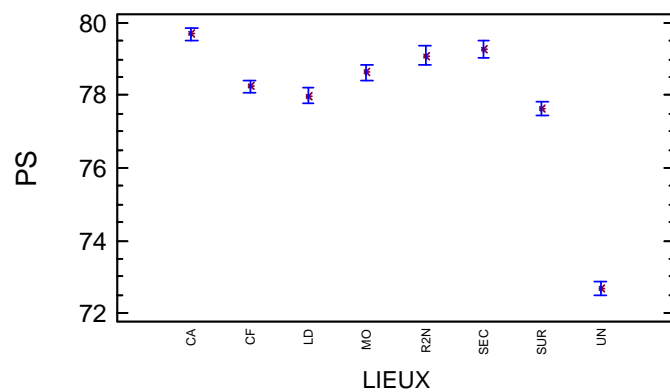
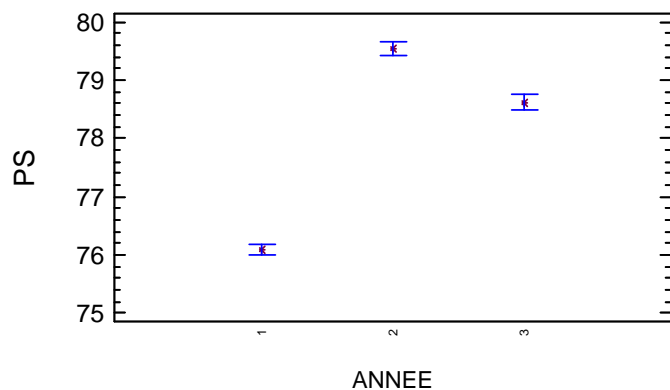
## ANNEXES - PMG pour les variétés françaises en grammes

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	51.94 ± 0.73	1,4	51.44 ± 0.32	0,62	41.15 ± 2.56	6,22	43.52 ± 2.73	6,28
Andalou	55.08 ± 2.71	4,92	54.93 ± 0.13	0,23	44.44 ± 1.87	4,22	43.96 ± 0.68	1,54
Arack	53.62 ± 1.83	3,42	51.36 ± 0.64	1,25	42.16 ± 3.16	7,5	40.49 ± 2.48	6,13
Astuce	47.77 ± 0.91	1,91	49.3 ± 1.65	3,34	38.02 ± 0.04	0,09	42.34 ± 0.52	1,23
Bagou	45.08 ± 2.83	6,27	47.63 ± 1.51	3,18	33.39 ± 0.69	2,08	37.34 ± 0.99	2,66
Calisto	51.4 ± 1.27	2,46	47.08 ± 0.97	2,06	39.87 ± 1.01	2,54	41.74 ± 2.9	6,94
Caphorn	50.28 ± 0.98	1,96	46.43 ± 1.76	3,79	42.96 ± 4.39	10,22	43.54 ± 1.12	2,56
CF01085	48.84 ± 3.31	6,78	NA	NA	38.76 ± 1.31	3,38	44.32 ± 2.94	6,62
Crousty	50.85 ± 1.2	2,37	52.17 ± 2.05	3,93	41.71 ± 3.66	8,78	46.38 ± 1	2,16
Dinosor	46.98 ± 3.05	6,49	48.3 ± 0.32	0,66	38.12 ± 1.44	3,77	34.08 ± 0.4	1,17
Ephoros	55.12 ± 2.21	4	NA	NA	43.49 ± 0.29	0,67	45.26 ± 1.83	4,04
Farandole	53.25 ± 3.68	6,92	NA	NA	42.07 ± 1.55	3,68	48.3 ± 0.59	1,21
Garcia	55.66 ± 0.99	1,78	54.9 ± 1.9	3,45	46.68 ± 5.18	11,1	50.1 ± 1.53	3,06
Glasgow	44.91 ± 1.76	3,92	NA	NA	35.05 ± 2.13	6,07	35.96 ± 2.01	5,59
Koreli	49.32 ± 2.68	5,43	NA	NA	36.48 ± 0.42	1,16	45.71 ± 0.28	0,62
Maxyl	49.07 ± 1.91	3,89	47.44 ± 1.44	3,04	42.25 ± 2.11	4,99	42.48 ± 0.2	0,47
Mendel	56.61 ± 1.2	2,12	56.2 ± 1.27	2,25	51.57 ± 2.39	4,63	50.83 ± 0.95	1,86
Paledor	50.57 ± 1.28	2,53	50.34 ± 0.21	0,41	40.82 ± 1.12	2,75	43.01 ± 1.22	2,83
Perfector	50.94 ± 1.87	3,66	53.33 ± 1.37	2,57	43.14 ± 2.82	6,54	39.96 ± 2.8	7
Premio	54.55 ± 2.02	3,71	54.59 ± 1.1	2,01	42.23 ± 0.66	1,56	47.19 ± 0.27	0,56
Robigus	44.58 ± 2.29	5,14	44.44 ± 0.51	1,15	32.72 ± 2.54	7,76	35.21 ± 2.16	6,13
Rosario	53.33 ± 2.02	3,79	50.91 ± 1.2	2,36	45.2 ± 1.55	3,43	39.66 ± 0.72	1,82
Rytmic	54.18 ± 4.41	8,14	NA	NA	47.04 ± 0.11	0,24	46.82 ± 1.91	4,07
Sankara	45.85 ± 1.22	2,67	48.09 ± 0.36	0,75	36.19 ± 1.23	3,4	36.45 ± 0.9	2,48
Sogood	51.36 ± 1.13	2,2	51.61 ± 1.34	2,6	42.05 ± 0.3	0,71	42.36 ± 2.23	5,27
Soissons	45.74 ± 3.05	6,68	42.84 ± 3.51	8,19	38.55 ± 0.13	0,34	38.86 ± 0.3	0,78
Tapidor	50.01 ± 0.66	1,32	51.92 ± 0.71	1,38	43.18 ± 5.37	12,45	46.33 ± 0.14	0,3
Timber	46.03 ± 2.98	6,47	47.13 ± 2.28	4,83	36.94 ± 0.25	0,69	37.84 ± 0.09	0,25
Tremie	52.87 ± 0.88	1,67	52.02 ± 0.69	1,32	41.47 ± 0.75	1,81	44.85 ± 0.3	0,67
Voltige	39.85 ± 3.43	8,61	NA	NA	32.96 ± 3.74	11,35	36.65 ± 0.31	0,84

	ANNEE 2							
	CAU		CFD		MOM		UNI	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	44.6 ± 0.23	0,51	44.11 ± 0.18	0,42	46.5 ± 0.25	0,53	50.34 ± 0.3	0,6
1010-13-2-4	42.85 ± 3.07	7,16	41.5 ± 1.7	4,09	44.56 ± 0.21	0,48	50.32 ± 0.13	0,25
Ambrosia	49.55 ± 4.31	8,71	44.84 ± 0.42	0,95	43.16 ± 0.27	0,62	50.12 ± 0.2	0,4
Andalou	52.81 ± 3.86	7,31	49.81 ± 0.24	0,48	48.48 ± 0.41	0,85	53.48 ± 0.28	0,53
Arack	46.99 ± 2.76	5,87	46.3 ± 0.45	0,98	45.58 ± 0.09	0,2	54.1 ± 0.29	0,54
Astuce	45.53 ± 1.12	2,45	43.4 ± 0.4	0,91	46.46 ± 0.12	0,26	49.32 ± 0.14	0,29
Bagou	41.67 ± 2.7	6,48	37.54 ± 0.57	1,51	40.22 ± 0.3	0,76	47.08 ± 0.16	0,33
Calisto	45.72 ± 1.16	2,54	44 ± 0.45	1,03	46.14 ± 0.09	0,2	51.58 ± 0.11	0,21
Caphorn	46.1 ± 0.23	0,49	41.44 ± 0.96	2,32	43.84 ± 0.07	0,16	50.74 ± 0.11	0,21
CF01085	46.67 ± 0.18	0,39	42.78 ± 0.85	1,98	40.18 ± 0.05	0,12	52.56 ± 0.08	0,16
Crousty	45.07 ± 1.68	3,73	43.84 ± 0.23	0,52	47.1 ± 0.23	0,5	53.48 ± 0.37	0,69
Dinosor	44.03 ± 1.82	4,14	41.74 ± 0.37	0,88	45.24 ± 0.08	0,19	49.56 ± 0.37	0,74
Farandole	44.53 ± 0.58	1,3	48.42 ± 0.71	1,46	45.42 ± 0.21	0,45	52.02 ± 0.29	0,56
Garcia	52.57 ± 1.43	2,72	49.49 ± 0.92	1,86	52.48 ± 0.37	0,7	58.6 ± 0.42	0,72
Glasgow	37.96 ± 3.56	9,39	38.38 ± 1.73	4,5	37.68 ± 0.25	0,68	41.3 ± 0.23	0,57
Koreli	43.83 ± 0.49	1,13	42.51 ± 0.35	0,83	41.74 ± 0.08	0,19	48.94 ± 0.18	0,36
Maxyl	42.59 ± 0.13	0,3	41.3 ± 0.99	2,4	NA	NA	51.12 ± 0.14	0,28
Mendel	52.65 ± 0.75	1,42	47.8 ± 0.23	0,47	48.86 ± 0.16	0,33	58.54 ± 0.08	0,13
Paledor	44.84 ± 2.01	4,48	43.64 ± 0.45	1,04	44.12 ± 0.31	0,71	49.76 ± 0.4	0,81
Perfector	48.31 ± 3.41	7,05	44.67 ± 1.85	4,15	46.52 ± 0.45	0,97	53.76 ± 0.27	0,5
Premio	47.16 ± 1.27	2,7	45.76 ± 1.39	3,03	46.88 ± 0.34	0,72	55.96 ± 0.14	0,25
Quebon	48.63 ± 1	2,06	43.85 ± 0.35	0,81	46.86 ± 0.05	0,11	53.02 ± 0.05	0,09
Robigus	37.39 ± 5.33	14,26	38.64 ± 0.99	2,56	37.5 ± 0.13	0,36	45.82 ± 0.13	0,29
Rosario	48.47 ± 2.81	5,81	47.76 ± 0.79	1,66	47 ± 0.17	0,36	47.1 ± 0.15	0,32
Rytmic	56.37 ± 0.92	1,63	50.52 ± 2.91	5,77	51.62 ± 0.08	0,15	59.76 ± 0.16	0,26
Sankara	45.16 ± 0.48	1,06	39.21 ± 0.72	1,84	42.74 ± 0.4	0,94	46.58 ± 0.21	0,44
Sogood	49.37 ± 0.24	0,49	43.89 ± 0.49	1,13	45.62 ± 0.4	0,88	50.84 ± 0.25	0,5
Soissons	43.99 ± 0.98	2,22	40.12 ± 0.76	1,9	41.28 ± 0.34	0,82	47.82 ± 0.04	0,07
Tapidor	46.77 ± 0.44	0,94	47.6 ± 0.25	0,53	46.04 ± 0.13	0,28	51.24 ± 0.42	0,83
Timber	45.13 ± 1.4	3,1	39.36 ± 1.92	4,89	43.06 ± 0.04	0,08	49.8 ± 0.37	0,74
Tremie	47.25 ± 1.99	4,22	45.68 ± 0.31	0,68	44.84 ± 0.08	0,19	56.4 ± 0.18	0,33
Voltige	NA	NA	37.26 ± 1.41	3,8	NA	NA	45.86 ± 0.22	0,48

	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	43.46 ± 0.62	1,43	43.99 ± 2.08	4,73	47.97 ± 0.89	1,86
1010-13-2-4	45.02 ± 1.53	3,39	45.68 ± 0.91	1,98	47.96 ± 2.12	4,42
Andalou	50.44 ± 0.99	1,96	54.63 ± 1.03	1,89	57.35 ± 3.21	5,6
Astuce	39.8 ± 2.57	6,47	45.38 ± 0.57	1,25	47.61 ± 1.43	3
Bagou	40.52 ± 0.48	1,19	43.04 ± 0.88	2,04	48.03 ± 0.95	1,97
Caphorn	46.38 ± 3.51	7,56	46.72 ± 0.31	0,67	50.28 ± 0.17	0,34
Crousty	41.91 ± 4.03	9,62	44.04 ± 0.2	0,45	43.99 ± 0.27	0,61
Dinosor	44.99 ± 0.47	1,04	47.95 ± 1.46	3,04	51.11 ± 0.13	0,25
Farandole	51.2 ± 5.94	11,6	49.16 ± 0.03	0,06	52.48 ± 2.72	5,17
Glasgow	36.14 ± 1.7	4,7	42.6 ± 1.78	4,18	43.64 ± 0.85	1,94
Koreli	44.87 ± 1.12	2,49	49.12 ± 1.22	2,48	47.85 ± 0.75	1,57
Mendel	51.77 ± 2.19	4,23	55.22 ± 0.82	1,49	58.17 ± 0.69	1,19
Paledor	43.45 ± 1.51	3,48	44.25 ± 0.66	1,5	49.03 ± 0.61	1,24
Premio	49.16 ± 0.31	0,63	50.51 ± 0.58	1,15	54.66 ± 0.08	0,16
Quebon	45.67 ± 3.15	6,91	47.8 ± 0.79	1,66	50.93 ± 0.1	0,19
Robigus	36.64 ± 0.74	2,01	43.48 ± 0.2	0,46	41.21 ± 0.72	1,75
Rytmic	50.08 ± 1.41	2,82	53.22 ± 1.5	2,82	58.64 ± 1.1	1,88
Sankara	40.21 ± 1.09	2,71	44.4 ± 1.07	2,42	48.61 ± 1.54	3,17
Sogood	44.7 ± 1.67	3,73	49.23 ± 0.69	1,41	52.91 ± 1.4	2,65
Soissons	40.55 ± 0.78	1,92	42.33 ± 0.81	1,9	43.87 ± 1.82	4,16
Tapidor	46.09 ± 0.49	1,07	47.83 ± 0.04	0,09	50.35 ± 1.23	2,44
Tremie	49.13 ± 2.62	5,33	51.36 ± 2.72	5,29	53.96 ± 0.45	0,84

# ANNEXES - PS pour les variétés françaises en grammes



Method: 95.0 percent LSD

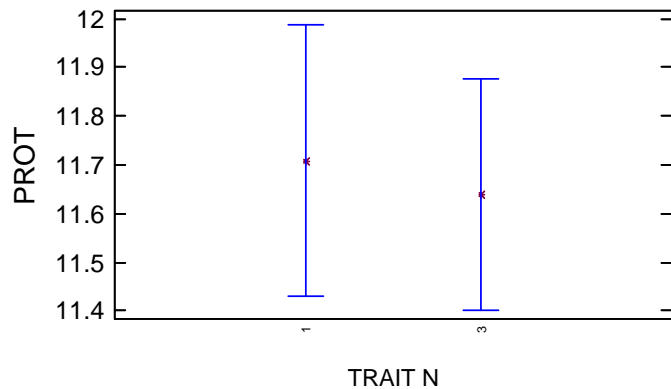
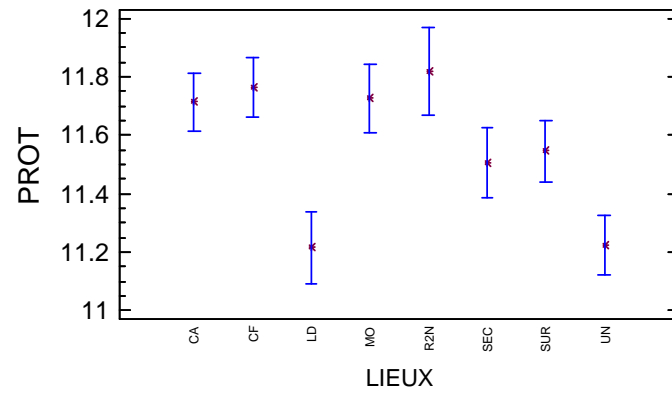
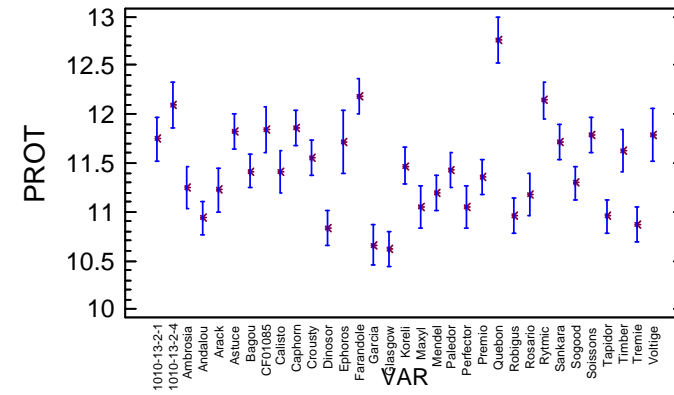
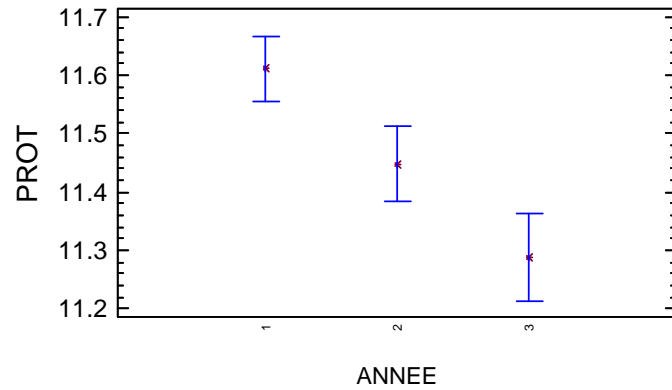
VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Bagou	20	75.5469	0.229058	X
Maxyl	13	76.1054	0.286433	XX
Farandole	18	76.3429	0.242033	XX
Glasgow	19	76.4357	0.236867	XX
Robigus	20	76.5728	0.229058	XX
Tremie	20	76.6808	0.229058	XX
Rytmic	18	76.7773	0.242033	XX
Ambrosia	14	76.8339	0.277559	XX
CF01085	12	76.9838	0.301094	XX
Dinosaur	20	77.5716	0.229058	XX
Mendel	20	77.5867	0.229058	XX
Caphorn	20	77.6366	0.229058	XX
Arack	14	77.6485	0.277559	XXX
Garcia	14	77.6511	0.277559	XXX
Premio	20	77.7041	0.229058	XXX
Timber	14	77.7214	0.277559	XXX
Quebon	12	77.771	0.299888	XXXX
Sogood	20	77.9131	0.229058	XXX
Calisto	14	77.9532	0.277559	XXX
Rosario	14	78.1251	0.277559	XXXX
Voltige	9	78.1348	0.3458	XXXX
Andalou	20	78.1871	0.229058	XXXX
Perfactor	14	78.3673	0.277559	XXXX
Tapidor	20	78.4838	0.229058	XXX
Sankara	20	78.7351	0.229058	XX
Paledor	20	79.0558	0.229058	XX
Crousty	20	79.5059	0.229058	XX
Soissons	20	79.6745	0.229058	XXX
Astuce	20	79.7205	0.229058	XX
1010-13-2-1	12	80.2567	0.299888	XX
Koreli	18	80.6429	0.242033	XX
1010-13-2-4	12	80.9496	0.299888	XX
Ephoros	6	81.3343	0.422086	X

## ANNEXES - PS pour les variétés françaises en grammes

	ANNEE 1					ANNEE 2			
	R2N	LeD	SEC	SUR		CAU	CFD	MOM	UNI
Ambrosia	77,0	75,5	70,9	74,0	1010-13-2-1	81,3	80,4	81,5	81,5
Andalou	77,4	78,7	73,0	75,2	1010-13-2-4	82,0	81,5	81,8	83,5
Arack	77,6	78,3	71,8	74,5	Ambrosia	79,9	77,5	76,8	81,0
Astuce	78,6	80,2	76,0	77,8	Andalou	79,8	78,5	80,0	80,5
Bagou	76,0	76,6	68,0	72,6	Arack	79,1	77,9	80,0	80,3
Calisto	78,1	78,8	71,6	76,3	Astuce	82,0	80,3	78,5	83,3
Caphorn	76,6	77,5	72,2	75,2	Bagou	77,1	75,1	78,3	79,0
CF01085	76,6	NA	72,1	76,1	Calisto	79,5	77,6	79,3	80,5
Crousty	78,1	80,4	75,4	78,1	Caphorn	79,3	77,5	79,5	80,8
Dinosor	77,6	78,6	72,1	71,9	CF01085	77,8	76,4	76,5	79,5
Ephoros	80,3	NA	76,8	78,4	Crousty	80,4	78,9	80,3	81,0
Farandole	75,1	NA	69,4	74,1	Dinosor	79,1	77,9	80,3	81,3
Garcia	76,8	77,9	72,1	76,2	Farandole	77,8	77,5	78,8	80,5
Glasgow	77,6	NA	72,1	74,4	Garcia	78,5	78,3	79,5	79,8
Koreli	79,8	NA	74,6	79,3	Glasgow	77,4	75,5	77,5	79,8
Maxyl	75,8	76,9	71,1	73,4	Koreli	81,5	81,1	80,8	83,3
Mendel	76,0	78,0	73,7	75,3	Maxyl	76,5	76,5	NA	79,8
Paledor	78,1	79,9	74,5	77,2	Mendel	79,3	77,3	79,3	80,8
Perfector	78,4	79,6	73,8	73,1	Paledor	79,9	79,3	81,5	81,5
Premio	77,1	78,4	72,1	75,3	Perfector	80,5	78,6	79,3	82,3
Robigus	77,8	77,3	70,8	74,8	Premio	78,3	77,8	79,3	80,3
Rosario	77,8	77,4	73,9	73,6	Québon	79,9	77,5	76,5	82,0
Rytmic	75,9	NA	70,7	72,1	Robigus	78,8	77,3	75,5	79,8
Sankara	79,3	79,7	73,5	75,9	Rosario	80,8	78,9	79,0	82,0
Sogood	78,1	77,9	72,6	74,5	Rytmic	79,3	77,4	76,5	81,3
Soissons	78,6	79,8	75,1	77,0	Sankara	80,5	78,3	79,5	82,8
Tapidor	77,1	80,1	72,9	76,9	Sogood	80,6	77,9	79,0	80,8
Timber	77,6	79,0	71,4	73,7	Soissons	81,5	79,8	81,0	81,5
Tremie	76,4	76,9	69,4	74,9	Tapidor	80,4	79,4	80,0	81,5
Voltige	77,3	NA	72,4	76,2	Timber	80,3	77,9	79,0	82,0
					Tremie	78,5	76,8	79,5	79,8
					Voltige	NA	77,9	NA	82,0

	ANNEE 3		
	CFD	MOM	SEC
1010-13-2-1	81,8	80,5	80,9
1010-13-2-4	82,5	81,1	81,4
Andalou	78,1	80,1	78,6
Astuce	78,8	80,8	79,5
Bagou	74,9	77,0	77,1
Caphorn	78,4	78,8	78,4
Crousty	79,3	80,8	80,6
Dinosor	77,6	79,8	78,0
Farandole	77,3	76,6	76,9
Glasgow	74,0	77,9	77,4
Koreli	81,5	82,1	80,8
Mendel	77,9	78,6	77,5
Paledor	78,4	80,5	78,9
Premio	78,1	79,4	78,4
Quebon	78,0	78,6	78,9
Robigus	75,0	77,5	76,6
Rytmic	77,6	78,3	77,9
Sankara	77,1	80,0	79,5
Sogood	77,0	79,4	78,9
Soissons	80,8	80,9	79,5
Tapidor	77,4	79,1	78,4
Tremie	76,5	78,1	77,4

# ANNEXES - Taux de protéines pour les variétés françaises en %



Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Glasgow	19	10.6164	0.131733	X
Garcia	14	10.6618	0.154364	XX
Dinosor	20	10.8333	0.127389	XXX
Tremie	20	10.8706	0.127389	XXXX
Andalou	20	10.9343	0.127389	XXXX
Tapidor	20	10.9535	0.127389	XXXXXX
Robigus	20	10.9631	0.127389	XXXXXX
Maxyl	13	11.0474	0.1593	XXXXXX
Perfector	14	11.0556	0.154364	XXXXXX
Rosario	14	11.1806	0.154364	XXXXXX
Mendel	20	11.1969	0.127389	XXXX
Arack	13	11.2231	0.158962	XXXXXXXX
Ambrosia	14	11.2451	0.154364	XXXXXX
Sogood	20	11.2959	0.127389	XXXXXX
Premio	20	11.3504	0.127389	XXXXXX
Calisto	14	11.416	0.154364	XXXXXXXX
Bagou	20	11.4176	0.127389	XXXXXXXX
Paledor	20	11.4262	0.127389	XXXXXX
Koreli	18	11.4729	0.134606	XXXXXXXX
Crousty	20	11.5575	0.127389	XXXXXXXX
Timber	14	11.6264	0.154364	XXXXXX
Ephoros	6	11.7099	0.234744	XXXXXXXXXXXX
Sankara	20	11.7115	0.127389	XXXXXX
1010-13-2-1	12	11.7452	0.166787	XXXXXXXXXX
Voltige	9	11.7912	0.192323	XXXXXXXXXX
Soissons	20	11.7913	0.127389	XXXXXX
Astuce	19	11.8244	0.131729	XXXXXX
CF01085	12	11.8475	0.167455	XXXXXXXX
Caphorn	20	11.8625	0.127389	XXXX
1010-13-2-4	12	12.0895	0.166787	XXX
Rytmic	18	12.1442	0.134606	XX
Farandole	18	12.1854	0.134606	X
Quebon	12	12.7652	0.166787	X



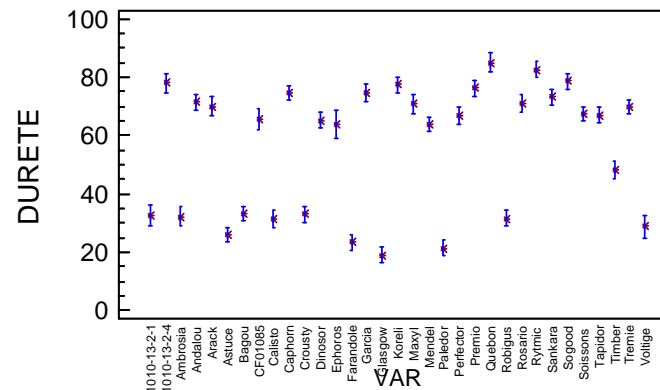
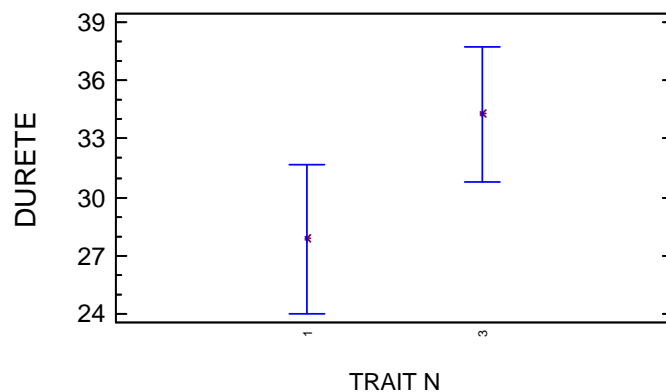
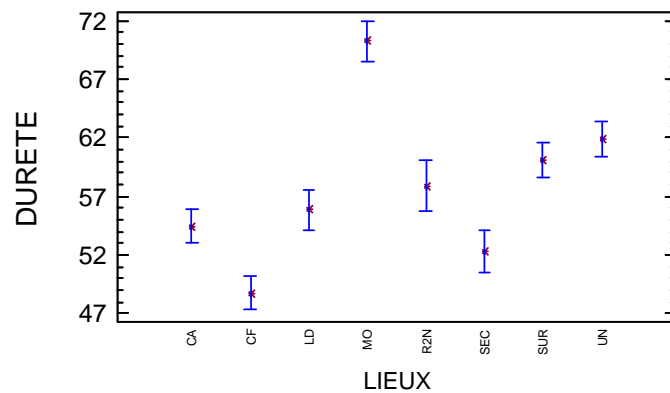
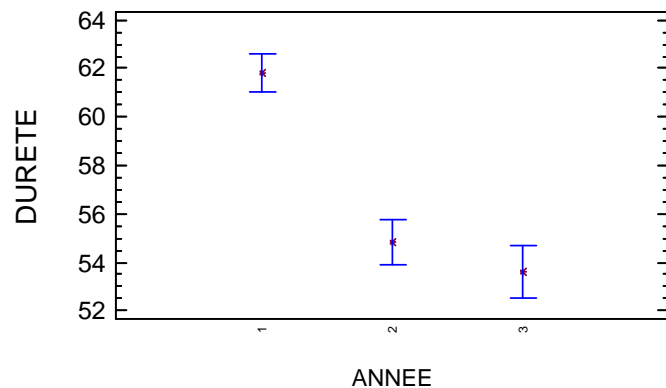
## ANNEXES - Taux de protéines pour les variétés françaises en %

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	10.8 ± 1.2	11,3	11.6 ± 0.2	1,9	11 ± 1.3	11,7	11.9 ± 0.1	0,7
Andalou	10.9 ± 1.2	10,9	11.2 ± 0.2	1,9	11.1 ± 1	9,3	11.4 ± 0.5	4,7
Arack	10.9 ± 1.2	11,3	11.5 ± 0.2	1,9	10.6 ± 0.6	5,5	11.7 ± 0.1	1,1
Astuce	12.1 ± 1.3	10,5	11.5 ± 0.2	1,9	11.4 ± 0.4	3,3	12.1 ± 0.1	0,5
Bagou	11.7 ± 0.8	6,5	11.6 ± 0	0,1	12.3 ± 0.2	1,9	11.7 ± 0	0,3
Calisto	11.4 ± 1.3	11	11.9 ± 0.3	2,5	11.5 ± 0.6	4,8	11.8 ± 0.3	2,2
Caphorn	11.5 ± 1.4	12,4	11.9 ± 0.5	4,1	11 ± 1.8	15,9	12.5 ± 0.4	2,9
CF01085	12.5 ± 0.9	7	NA	NA	11.7 ± 0.6	5,3	12.3 ± 0.1	1,1
Crousty	12 ± 1.2	9,9	12 ± 0	0	11.1 ± 1.2	11	12 ± 0.3	2,4
Dinosor	10.7 ± 0.8	7,3	11 ± 0.3	2,7	10.7 ± 0.1	0,8	11.8 ± 0.4	3,7
Ephoros	12.1 ± 0.7	5,6	NA	NA	11.4 ± 0.6	5,4	11.9 ± 0	0
Farandole	12.5 ± 1.2	9,5	NA	NA	12.3 ± 1.3	10,4	13.8 ± 0.1	0,7
Garcia	11 ± 0.8	7,1	11 ± 0	0,4	10.4 ± 1.5	14,3	10.6 ± 0.4	3,8
Glasgow	10.4 ± 1.2	11,8	NA	NA	10.3 ± 0.4	4,3	10.8 ± 0.5	4,9
Koreli	11.5 ± 0.8	7,1	NA	NA	12.1 ± 0.2	1,6	11.8 ± 0.2	2,1
Maxyl	11.1 ± 0.8	7,3	11.4 ± 0.1	0,9	10.4 ± 0.9	9	11.3 ± 0.1	0,5
Mendel	11.5 ± 2.1	18	11.6 ± 0.1	0,9	10.5 ± 1.1	10,4	11.7 ± 0	0,3
Paledor	11.7 ± 1.5	12,7	12.1 ± 0	0	10.9 ± 0.6	5,8	11.7 ± 0	0,1
Perfector	11.1 ± 1.4	12,4	11.3 ± 0.1	0,7	10.7 ± 0.1	1,1	11.6 ± 0.5	4
Premio	11.4 ± 1.5	13,1	12 ± 0	0,2	11.3 ± 0.2	2,1	11.6 ± 0.1	0,8
Robigus	10.7 ± 1.3	12,2	11 ± 0.1	0,6	11.1 ± 1.1	9,8	11.4 ± 0.3	2,4
Rosario	11.1 ± 1.4	12,3	11.4 ± 0.1	1,3	10.7 ± 0.1	0,9	11.9 ± 0.2	1,9
Rytmic	12.1 ± 0.8	6,4	NA	NA	11.4 ± 0.3	3	13 ± 0.1	0,6
Sankara	11.7 ± 1.2	10,6	11.9 ± 0	0,3	12.2 ± 0.7	5,9	12.6 ± 0.4	3,2
Sogood	11.1 ± 1.9	17	11.4 ± 0	0	11 ± 0.5	4,8	12.1 ± 0.6	4,8
Soissons	12.3 ± 1.2	9,9	11.8 ± 0.1	1,1	11.2 ± 0.6	5,1	11.8 ± 0.1	1,1
Tapidor	11.3 ± 1.5	13	11.6 ± 0.4	3,5	10.3 ± 1.3	12,6	11.3 ± 0.5	4,1
Timber	11.3 ± 1.4	11,9	11.9 ± 0	0,3	11.5 ± 0.1	0,5	12.7 ± 0.3	2,6
Tremie	11.1 ± 1	8,9	11.5 ± 0.1	0,9	10.6 ± 0.3	2,5	11.1 ± 0.2	1,7
Voltige	12.4 ± 0.6	5,2	NA	NA	11.7 ± 1.5	13	12.3 ± 0.2	1,7

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	11.8 ± 0.4	3,6	11.3 ± 0.4	3,8	12,5	11,1
1010-13-2-4	12.3 ± 0.5	4	11.7 ± 0.3	2,4	12,4	11,1
Ambrosia	11.7 ± 0.4	3	11.8 ± 0.3	2,4	12,3	10,6
Andalou	11.2 ± 0.5	4,4	11 ± 0	0	12	10,3
Arack	11.8 ± 0.6	5,4	12,1	NA	11,8	10,6
Astuce	13.3 ± 0.4	3,2	11,8	NA	12,6	11,2
Bagou	11.7 ± 0.8	7,3	11.8 ± 0.7	6	11,8	10,8
Calisto	11.4 ± 0.6	5	11.6 ± 0.5	4,3	12,4	10,8
Caphorn	11.8 ± 0.3	2,4	13 ± 0.6	4,9	12,6	11,7
CF01085	12.2 ± 0.6	5,2	11.7 ± 0.4	3,6	12,5	11,1
Crousty	11.7 ± 0.6	4,8	11.5 ± 1.1	9,8	11,3	11
Dinosor	10.7 ± 0.4	4	11.4 ± 0.4	3,7	10,9	9,9
Farandole	12.1 ± 0.4	2,9	12.7 ± 0.8	6,1	12,3	10,9
Garcia	11.3 ± 0.5	4,4	11.2 ± 0.6	5,7	11,1	10
Glasgow	10.4 ± 1	9,5	11.2 ± 0.6	5,1	11,5	10
Koreli	11.7 ± 1	8,5	12.1 ± 0.7	5,8	12,1	10,6
Maxyl	11.6 ± 0.1	0,6	11.4 ± 0.3	2,5		11,1
Mendel	11.6 ± 0.4	3,1	12.2 ± 0.1	1,2	11,7	11,1
Paledor	11.3 ± 0.6	5,7	11.4 ± 1.4	12,4	11,6	10,8
Perfector	11.7 ± 1.1	9,7	11.3 ± 0	0	11,9	10
Premio	11.3 ± 0.7	6,3	11.4 ± 0.5	4,4	11,4	11,3
Quebon	13 ± 0.8	6,5	13.2 ± 0.4	2,7	13,7	11,5
Robigus	11.3 ± 0.6	5	11.5 ± 0.1	1,2	11,4	9,9
Rosario	11.6 ± 1	8,5	12.1 ± 0.4	2,9	11,5	10
Rytmic	12.8 ± 0.6	4,4	13.2 ± 0.8	6,4	13,7	10,7
Sankara	12.2 ± 0.8	6,4	12 ± 0	0	12,8	10,4
Sogood	11.6 ± 1.2	10,4	11.8 ± 0.7	6	11,5	10,3
Soissons	12.1 ± 0.3	2,3	11.6 ± 0.5	4,3	12,1	11,2
Tapidor	11.3 ± 0.5	4,4	11.1 ± 0.9	8,3	12,5	10,4
Timber	12.1 ± 0.5	4,1	11.6 ± 0.2	1,8	12	10,9
Tremie	10.6 ± 0.4	4	11.6 ± 0.1	1,2	11,1	10,4
Voltige	NA	NA	11.5 ± 0.1	0,6	NA	11,2

	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	11.9 ± 0.6	5,4	11.9 ± 0.1	1	11.7 ± 0.4	3,8
1010-13-2-4	12.1 ± 0.7	6,1	12.9 ± 0.7	5,8	11.6 ± 0.8	7,3
Andalou	10.5 ± 0.1	0,8	11.3 ± 0	0,2	10.4 ± 0.5	5,3
Astuce	11.7 ± 0.3	2,7	11.5 ± 0.2	2,1	11.4 ± 0.6	5,6
Bagou	11 ± 0.1	0,6	11 ± 0.2	1,9	10.8 ± 0.5	4,4
Caphorn	11.4 ± 0.1	0,6	12.6 ± 1.4	10,7	11.4 ± 0.8	7,2
Crousty	11.4 ± 0.1	1,2	11.2 ± 0.1	0,8	12.3 ± 0.3	2,2
Dinosor	10.8 ± 0.1	1,2	10.9 ± 1.3	12,4	10.3 ± 1.1	11,1
Farandole	11.9 ± 0.1	0,8	11.8 ± 0.3	2,8	11.7 ± 0.6	5,1
Glasgow	10.8 ± 0.1	1,3	11.1 ± 0.1	1	10.5 ± 0.6	5,5
Koreli	11 ± 0.6	5,5	11.2 ± 0.7	6,3	10.9 ± 1.1	9,8
Mendel	10.7 ± 0.3	2,4	10.6 ± 0.4	3,8	11.1 ± 0.3	3,1
Paledor	11.4 ± 0.6	5	11.8 ± 0	0,2	11.4 ± 0.6	5,5
Premio	11.3 ± 0.2	1,4	11.4 ± 0.5	4,2	11.1 ± 0.6	5,7
Quebon	12.3 ± 1.2	10,1	13.3 ± 1.1	8,3	12 ± 0.9	7,4
Robigus	10.9 ± 0.4	3,6	11.1 ± 0.1	1,3	10.6 ± 0.3	2,5
Rytmic	11.4 ± 0.1	1,1	11.7 ± 0.4	3	11.8 ± 0.9	7,2
Sankara	11.2 ± 0.9	8,1	11.5 ± 0.4	3,3	10.8 ± 0.6	5,7
Sogood	11.6 ± 1.1	9,7	11.4 ± 0.1	0,5	10.8 ± 0.5	4,8
Soissons	11.8 ± 0.2	1,9	12.4 ± 0.3	2,6	11.8 ± 0.3	2,7
Tapidor	10.6 ± 0	0,1	10.6 ± 0.1	1,4	11 ± 0.4	3,9
Tremie	10.2 ± 0.4	3,9	11.3 ± 0.4	3,4	10.6 ± 0.3	3

# ANNEXES - Dureté pour les variétés françaises



Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Glasgow	19	19.0284	1.91969	X
Paledor	20	21.4413	1.8564	XX
Farandole	18	23.491	1.96156	XXX
Astuce	20	25.9256	1.8564	XXX
Voltige	9	28.7773	2.80253	XXX
Calisto	14	31.2495	2.24948	XX
Robigus	20	31.6125	1.8564	X
Ambrosia	14	32.187	2.24948	X
1010-13-2-1	12	32.5955	2.43044	X
Crousty	20	33.0312	1.8564	X
Bagou	20	33.2266	1.8564	X
Timber	14	48.262	2.24948	X
Mendel	20	63.8544	1.8564	X
Ephoros	6	63.9512	3.42079	XXX
Dinosor	20	65.209	1.8564	XX
CF01085	12	65.6561	2.44021	XXX
Perfector	14	66.814	2.24948	XXX
Tapidor	20	67.0281	1.8564	XXX
Soissons	20	67.365	1.8564	XXX
Tremie	20	69.7367	1.8564	XXX
Arack	14	70.0015	2.24948	XXX
Maxyl	13	70.8284	2.3214	XXXX
Rosario	14	71.1474	2.24948	XXX
Andalou	20	71.3736	1.8564	XXX
Sankara	20	73.1746	1.8564	XXX
Garcia	14	74.5057	2.24948	XXXX
Caphorn	20	74.6544	1.8564	XXXX
Premio	20	76.2009	1.8564	XXX
Koreli	18	77.4898	1.96156	XXX
1010-13-2-4	12	77.9241	2.43044	XXX
Sogood	20	78.5357	1.8564	XX
Rytmic	18	82.4948	1.96156	XX
Quebon	12	84.9384	2.43044	X

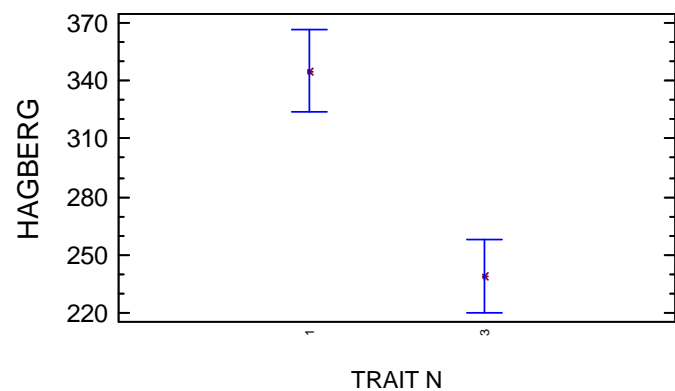
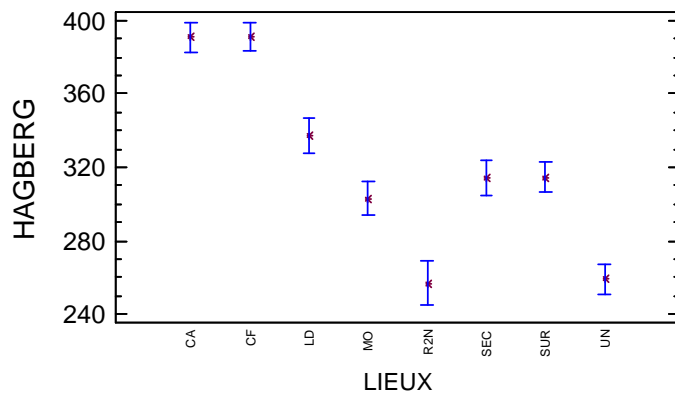
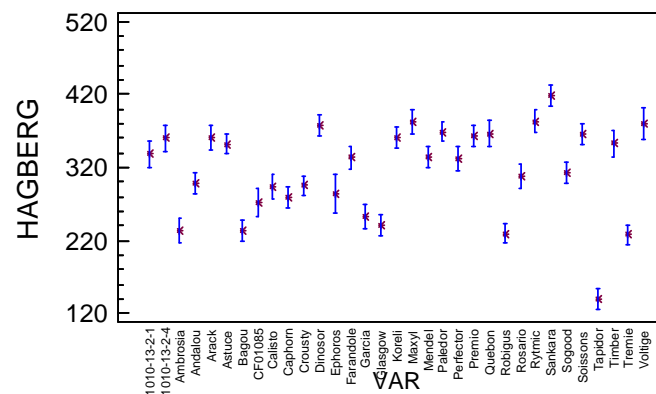
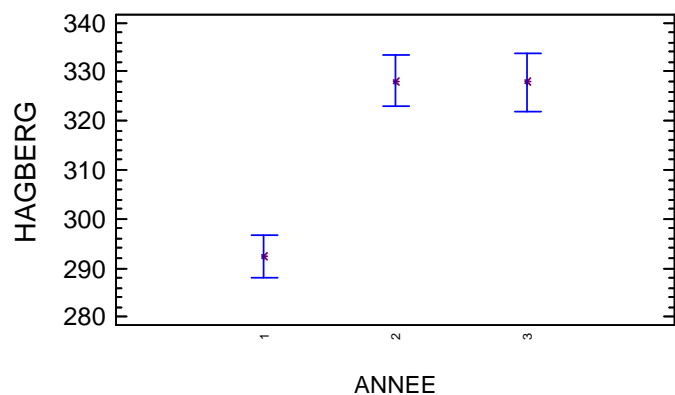
## ANNEXES - Dureté pour les variétés françaises

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	39 ± 5.8	15	47.7 ± 5.7	12	31.9 ± 12.6	39,5	35.5 ± 7.1	20,1
Andalou	78.5 ± 0.8	1	88.9 ± 2.7	3	76 ± 10.3	13,6	79.5 ± 0.2	0,2
Arack	65.4 ± 8.7	13,4	80.2 ± 2.1	2,7	68.9 ± 0.9	1,2	65.2 ± 4.9	7,5
Astuce	37.9 ± 0.6	1,5	41.1 ± 0.5	1,2	27.3 ± 3.2	11,6	24.2 ± 0.7	2,9
Bagou	34.5 ± 2.2	6,3	51.8 ± 0.9	1,7	44.5 ± 5	11,2	33.3 ± 7.7	23,1
Calisto	35.9 ± 4.4	12,3	43.3 ± 6.3	14,5	40.3 ± 5.6	13,8	29 ± 2.6	8,9
Caphorn	76.3 ± 10	13,1	93.9 ± 3.6	3,9	72.4 ± 13.7	18,9	75 ± 1.2	1,6
CF01085	66 ± 4	6,1			70.5 ± 5.3	7,5	64 ± 1.8	2,7
Crousty	39.6 ± 2.7	6,7	49.3 ± 1.7	3,5	31.7 ± 1.7	5,5	29.2 ± 0.1	0,2
Dinosaur	62.2 ± 3.6	5,7	77.3 ± 0.3	0,4	65.3 ± 0.4	0,6	61.4 ± 0.8	1,4
Ephoros	71 ± 8.7	12,2			64.2 ± 3	4,8	63.4 ± 3.3	5,3
Farandole	23.1 ± 13.6	58,8			31 ± 3.1	10	23 ± 4.5	19,5
Garcia	84.4 ± 4.4	5,2	93.8 ± 9.1	9,7	82.6 ± 14	16,9	72.9 ± 4.6	6,4
Glasgow	25.3 ± 2.2	8,5			26.2 ± 11	42,1	21.2 ± 7.2	33,8
Koreli	83.6 ± 3.8	4,5			85.9 ± 5.3	6,1	76.3 ± 8.6	11,3
Maxyl	83.2 ± 3.7	4,4	85.4 ± 2.8	3,3	82.5 ± 4.4	5,3	79.9 ± 6	7,6
Mendel	59 ± 2.4	4,1	72.2 ± 0.9	1,3	69.3 ± 1.7	2,4	64.1 ± 7.2	11,2
Paledor	26.9 ± 7.6	28,3	25.7 ± 8.3	32,1	32.9 ± 0.6	1,9	20.9 ± 4.2	20
Perfector	67.7 ± 8.7	12,8	85.2 ± 0.6	0,7	69.2 ± 1	1,5	60.8 ± 8.5	14
Premio	81.7 ± 8.3	10,2	92.3 ± 1.3	1,4	84.5 ± 10.3	12,2	67.5 ± 11.9	17,6
Robigus	38 ± 6.1	16,1	49.1 ± 3.3	6,6	49.5 ± 0.1	0,2	25.1 ± 4	16
Rosario	68.7 ± 5.6	8,1	87.5 ± 2.2	2,5	71.6 ± 7.6	10,6	63.2 ± 5.3	8,3
Rytmic	82.7 ± 3.4	4,1			86.6 ± 4.9	5,6	74.1 ± 2.1	2,8
Sankara	67.8 ± 3.5	5,2	85.2 ± 6.7	7,9	76.5 ± 2.4	3,1	66.5 ± 12	18,1
Sogood	78 ± 3.4	4,4	92 ± 3.7	4,1	85 ± 2.6	3	80.2 ± 1.5	1,9
Soissons	63.3 ± 9.4	14,9	74.4 ± 0.4	0,5	64.7 ± 5.2	8	56 ± 0.9	1,6
Tapidor	79.9 ± 2.8	3,5	72.5 ± 1.7	2,3	75.2 ± 2.1	2,8	67.3 ± 4.7	6,9
Timber	56.9 ± 15.7	27,6	61.8 ± 8.8	14,2	60 ± 11.8	19,7	57.7 ± 3.9	6,8
Tremie	73.4 ± 6.7	9,1	75.2 ± 5	6,7	74.5 ± 1	1,3	62.9 ± 2.7	4,3
Voltige	28.4 ± 8.4	29,4			32.9 ± 4.2	12,7	25.6 ± 12.7	49,6

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	32.5 ± 13.4	41,3	21 ± 12.7	60,6	31	40
1010-13-2-4	72.5 ± 12	16,6	74.5 ± 3.5	4,7	85	61
Ambrosia	37.5 ± 19.1	50,9	19 ± 8.5	44,7	31	26
Andalou	67 ± 2.8	4,2	54.5 ± 10.6	19,5	85	62
Arack	71.5 ± 9.2	12,9	77 ± 11.3	14,7	83	67
Astuce	19 ± 7.1	37,2	19.5 ± 2.1	10,9	17	23
Bagou	28.5 ± 9.2	32,3	32.5 ± 6.4	19,6	43	29
Calisto	35 ± 15.6	44,4	24.5 ± 12	49,1	26	20
Caphorn	69 ± 1.4	2	70.5 ± 24.7	35,1	87	83
CF01085	71 ± 12.7	17,9	54 ± 15.6	28,8	71	62
Crousty	30.5 ± 0.7	2,3	20 ± 7.1	35,4	31	30
Dinosaur	65.5 ± 2.1	3,2	66.5 ± 13.4	20,2	45	69
Farandole	26 ± 11.3	43,5	19.5 ± 3.5	18,1	20	36
Garcia	66 ± 11.3	17,1	62.5 ± 4.9	7,9	61	83
Glasgow	5.5 ± 2.1	38,6	9 ± 2.8	31,4	14	29
Koreli	67 ± 0	0	61.5 ± 0.7	1,1	76	92
Maxyl	60 ± 12.7	21,2	48 ± 0	0	67	67
Mendel	68.5 ± 9.2	13,4	54 ± 5.7	10,5	79	73
Paledor	19.5 ± 27.6	141,4	16 ± 5.7	35,4	22	34
Perfector	69 ± 7.1	10,2	54 ± 2.8	5,2	69	85
Premio	69 ± 9.9	14,3	66 ± 4.2	6,4	90	69
Quebon	74 ± 5.7	7,6	79.5 ± 27.6	34,7	86	97
Robigus	24 ± 1.4	5,9	27 ± 9.9	36,7	19	35
Rosario	74.5 ± 4.9	6,6	61.5 ± 3.5	5,7	84	87
Rytmic	88 ± 8.5	9,6	64.5 ± 3.5	5,5	80	100
Sankara	79 ± 5.7	7,2	64 ± 21.2	33,1	93	85
Sogood	85 ± 12.7	15	83 ± 7.1	8,5	53	50
Soissons	72.5 ± 16.3	22,4	63.5 ± 17.7	27,8	82	82
Tapidor	61.5 ± 6.4	10,3	61.5 ± 23.3	37,9	66	62
Timber	31.5 ± 0.7	2,2	30 ± 2.8	9,4	61	52
Tremie	69.5 ± 12	17,3	64.5 ± 14.8	23	88	82
Voltige			29.5 ± 10.6	36		27

	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	31.4 ± 3.6	11,4	26.7 ± 4.4	16,4	32.7 ± 3.5	10,7
1010-13-2-4	85.7 ± 2.2	2,6	65.3 ± 12.5	19,1	76.9 ± 3.3	4,3
Andalou	67.5 ± 0.8	1,2	66.2 ± 0	0	64.5 ± 1.3	2
Astuce	24.2 ± 6.2	25,8	23.5 ± 3.7	15,9	22 ± 4.4	20,1
Bagou	22.3 ± 2.2	9,7	25.8 ± 3.3	12,7	25.6 ± 1.4	5,3
Caphorn	66.8 ± 5.8	8,7	69.4 ± 16.1	23,2	68.9 ± 3.3	4,8
Crousty	33.8 ± 10	29,5	32.6 ± 0.2	0,5	34.9 ± 4.2	12,1
Dinosaur	72.2 ± 2.3	3,2	66 ± 14.3	21,6	58.3 ± 6	10,3
Farandole	19.3 ± 1.8	9,6	18.7 ± 3.5	18,7	14.5 ± 0.9	6,5
Glasgow	16.7 ± 2.8	16,5	19 ± 4.2	22,2	13.2 ± 2.2	16,6
Koreli	81 ± 5.4	6,7	74.9 ± 2.3	3,1	73.2 ± 9.1	12,5
Mendel	58.2 ± 4.2	7,2	57.3 ± 7.6	13,2	61.5 ± 2.3	3,7
Paledor	15.5 ± 1.1	7,4	19.8 ± 2.6	13,4	14.4 ± 1.6	11,1
Premio	78.4 ± 6	7,6	73.7 ± 7.3	9,9	71.8 ± 9.6	13,4
Quebon	87.3 ± 12.1	13,9	78.9 ± 5.5	7	81.4 ± 3.1	3,9
Robigus	29.2 ± 0	0,1	26.5 ± 0.5	1,8	23.6 ± 2.6	11,1
Rytmic	83.1 ± 2.7	3,3	79.8 ± 1.9	2,3	84.7 ± 8.1	9,6
Sankara	70.8 ± 3.1	4,4	65.6 ± 5.4	8,2	68.9 ± 5.5	7,9
Sogood	81 ± 17.6	21,7	74.5 ± 1.6	2,2	74.4 ± 2.4	3,2
Soissons	72.5 ± 5.5	7,6	63.5 ± 3.1	5	65.1 ± 2.7	4,2
Tapidor	63 ± 7.3	11,6	58.6 ± 3	5,1	67.8 ± 0.9	1,4
Tremie	67.9 ± 3.3	4,8	65.1 ± 1.4	2,1	63.6 ± 4	6,3

## ANNEXES - Temps de chute de Hagberg pour les variétés françaises en secondes




---

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tapidor	20	140.863	10.1268	X
Tremie	20	227.651	10.1268	X
Robigus	20	229.903	10.1268	X
Bagou	20	232.984	10.1268	X
Ambrosia	14	233.216	12.271	X
Glasgow	19	239.923	10.472	XX
Garcia	14	252.966	12.271	XXX
CF01085	12	271.808	13.3115	XXX
Caphorn	20	279.585	10.1268	XXX
Ephoros	6	283.466	18.6606	XXXX
Calisto	14	294.549	12.271	XXX
Crousty	20	294.989	10.1268	XXX
Andalou	20	299.216	10.1268	XXX
Rosario	14	307.507	12.271	XXX
Sogood	20	312.499	10.1268	XX
Perfector	14	332.945	12.271	XXX
Farandole	18	333.329	10.7004	XX
Mendel	20	334.737	10.1268	XXX
1010-13-2-1	12	338.361	13.2582	XXXX
Astuce	20	352.282	10.1268	XXXX
Timber	14	352.445	12.271	XXXXX
1010-13-2-4	12	359.633	13.2582	XXXXX
Arack	14	359.966	12.271	XXXXX
Koreli	18	360.804	10.7004	XXXXX
Premio	20	362.817	10.1268	XXXX
Soissons	20	365.605	10.1268	XXX
Quebon	12	366.147	13.2582	XXXXX
Paledor	20	368.989	10.1268	XXX
Dinosor	20	377.923	10.1268	XX
Voltige	9	380.736	15.288	XX
Maxyl	13	382.03	12.6634	XX
Rytmic	18	383.242	10.7004	X
Sankara	20	418.014	10.1268	X

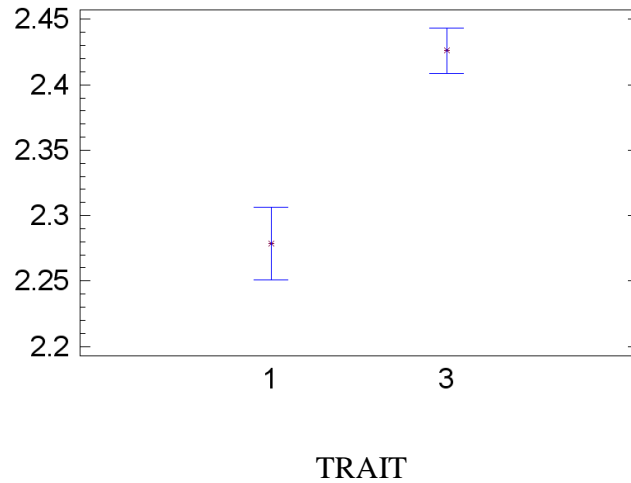
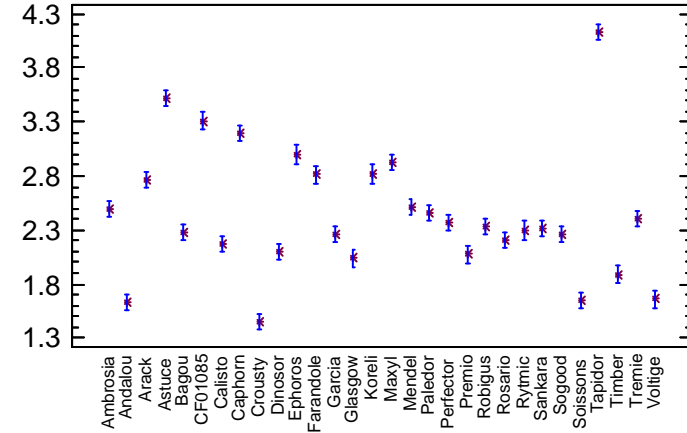
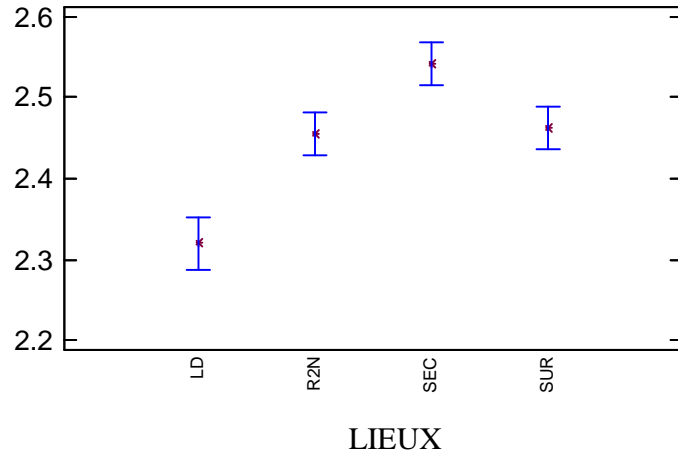
## ANNEXES - Temps de chute de Hagberg pour les variétés françaises en secondes

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	214.5 ± 28.99	13,52	131.5 ± 12.02	9,14	211.5 ± 28.99	13,71	177.5 ± 12.02	6,77
Andalou	323 ± 14.14	4,38	263.5 ± 23.33	8,86	246 ± 28.28	11,5	254 ± 73.54	28,95
Arack	372.5 ± 6.36	1,71	363.5 ± 30.41	8,36	270 ± 22.63	8,38	413.5 ± 10.61	2,57
Astuce	348.5 ± 9.19	2,64	356.5 ± 0.71	0,2	338.5 ± 78.49	23,19	347 ± 26.87	7,74
Bagou	225 ± 9.9	4,4	186 ± 9.9	5,32	240.5 ± 23.33	9,7	204 ± 16.97	8,32
Calisto	303.5 ± 44.55	14,68	337.5 ± 33.23	9,85	140.5 ± 3.54	2,52	235 ± 1.41	0,6
Caphorn	204 ± 11.31	5,55	259.5 ± 28.99	11,17	198 ± 5.66	2,86	220.5 ± 34.65	15,71
CF01085	229.5 ± 6.36	2,77			197.5 ± 60.1	30,43	206.5 ± 64.35	31,16
Crousty	276.5 ± 16.26	5,88	289 ± 82.02	28,38	265.5 ± 21.92	8,26	183.5 ± 7.78	4,24
Dinosor	389 ± 31.11	8	395.5 ± 6.36	1,61	406.5 ± 43.13	10,61	374.5 ± 21.92	5,85
Ephoros	262.5 ± 37.48	14,28			264 ± 11.31	4,29	241.5 ± 17.68	7,32
Farandole	370.5 ± 27.58	7,44			209.5 ± 31.82	15,19	313.5 ± 86.97	27,74
Garcia	215 ± 53.74	25	178.5 ± 23.33	13,07	134.5 ± 88.39	65,72	190.5 ± 9.19	4,83
Glasgow	226.5 ± 6.36	2,81			189 ± 38.18	20,2	192.5 ± 2.12	1,1
Koreli	407.5 ± 41.72	10,24			342.5 ± 28.99	8,46	379.5 ± 12.02	3,17
Maxyl	415 ± 33.94	8,18	316 ± 15.56	4,92	368 ± 49.5	13,45	352 ± 57.98	16,47
Mendel	349.5 ± 96.87	27,72	345 ± 84.85	24,6	231.5 ± 19.09	8,25	337 ± 38.18	11,33
Paledor	384.5 ± 48.79	12,69	387.5 ± 2.12	0,55	356 ± 31.11	8,74	394 ± 2.83	0,72
Perfector	340 ± 55.15	16,22	373.5 ± 4.95	1,33	175 ± 11.31	6,46	310 ± 33.94	10,95
Premio	351 ± 26.87	7,66	341 ± 77.78	22,81	370.5 ± 24.75	6,68	324 ± 104.65	32,3
Robigus	216 ± 19.8	9,17	208 ± 19.8	9,52	161.5 ± 33.23	20,58	232 ± 8.49	3,66
Rosario	276.5 ± 3.54	1,28	305 ± 86.27	28,28	247 ± 4.24	1,72	285 ± 45.25	15,88
Rytmic	412 ± 49.5	12,01			360 ± 39.6	11	303.5 ± 125.16	41,24
Sankara	439 ± 36.77	8,38	464.5 ± 16.26	3,5	380 ± 15.56	4,09	437.5 ± 12.02	2,75
Sogood	315 ± 18.38	5,84	278 ± 18.38	6,61	233.5 ± 36.06	15,44	270.5 ± 10.61	3,92
Soissons	383 ± 16.97	4,43	357 ± 32.53	9,11	342.5 ± 4.95	1,45	366 ± 19.8	5,41
Tapidor	98 ± 50.91	51,95	145.5 ± 21.92	15,07	79.5 ± 24.75	31,13	152.5 ± 4.95	3,25
Timber	363.5 ± 38.89	10,7	356.5 ± 53.03	14,88	251.5 ± 74.25	29,52	364.5 ± 13.44	3,69
Tremie	213 ± 9.9	4,65	199.5 ± 17.68	8,86	86.5 ± 14.85	17,17	230.5 ± 7.78	3,37
Voltige	388.5 ± 19.09	4,91			360 ± 9.9	2,75	367 ± 33.94	9,25

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	392.5 ± 14.85	3,78	395 ± 14.14	3,58	261	314
1010-13-2-4	440.5 ± 10.61	2,41	424 ± 2.83	0,67	345	286
Ambrosia	372 ± 14.14	3,8	334 ± 114.55	34,3	195	183
Andalou	343.5 ± 78.49	22,85	393 ± 31.11	7,92	273	275
Arack	419.5 ± 9.19	2,19	418.5 ± 20.51	4,9	258	258
Astuce	439.5 ± 3.54	0,8	377 ± 16.97	4,5	248	364
Bagou	296.5 ± 37.48	12,68	319 ± 21.21	6,65	251	211
Calisto	399.5 ± 20.51	5,13	409 ± 28.28	6,92	238	258
Caphorn	371.5 ± 2.12	0,57	409.5 ± 19.09	4,66	351	231
CF01085	380 ± 22.63	5,95	417.5 ± 3.54	0,85	187	214
Crousty	392 ± 7.07	1,8	402 ± 18.38	4,57	203	238
Dinosor	429 ± 14.14	3,3	389 ± 9.9	2,54	252	276
Farandole	407 ± 43.84	10,77	439.5 ± 26.16	5,95	208	268
Garcia	418.5 ± 50.2	12	441 ± 12.73	2,89	218	182
Glasgow	319 ± 21.21	6,65	294 ± 8.49	2,89	226	216
Koreli	413 ± 26.87	6,51	396.5 ± 14.85	3,75	257	371
Maxyl	423.5 ± 17.68	4,17	457.5 ± 7.78	1,7		363
Mendel	419.5 ± 19.09	4,55	436 ± 8.49	1,95	181	223
Paledor	403 ± 0	0	398.5 ± 9.19	2,31	302	363
Perfector	398.5 ± 37.48	9,4	424.5 ± 14.85	3,5	291	351
Premio	433 ± 2.83	0,65	423 ± 16.97	4,01	355	303
Quebon	436.5 ± 7.78	1,78	439.5 ± 9.19	2,09	216	302
Robigus	291 ± 12.73	4,37	233 ± 1.41	0,61	202	202
Rosario	404 ± 24.04	5,95	360.5 ± 13.44	3,73	267	277
Rytmic	422 ± 39.6	9,38	445.5 ± 6.36	1,43	297	383
Sankara	432.5 ± 24.75	5,72	433.5 ± 12.02	2,77	394	371
Sogood	388 ± 32.53	8,38	387 ± 1.41	0,37	289	260
Soissons	430 ± 31.11	7,24	396 ± 12.73	3,21	321	355
Tapidor	209.5 ± 6.36	3,04	240 ± 2.83	1,18	136	95
Timber	424.5 ± 36.06	8,5	413.5 ± 10.61	2,57	255	358
Tremie	336 ± 25.46	7,58	397.5 ± 12.02	3,02	220	184
Voltige			393 ± 16.97	4,32		356

	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	335 ± 21.21	6,33	375 ± 16.97	4,53	381 ± 18.38	4,83
1010-13-2-4	331.5 ± 45.96	13,86	389 ± 16.97	4,36	389 ± 9.9	2,54
Andalou	277 ± 1.41	0,51	345.5 ± 4.95	1,43	317 ± 12.73	4,02
Astuce	368 ± 8.49	2,31	301.5 ± 31.82	10,55	386.5 ± 28.99	7,5
Bagou	189 ± 15.56	8,23	225 ± 5.66	2,51	259.5 ± 2.12	0,82
Caphorn	367.5 ± 24.75	6,73	257.5 ± 9.19	3,57	262 ± 16.97	6,48
Crousty	331.5 ± 23.33	7,04	340.5 ± 16.26	4,78	287 ± 11.31	3,94
Dinosor	408.5 ± 3.54	0,87	342.5 ± 44.55	13,01	428 ± 42.43	9,91
Farandole	344.5 ± 26.16	7,59	356.5 ± 9.19	2,58	365 ± 19.8	5,42
Glasgow	311 ± 8.49	2,73	211.5 ± 19.09	9,03	276 ± 5.66	2,05
Koreli	348.5 ± 17.68	5,07	331.5 ± 28.99	8,75	371.5 ± 9.19	2,47
Mendel	380 ± 1.41	0,37	326 ± 50.91	15,62	357.5 ± 21.92	6,13
Paledor	337.5 ± 0.71	0,21	368.5 ± 3.54	0,96	371 ± 12.73	3,43
Premio	376.5 ± 24.75	6,57	381 ± 4.24	1,11	356 ± 1.41	0,4
Quebon	394.5 ± 9.19	2,33	391.5 ± 30.41	7,77	404.5 ± 12.02	2,97
Robigus	322.5 ± 16.26	5,04	231 ± 7.07	3,06	250.5 ± 3.54	1,41
Rytmic	407 ± 9.9	2,43	385.5 ± 0.71	0,18	422 ± 22.63	5,36
Sankara	424.5 ± 13.44	3,16	413 ± 22.63	5,48	419.5 ± 16.26	3,88
Sogood	363 ± 1.41	0,39	300.5 ± 21.92	7,29	362.5 ± 36.06	9,95
Soissons	373.5 ± 4.95	1,33	345.5 ± 12.02	3,48	367.5 ± 30.41	8,27
Tapidor	175 ± 53.74	30,71	128.5 ± 2.12	1,65	116.5 ± 40.31	34,6
Tremie	284.5 ± 23.33	8,2	191.5 ± 7.78	4,06	179.5 ± 26.16	14,58

# ANNEXES - Viscosité potentielle pour les variétés françaises



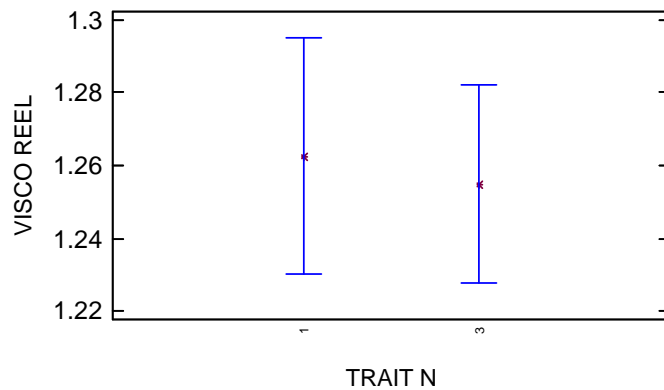
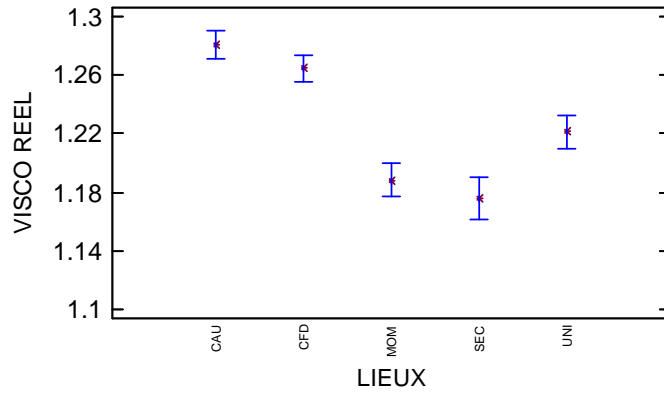
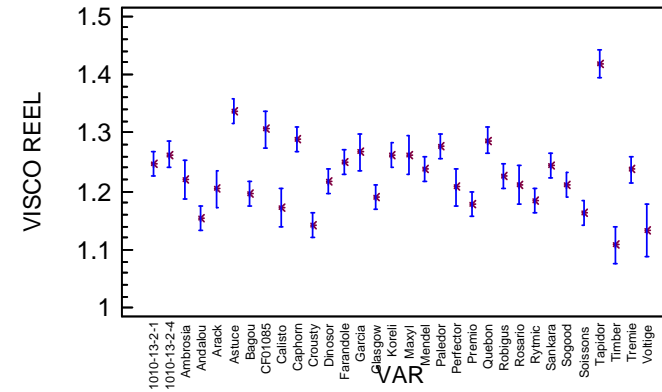
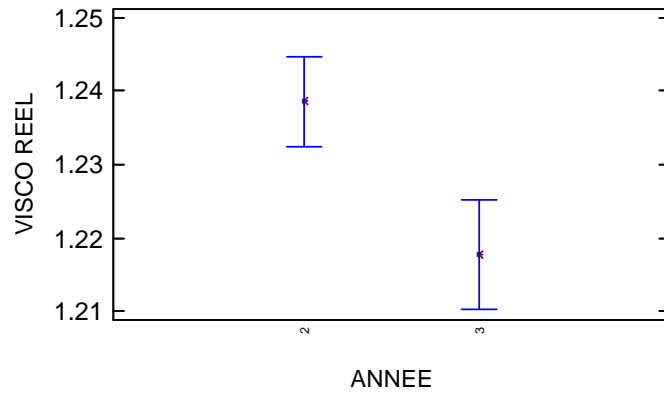
Method: 95.0 percent LSD

VARIETES	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Crousty	8	1.45308	0.0522926	X
Andalou	8	1.62973	0.0522926	X
Soissons	8	1.64273	0.0522926	X
Voltige	6	1.66037	0.0607081	X
Timber	7	1.88758	0.0560617	X
Glasgow	7	2.03922	0.0560617	XX
Premio	8	2.07185	0.0522926	XX
Dinosor	8	2.09756	0.0522926	XX
Calisto	8	2.174	0.0522926	XXX
Rosario	8	2.21293	0.0522926	XXX
Sogood	8	2.25936	0.0522926	XXX
Garcia	8	2.2646	0.0522926	XXXX
Bagou	8	2.28369	0.0522926	XXXX
Rytmic	6	2.29789	0.0607081	XXXX
Sankara	8	2.31983	0.0522926	XXXXX
Robigus	8	2.32677	0.0522926	XXXX
Perfector	8	2.36088	0.0522926	XXXX
Tremie	8	2.40684	0.0522926	XXX
Paledor	8	2.46327	0.0522926	XX
Ambrosia	8	2.49186	0.0522926	X
Mendel	8	2.5051	0.0522926	X
Arack	8	2.76656	0.0522926	X
Farandole	6	2.81301	0.0607081	XX
Koreli	6	2.82109	0.0607081	XX
Maxyl	8	2.92994	0.0522926	XX
Ephoros	6	3.0001	0.0607081	X
Caphorn	8	3.20217	0.0522926	X
CF01085	6	3.30903	0.0607081	X
Astuce	8	3.51565	0.0522926	X
Tapidor	8	4.13309	0.0522926	X

## ANNEXES - Viscosité potentielle pour les variétés françaises

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	2.498 ± 0.13	5,216	2.38 ± 0.061	2,582	2.603 ± 0.086	3,313	2.486 ± 0.029	1,153
Andalou	1.69 ± 0.127	7,537	1.643 ± 0.035	2,15	1.739 ± 0.144	8,295	1.447 ± 0.307	21,216
Arack	2.808 ± 0.086	3,06	2.671 ± 0.028	1,042	2.889 ± 0.026	0,912	2.697 ± 0.09	3,322
Astuce	3.551 ± 0.449	12,641	3.494 ± 0.132	3,775	3.509 ± 0.044	1,244	3.508 ± 0.028	0,796
Bagou	2.219 ± 0.201	9,073	2.331 ± 0.007	0,282	2.329 ± 0.09	3,86	2.256 ± 0.092	4,083
Calisto	2.147 ± 0.02	0,928	1.954 ± 0.16	8,188	2.357 ± 0.2	8,485	2.237 ± 0.119	5,334
Caphorn	3.297 ± 0.075	2,261	2.921 ± 0.405	13,872	3.551 ± 0.166	4,68	3.04 ± 0.488	16,049
CF01085	3.291 ± 0.061	1,858			3.481 ± 0.132	3,778	3.28 ± 0.274	8,345
Crousty	1.372 ± 0.035	2,566	1.393 ± 0.068	4,896	1.558 ± 0.027	1,754	1.489 ± 0.079	5,286
Dinosaur	2.095 ± 0.041	1,981	2.168 ± 0.093	4,292	2.083 ± 0.061	2,953	2.045 ± 0.11	5,379
Ephoros	2.9 ± 0.036	1,256			3.176 ± 0.059	1,848	3.05 ± 0.08	2,639
Farandole	2.916 ± 0.066	2,259			2.868 ± 0.061	2,12	2.78 ± 0.226	8,142
Garcia	2.327 ± 0.01	0,447	2.026 ± 0.086	4,23	2.301 ± 0.199	8,631	2.403 ± 0.008	0,334
Glasgow	2.142 ± 0.091	4,24			2.054 ± 0.053	2,579	1.999 ± 0.168	8,407
Koreli	2.768 ± 0.057	2,053			2.91 ± 0.03	1,042	2.91 ± 0.275	9,45
Maxyl	3.042 ± 0	0,011	2.506 ± 0.413	16,491	3.215 ± 0.049	1,527	2.956 ± 0.012	0,394
Mendel	2.7 ± 0.041	1,51	2.177 ± 0.46	21,115	2.642 ± 0.048	1,813	2.502 ± 0.078	3,126
Paledor	2.539 ± 0.038	1,497	2.042 ± 0.166	8,12	2.602 ± 0.118	4,541	2.67 ± 0.095	3,573
Perfector	2.371 ± 0.071	3,015	2.258 ± 0.215	9,499	2.415 ± 0.003	0,145	2.399 ± 0.006	0,26
Premio	2.031 ± 0.172	8,451	2.018 ± 0.019	0,936	2.1 ± 0.043	2,052	2.138 ± 0.1	4,686
Robigus	2.241 ± 0.071	3,184	2.329 ± 0.013	0,569	2.351 ± 0.155	6,604	2.386 ± 0.09	3,78
Rosario	2.211 ± 0.071	3,189	2.108 ± 0.087	4,14	2.273 ± 0.132	5,79	2.26 ± 0.145	6,423
Rytmic	2.36 ± 0.094	3,974			2.323 ± 0.092	3,953	2.335 ± 0.107	4,567
Sankara	2.344 ± 0.039	1,65	2.265 ± 0.088	3,877	2.27 ± 0.062	2,739	2.401 ± 0.092	3,821
Sogood	2.208 ± 0.125	5,654	2.318 ± 0.118	5,082	2.256 ± 0.03	1,331	2.255 ± 0.083	3,688
Soissons	1.668 ± 0.114	6,812	1.486 ± 0.112	7,533	1.729 ± 0.038	2,187	1.688 ± 0.086	5,103
Tapidor	4.091 ± 0.343	8,392	3.723 ± 0.053	1,436	4.478 ± 0.004	0,085	4.241 ± 0.115	2,706
Timber	1.878 ± 0.103	5,498	2,04342647		1.926 ± 0.077	4,002	1.823 ± 0.092	5,072
Tremie	2.305 ± 0.005	0,205	2.342 ± 0.034	1,47	2.537 ± 0.113	4,464	2.443 ± 0.06	2,465
Voltige	1.642 ± 0.12	7,289			1.713 ± 0.097	5,687	1.751 ± 0.017	0,99

# ANNEXES - Viscosité réelle pour les variétés françaises



Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Timber	6	1.1085	0.0227458	X
Voltige	3	1.13177	0.0322113	XXXX
Crousty	12	1.14138	0.0152235	XX
Andalou	12	1.15335	0.0152235	XXX
Soissons	12	1.16422	0.0152235	XXXX
Calisto	6	1.172	0.0227458	XXXXXX
Premio	12	1.17671	0.0152235	XXXXXX
Rytmic	12	1.18525	0.0152235	XXXXXX
Glasgow	12	1.18972	0.0152235	XXXXXX
Bagou	12	1.19698	0.0152235	XXXXXX
Arack	6	1.2045	0.0227458	XXXXXXXX
Perfector	6	1.20762	0.0227458	XXXXXXXX
Rosario	6	1.21112	0.0227458	XXXXXXXX
Sogood	12	1.21164	0.0152235	XXXX
Dinosor	12	1.21715	0.0152235	XXXXXX
Ambrosia	6	1.22012	0.0227458	XXXXXX
Robigus	12	1.22574	0.0152235	XXXXXX
Tremie	12	1.23658	0.0152235	XXXXXX
Mendel	12	1.2376	0.0152235	XXXXXX
Sankara	12	1.24308	0.0152235	XXXX
1010-13-2-1	12	1.24805	0.0152235	XXXXXX
Farandole	12	1.25047	0.0152235	XXXXXX
Maxyl	5	1.26172	0.0240264	XXXXXX
Koreli	12	1.26188	0.0152235	XXXX
1010-13-2-4	12	1.26337	0.0152235	XXXX
Garcia	6	1.26687	0.0227458	XXXXXX
Paledor	12	1.27627	0.0152235	XXX
Quebon	12	1.28744	0.0152235	XX
Caphorn	12	1.28951	0.0152235	XX
CF01085	6	1.306	0.0227458	XX
Astuce	12	1.33768	0.0152235	X
Tapidor	11	1.41799	0.0163213	X



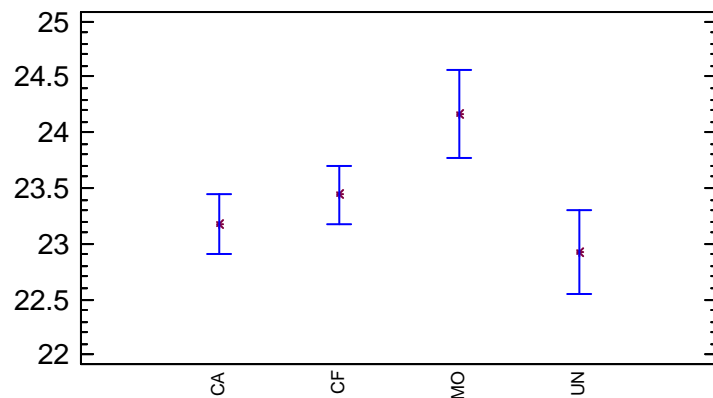
## ANNEXES - Viscosité réelle pour les variétés françaises

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	1.282 ± 0.04	40,318	1.274 ± 0.04	37,318	1,199	1,114
1010-13-2-4	1.285 ± 0.026	41,318	1.326 ± 0.079	52,318	1,113	1,184
Ambrosia	1.306 ± 0.026	46,318	1.254 ± 0.042	28,318	1,159	1,284
Andalou	1.202 ± 0.023	12,318	1.195 ± 0.006	10,318	1,239	1,369
Arack	1.266 ± 0.051	33,318	1.225 ± 0.136	17,318	1,137	1,173
Astuce	1.419 ± 0.069	62,318	1.359 ± 0.027	56,318	1,198	1,185
Bagou	1.243 ± 0.013	21,318	1.245 ± 0.031	23,318	1,223	1,239
Calisto	1.228 ± 0.014	19,318	1.182 ± 0.041	8,318	1,271	1,332
Caphorn	1.368 ± 0.042	58,318	1.334 ± 0.001	53,318	1,184	1,140
CF01085	1.312 ± 0.022	48,318	1.392 ± 0.043	61,318	1,187	1,188
Crousty	1.148 ± 0.01	3,318	1.159 ± 0.021	5,318	1,206	1,202
Dinosor	1.259 ± 0.028	30,318	1.22 ± 0.034	15,318	1,201	1,203
Farandole	1.269 ± 0.044	34,318	1.316 ± 0.115	49,318	1,168	1,198
Garcia	1.374 ± 0.068	59,318	1.304 ± 0.05	45,318	1,137	1,298
Glasgow	1.244 ± 0.012	22,318	1.216 ± 0.054	13,318		1,217
Koreli	1.292 ± 0.064	43,318	1.297 ± 0.061	44,318	1,190	1,238
Maxyl	1.288 ± 0.031	42,318	1.351 ± 0.016	55,318	1,171	1,830
Mendel	1.35 ± 0.003	54,318	1.248 ± 0.035	25,318	1,198	1,182
Paledor	1.251 ± 0.099	27,318	1.31 ± 0.069	47,318	1,098	1,196
Perfector	1.276 ± 0.024	38,318	1.217 ± 0.004	14,318	1,152	1,224
Premio	1.226 ± 0.017	18,318	1.264 ± 0.048	31,318	1,213	1,208
Quebon	1.384 ± 0.013	60,318	1.359 ± 0.026	57,318	1,170	1,213
Robigus	1.316 ± 0.046	50,318	1.224 ± 0.001	16,318	1,180	1,227
Rosario	1.255 ± 0	29,318	1.249 ± 0.019	26,318	1,236	1,214
Rytmic	1.24 ± 0.001	20,318	1.168 ± 0.04	6,318	1,212	1,221
Sankara	1.281 ± 0.03	39,318	1.271 ± 0.025	36,318	1,137	1,154
Sogood	1.265 ± 0.036	32,318	1.245 ± 0.004	24,318	1,288	1,463
Soissons	1.182 ± 0.022	9,318	1.196 ± 0.016	11,318	1,100	1,148
Tapidor	1.493 ± 0.002	63,318	1.521 ± 0.02	64,318	1,166	1,181
Timber	1.17 ± 0.02	7,318	1.12 ± 0.025	2,318		1,192
Tremie	1.319 ± 0.05	51,318	1.27 ± 0.056	35,318	1,173	1,199
Voltige			1.154 ± 0.016	4,318	1,225	1,284

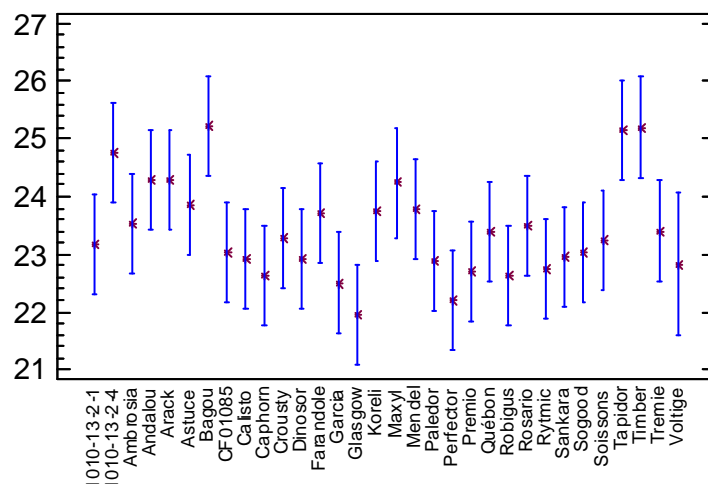
	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	1.23 ± 0.029	2,318	1.249 ± 0.012	0,923	1.287 ± 0.006	0,432
1010-13-2-4	1.252 ± 0.015	1,188	1.225 ± 0.006	0,493	1.263 ± 0.004	0,32
Andalou	1.126 ± 0	0,009	1.143 ± 0.012	1,052	1.145 ± 0.008	0,666
Astuce	1.302 ± 0.017	1,325	1.339 ± 0.006	0,464	1.349 ± 0.029	2,161
Bagou	1.172 ± 0.006	0,5	1.211 ± 0.003	0,242	1.195 ± 0.024	2,026
Caphorn	1.257 ± 0.044	3,466	1.283 ± 0.017	1,305	1.292 ± 0.012	0,961
Crousty	1.127 ± 0.022	1,966	1.145 ± 0.018	1,574	1.151 ± 0.003	0,244
Dinosor	1.173 ± 0.027	2,294	1.238 ± 0.001	0,064	1.262 ± 0.004	0,33
Farandole	1.231 ± 0.078	6,316	1.229 ± 0.013	1,098	1.281 ± 0.024	1,877
Glasgow	1.126 ± 0	0,013	1.201 ± 0.016	1,344	1.204 ± 0.026	2,167
Koreli	1.228 ± 0.023	1,872	1.247 ± 0.028	2,228	1.309 ± 0.083	6,327
Mendel	1.21 ± 0.002	0,147	1.221 ± 0.018	1,49	1.23 ± 0.063	5,088
Paledor	1.165 ± 0.007	0,582	1.219 ± 0.009	0,703	1.303 ± 0.086	6,574
Premio	1.137 ± 0.002	0,136	1.15 ± 0.006	0,547	1.177 ± 0.016	1,328
Quebon	1.225 ± 0.011	0,891	1.29 ± 0.008	0,642	1.3 ± 0.03	2,292
Robigus	1.198 ± 0.001	0,106	1.206 ± 0.017	1,426	1.24 ± 0.03	2,395
Rytmic	1.154 ± 0.014	1,21	1.181 ± 0.04	3,386	1.219 ± 0.02	1,679
Sankara	1.201 ± 0.007	0,592	1.24 ± 0.023	1,833	1.284 ± 0.028	2,155
Sogood	1.16 ± 0.003	0,272	1.203 ± 0.011	0,889	1.226 ± 0.021	1,748
Soissons	1.16 ± 0.004	0,317	1.17 ± 0.01	0,872	1.168 ± 0.022	1,907
Tapidor	1.306 ± 0.068	5,18	1.405 ± 0.01	0,716	1.413 ± 0.082	5,806
Tremie	1.196 ± 0.018	1,547	1.261 ± 0.018	1,443	1.224 ± 0.03	2,47

# ANNEXES - Teneur en amylose pour les variétés françaises en %

## Amylose



## Amylose



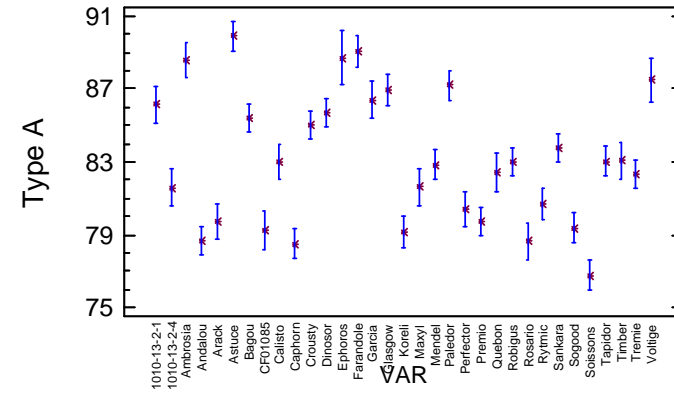
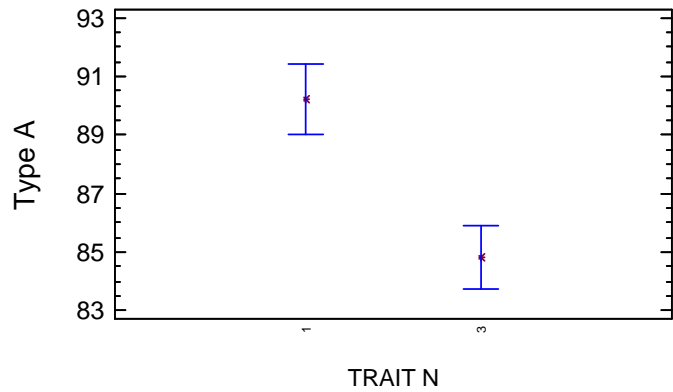
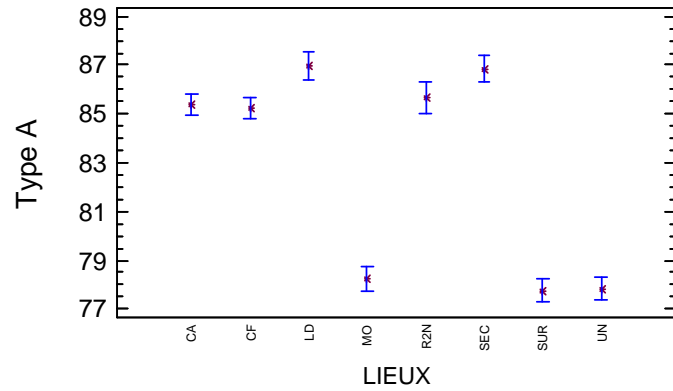
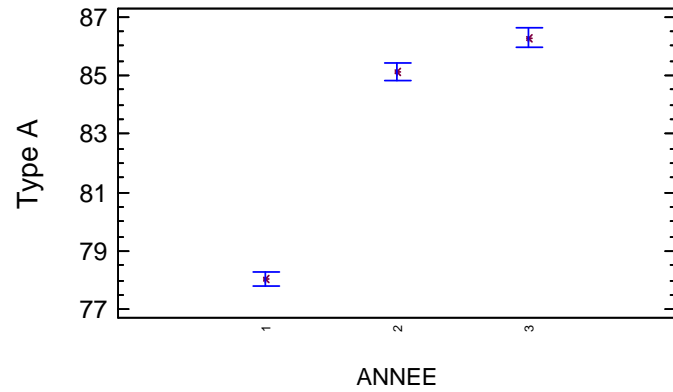
```

-----
Method: 95.0 |
VARIETES      Homogeneous Groups
-----
Glasgow       X
Perfactor     XX
Garcia        XXX
Robigus       XXXX
Caphorn       XXXX
Premio        XXXX
Rytmic        XXXX
Voltige       XXXXX
Paledor       XXXX
Calisto       XXXX
Dinosor       XXXX
Sankara       XXXX
Sogood        XXXXX
CF01085       XXXXX
1010-13-2-1  XXXXX
Soissons      XXXXX
Crousty       XXXXX
Québon        XXXXX
Tremie        XXXXX
Rosario       XXXXXX
Ambrosia      XXXXXXXX
Farandole     XXXXXXXX
Koreli        XXXXXXXX
Mendel        XXXXXXXX
Astuce        XXXXXXXX
Maxyl         XXXXXX
Arack         XXXXX
Andalou       XXXXX
1010-13-2-4  XXX
Tapidor       XX
Timber        XX
Bagou         X
  
```

ANNEXES - Teneur en amylose pour les variétés françaises en %

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy $\pm$ ET	CV (%)	Moy $\pm$ ET	CV (%)		
1010-13-2-1	23.48 $\pm$ 1.05	4,47	23.61 $\pm$ 0.86	3,64	23,08	21,58
1010-13-2-4	23.55 $\pm$ 1.44	6,11	24.66 $\pm$ 1.08	4,38	28,08	23,67
Ambrosia	23.34 $\pm$ 0.93	3,98	24.12 $\pm$ 0.53	2,2	22,51	23,45
Andalou	23.78 $\pm$ 1.24	5,21	25.09 $\pm$ 0.98	3,91	23,47	24,16
Arack	23.97 $\pm$ 3	12,52	24.28 $\pm$ 2.96	12,19	23,85	25,04
Astuce	23.9 $\pm$ 0.08	0,33	24.95 $\pm$ 1.98	7,94	23,78	21,48
Bagou	23.97 $\pm$ 1.07	4,46	24.76 $\pm$ 1.19	4,81	28,28	25,45
Calisto	22.79 $\pm$ 1.24	5,44	23.07 $\pm$ 2.05	8,89	24,63	20,93
Caphorn	22.02 $\pm$ 0.54	2,45	22.17 $\pm$ 1.88	8,48	24,77	22,54
CF01085	24 $\pm$ 2.01	8,38	23.25 $\pm$ 2.74	11,78	22,04	21,55
Crousty	23.25 $\pm$ 0.83	3,57	24.78 $\pm$ 0.92	3,71	25,41	18,08
Dinosor	20.15 $\pm$ 2.74	13,6	23.68 $\pm$ 1.32	5,57	25,18	24,52
Farandole	23.32 $\pm$ 0.66	2,83	23.64 $\pm$ 2.7	11,42	23,25	24,83
Garcia	22.05 $\pm$ 0.71	3,22	22.52 $\pm$ 1.45	6,44	22,79	22,93
Glasgow	22.55 $\pm$ 0.97	4,3	21.47 $\pm$ 0.48	2,24	23,89	19,6
Koreli	22.95 $\pm$ 1.17	5,1	25.18 $\pm$ 2.47	9,81	24,18	21,83
Maxyl	23.72 $\pm$ 2.51	10,58	24.16 $\pm$ 0.74	3,06		24,49
Mendel	23.68 $\pm$ 1.29	5,45	23.09 $\pm$ 4.49	19,45	23,38	25,44
Paledor	22.97 $\pm$ 0.03	0,13	21.45 $\pm$ 0.81	3,78	23,05	25,22
Perfector	22.18 $\pm$ 0.6	2,71	21.96 $\pm$ 1.23	5,6	23,25	21,35
Premio	22.79 $\pm$ 0.78	3,42	22.56 $\pm$ 2.47	10,95	23,77	21,57
Quebon	22.74 $\pm$ 1.33	5,85	23.43 $\pm$ 1.75	7,47	26,14	21,48
Robigus	22.14 $\pm$ 1.27	5,74	23.4 $\pm$ 0.48	2,05	22,3	22,26
Rosario	23.69 $\pm$ 2.96	12,49	22.38 $\pm$ 0.24	1,07	24,54	24,09
Rytmic	22.38 $\pm$ 2.67	11,93	23.38 $\pm$ 1.36	5,82	21,78	22,87
Sankara	22.8 $\pm$ 1.13	4,96	23.08 $\pm$ 3.99	17,29	23,7	22,12
Sogood	24.64 $\pm$ 0.99	4,02	21.39 $\pm$ 1.93	9,02	21,56	24,33
Soissons	23.79 $\pm$ 1.88	7,9	22.92 $\pm$ 0.89	3,88	25,21	20,51
Tapidor	24.78 $\pm$ 0.23	0,93	25.02 $\pm$ 1.52	6,08	24,52	26,73
Timber	25.34 $\pm$ 0.11	0,43	23.85 $\pm$ 0.32	1,34	27,92	24,71
Tremie	22.42 $\pm$ 0.93	4,15	23.98 $\pm$ 0.22	0,92	24,37	23,01
Voltige			23.08 $\pm$ 1.69	7,32		21,82

## ANNEXES - Proportion de granules de type A pour les variétés françaises en %



Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Soissons	20	76.7936	0.577269	X
Caphorn	20	78.5049	0.577269	X
Rosario	14	78.6401	0.699501	XX
Andalou	20	78.6751	0.577269	XX
Koreli	18	79.1666	0.609969	XXX
CF01085	12	79.2462	0.758813	XXX
Sogood	20	79.366	0.577269	XXX
Arack	14	79.7205	0.699501	XXXXXX
Premio	20	79.7352	0.577269	XXXX
Perfector	14	80.3868	0.699501	XXXXXX
Rytmic	18	80.7245	0.609969	XXXXXX
1010-13-2-4	12	81.604	0.755774	XXXXXX
Maxyl	13	81.6263	0.721866	XXXX
Tremie	20	82.331	0.577269	XXX
Quebon	12	82.4045	0.755774	XXXX
Mendel	20	82.827	0.577269	XX
Calisto	14	82.9703	0.699501	XX
Robigus	20	83.0048	0.577269	XX
Tapidor	20	83.0382	0.577269	XX
Timber	14	83.0487	0.699501	XX
Sankara	20	83.7602	0.577269	XX
Crousty	20	85.0089	0.577269	XX
Bagou	20	85.3924	0.577269	XX
Dinosor	20	85.6806	0.577269	XXX
1010-13-2-1	12	86.1205	0.755774	XXXX
Garcia	14	86.4011	0.699501	XXXX
Glasgow	19	86.9385	0.596949	XXXX
Paledor	20	87.1785	0.577269	XXX
Voltige	9	87.4702	0.87148	XXXX
Ambrosia	14	88.5838	0.699501	XXX
Ephoros	6	88.6886	1.06374	XXXX
Farandole	18	89.0331	0.609969	XX
Astuce	20	89.8664	0.577269	X

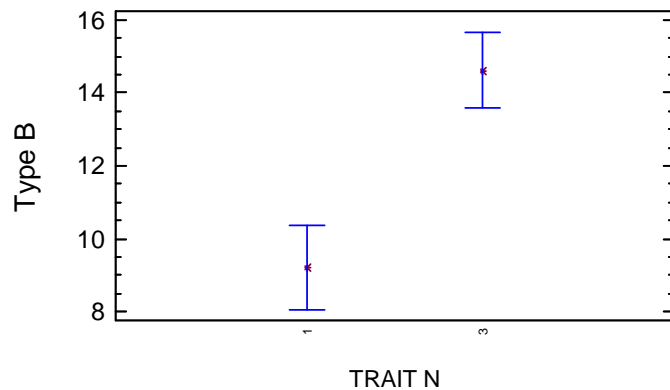
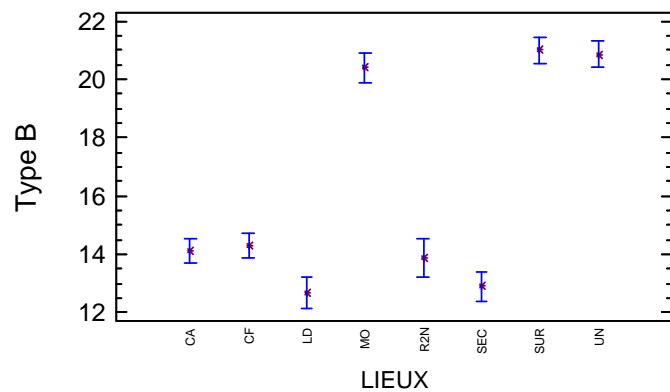
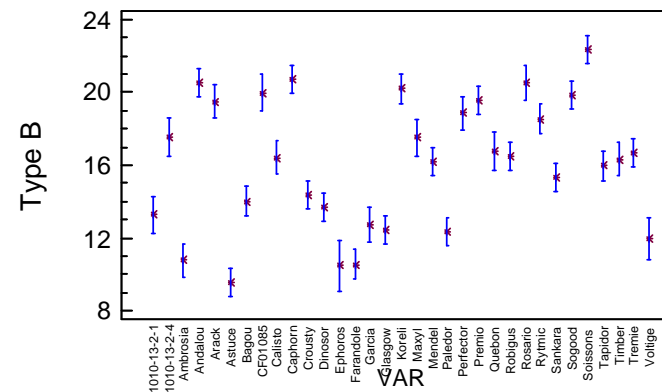
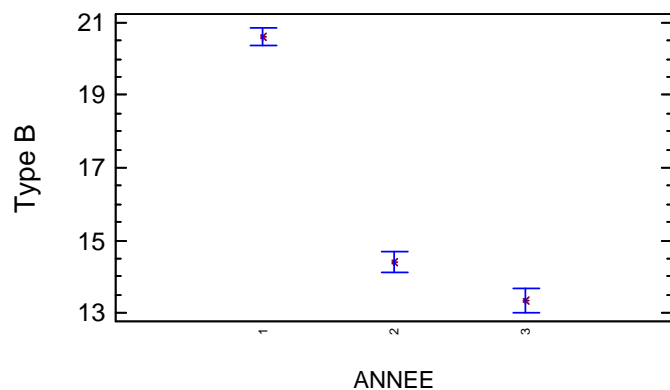
## ANNEXES - Proportion de granules de type A pour les variétés françaises en %

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	84.7 ± 3	3,6	86.1 ± 2.8	3,2	86.2 ± 5.7	6,6	85 ± 2.9	3,4
Andalou	72.8 ± 0.2	0,3	72 ± 0	0	70.5 ± 0.2	0,3	72.1 ± 0.7	1
Arack	71 ± 4	5,6	74 ± 1.2	1,6	74.2 ± 0.6	0,8	75.2 ± 0.9	1,3
Astuce	91.6 ± 2.7	2,9	87.8 ± 0.7	0,8	85.2 ± 0.5	0,6	87.5 ± 1.2	1,3
Bagou	82.1 ± 0.9	1,1	82.3 ± 1.2	1,5	80 ± 2.5	3,1	80.4 ± 0.4	0,5
Calisto	78 ± 2.2	2,8	77.5 ± 2.2	2,9	78.7 ± 2.4	3,1	77.9 ± 0.3	0,4
Caphorn	71 ± 0.8	1,1	71.3 ± 1.2	1,7	70.6 ± 0.4	0,5	72 ± 1.2	1,7
CF01085	73.8 ± 0.5	0,7			73.3 ± 0.8	1,1	72.1 ± 1	1,4
Crousty	78.8 ± 3.5	4,5	83.1 ± 4.9	6	80.9 ± 0.1	0,1	80.6 ± 0.9	1,1
Dinosor	81.6 ± 0.7	0,8	82.6 ± 1.4	1,7	81.5 ± 0.5	0,6	82.8 ± 0.5	0,6
Ephoros	83.7 ± 1.5	1,8			82.9 ± 0.8	1	84.1 ± 0.9	1,1
Farandole	87.2 ± 0.4	0,4			87.5 ± 1.4	1,6	88.8 ± 1.3	1,5
Garcia	80.9 ± 0.3	0,4	82.6 ± 1.2	1,4	81.1 ± 2.8	3,5	82.3 ± 1	1,2
Glasgow	83.6 ± 3.6	4,3			90.8 ± 0.4	0,4	82.8 ± 1.6	2
Koreli	69.5 ± 1.2	1,7			70 ± 0.1	0,1	80.4 ± 13.6	17
Maxyl	75 ± 0.5	0,6	76.3 ± 0.1	0,1	75.7 ± 0.7	1	76.1 ± 1	1,3
Mendel	78.3 ± 0	0	78.5 ± 0.1	0,1	77.7 ± 1.7	2,2	75.9 ± 1.7	2,3
Paledor	82.8 ± 5.7	6,9	86.3 ± 2.8	3,2	84.2 ± 6.7	8	80.3 ± 0.4	0,5
Perfector	75.3 ± 0.3	0,4	73.7 ± 1.1	1,5	75.2 ± 0.5	0,7	75 ± 1.5	1,9
Premio	71.2 ± 3.6	5,1	73.1 ± 1.5	2	73.6 ± 4.1	5,6	72.4 ± 1.1	1,5
Robigus	78.1 ± 2.6	3,4	75.9 ± 0.2	0,2	79.2 ± 1.8	2,3	82.6 ± 5.7	7
Rosario	72.3 ± 3.5	4,8	73.2 ± 1.9	2,5	70 ± 0.9	1,3	72.8 ± 0.9	1,2
Rytmic	74.7 ± 0.7	0,9			73.9 ± 1.8	2,4	75.4 ± 2.1	2,8
Sankara	78.8 ± 0.8	1,1	79.2 ± 1.1	1,4	77.5 ± 1.4	1,7	80.1 ± 2.2	2,7
Sogood	72.9 ± 0.2	0,2	72.1 ± 1.6	2,2	70.3 ± 0.2	0,2	72.3 ± 0.2	0,3
Soissons	67.7 ± 0.5	0,7	70.9 ± 0.5	0,7	67.9 ± 2.1	3,1	67.2 ± 2.9	4,4
Tapidor	76.9 ± 0.5	0,6	78.6 ± 2.3	2,9	78.4 ± 1	1,3	77.7 ± 0.9	1,2
Timber	78.9 ± 1.1	1,3	75.9 ± 2.2	2,9	76.7 ± 1.1	1,4	78.8 ± 1.1	1,4
Tremie	77.4 ± 0.4	0,5	76.9 ± 0.7	0,9	75.1 ± 0	0	78.5 ± 0.8	1
Voltige	81.8 ± 3.6	4,5			85.6 ± 0	0	81.5 ± 0.5	0,7

	ANNEE 2							
	CAU		CFD		MOM	UNI		
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		Moy ±ET	CV (%)	
1010-13-2-1	89.7 ± 1.8	2	88.4 ± 0.8	0,9	86,9	87,6		
1010-13-2-4	84.5 ± 1.1	1,3	81.3 ± 0.7	0,8	84,61	84,11		
Ambrosia	87.1 ± 1.6	1,8	88.5 ± 1.2	1,4	90,75	88,03		
Andalou	81.3 ± 0.7	0,8	79.7 ± 1.3	1,7	79,29	82,76		
Arack	83.7 ± 0.2	0,2	83.7 ± 0.9	1,1	83,1	82,06		
Astuce	87.5 ± 0	0	90.9 ± 4.3	4,7	89,63	85,12		
Bagou	88.1 ± 1.7	1,9	85.1 ± 2	2,4	87,5	84,45		
Calisto	84.9 ± 1.6	1,9	84.2 ± 0.6	0,7	88,83	81,17		
Caphorn	82.5 ± 0.4	0,4	80.6 ± 1.4	1,7	83,64	80,99		
CF01085	82.2 ± 0.6	0,8	83.2 ± 0.4	0,4	84,2	78,83		
Crousty	84.8 ± 2.4	2,8	88.7 ± 1.3	1,4	84,45	86,81		
Dinosor	87.7 ± 1.4	1,6	86.8 ± 1.2	1,4	86,73	87,36		
Farandole	89.9 ± 1.2	1,3	89.9 ± 2.1	2,3	92,77	87,53		
Garcia	88.6 ± 0.7	0,8	88.5 ± 1.7	1,9	86,75	85,15		
Glasgow	84.3 ± 0.9	1,1	87.7 ± 0.9	1	87,76	86,47		
Koreli	83.4 ± 0	0	81.2 ± 2.2	2,7	81,39	81,77		
Maxyl	86.2 ± 0.4	0,4	83.5 ± 3.6	4,3		85,28		
Mendel	84.2 ± 0.1	0,1	85.7 ± 0.3	0,3	83,8	84,52		
Paledor	88.7 ± 1.3	1,5	90 ± 3.6	4	91,37	86,72		
Perfector	82.6 ± 0.5	0,5	83.1 ± 0.5	0,5	84,65	82,63		
Premio	82.2 ± 3.1	3,8	82.9 ± 0.7	0,8	82,83	82,37		
Quebon	85 ± 1.7	2	84.6 ± 0.1	0,1	86,43	83,49		
Robigus	84.7 ± 0.5	0,6	81.6 ± 3.8	4,7	85,09	83,15		
Rosario	81 ± 1.3	1,6	84.3 ± 0.9	1,1	83,73	81,96		
Rytmic	83.2 ± 0.5	0,6	83.9 ± 2.3	2,7	83,79	82,11		
Sankara	86 ± 0	0	86.3 ± 0.9	1,1	84,07	86,03		
Sogood	84.4 ± 0.1	0,1	83.1 ± 0.7	0,9	84,26	81,15		
Soissons	81.5 ± 2.2	2,7	82.6 ± 1.5	1,8	80,12	79,42		
Tapidor	83.2 ± 4.4	5,3	86.4 ± 0.8	0,9	81,75	85,15		
Timber	84.9 ± 0.1	0,2	87.5 ± 1.2	1,3	86,75	81,65		
Tremie	88.3 ± 0.2	0,2	80.3 ± 3.4	4,2	85,35	87		
Voltige			87.9 ± 3.4	3,9		87,98		

	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	89.9 ± 1.4	1,6	88.8 ± 0.2	0,2	87.8 ± 1.8	2,1
1010-13-2-4	84.3 ± 3.9	4,7	86.1 ± 0.4	0,4	84.2 ± 1.9	2,2
Andalou	84.9 ± 2.4	2,8	86.1 ± 2.6	3,1	81.4 ± 0.5	0,6
Astuce	92.3 ± 0.7	0,8	91.4 ± 2.3	2,6	91.8 ± 0.4	0,5
Bagou	89.6 ± 1.6	1,8	90 ± 2.7	3	84.7 ± 0.7	0,8
Caphorn	85.5 ± 0.8	0,9	84.1 ± 0.6	0,7	80.4 ± 0.9	1,2
Crousty	88.2 ± 3.1	3,5	88.2 ± 0.7	0,8	86.8 ± 0.6	0,7
Dinosor	87.2 ± 0.7	0,8	87.4 ± 1.4	1,7	86.9 ± 0.9	1,1
Farandole	89.9 ± 1.7	1,9	89.4 ± 2.1	2,3	88.8 ± 2.1	2,4
Glasgow	89.5 ± 0.1	0,1	88.7 ± 1.7	1,9	87.7 ± 3.9	4,4
Koreli	82.1 ± 1.3	1,6	85.2 ± 0.9	1,1	78.6 ± 6.7	8,6
Mendel	87.3 ± 2.1	2,4	87.4 ± 0.7	0,8	84.5 ± 0.3	0,3
Paledor	90 ± 0.5	0,6	89.2 ± 1.6	1,8	87.3 ± 2.2	2,5
Premio	86.1 ± 0.6	0,7	85 ± 0.8	0,9	83.7 ± 0.1	0,1
Quebon	84.6 ± 1.6	1,9	86.5 ± 0.1	0,1	84.2 ± 1.4	1,7
Robigus	87.2 ± 3.9	4,5	85.3 ± 0.4	0,5	85.5 ± 0.1	0,1
Rytmic	84.3 ± 1.9	2,2	84.3 ± 0.8	1	83.8 ± 1.4	1,6
Sankara	86.1 ± 0.9	1	87.3 ± 0.1	0,1	86.9 ± 1	1,2
Sogood	84 ± 0.7	0,9	84.7 ± 0.4	0,4	82.4 ± 2.4	3
Soissons	82.9 ± 0.4	0,5	82.1 ± 1	1,3	80.6 ± 1.3	1,6
Tapidor	89.6 ± 1.7	1,9	85.1 ± 3.3	3,8	85.9 ± 0.8	0,9
Tremie	85.6 ± 2.1	2,5	85.9 ± 1.1	1,3	84.5 ± 1.5	1,7

# ANNEXES - Proportion de granules de type B pour les variétés françaises en %



Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Astuce	20	9.54016	0.558228	X
Ephoros	6	10.4813	1.02865	XXXX
Farandole	18	10.5656	0.58985	XX
Ambrosia	14	10.7741	0.676428	XXX
Voltige	9	11.9962	0.842735	XXXX
Paledor	20	12.3268	0.558228	XXX
Glasgow	19	12.4464	0.577259	XXX
Garcia	14	12.7427	0.676428	XXX
1010-13-2-1	12	13.277	0.730846	XX
Dinosor	20	13.6755	0.558228	XX
Bagou	20	14.0298	0.558228	XX
Crousty	20	14.3571	0.558228	XX
Sankara	20	15.3124	0.558228	XX
Tapidor	20	15.9544	0.558228	XX
Mendel	20	16.2046	0.558228	XX
Timber	14	16.3303	0.676428	XX
Calisto	14	16.4188	0.676428	XX
Robigus	20	16.4798	0.558228	XX
Tremie	20	16.7061	0.558228	XX
Quebon	12	16.7697	0.730846	XXX
Maxyl	13	17.4893	0.698055	XXX
1010-13-2-4	12	17.5429	0.730846	XXXX
Rytmic	18	18.5392	0.58985	XXXX
Perfactor	14	18.8402	0.676428	XXXX
Arack	14	19.4844	0.676428	XXXX
Premio	20	19.5313	0.558228	XXX
Sogood	20	19.8657	0.558228	XXX
CF01085	12	19.9837	0.733784	XXX
Koreli	18	20.1805	0.58985	XX
Andalou	20	20.4985	0.558228	XX
Rosario	14	20.5351	0.676428	XX
Caphorn	20	20.699	0.558228	X
Soissons	20	22.3626	0.558228	X

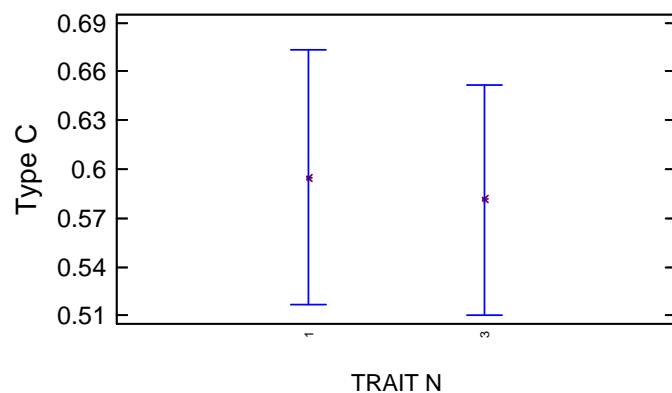
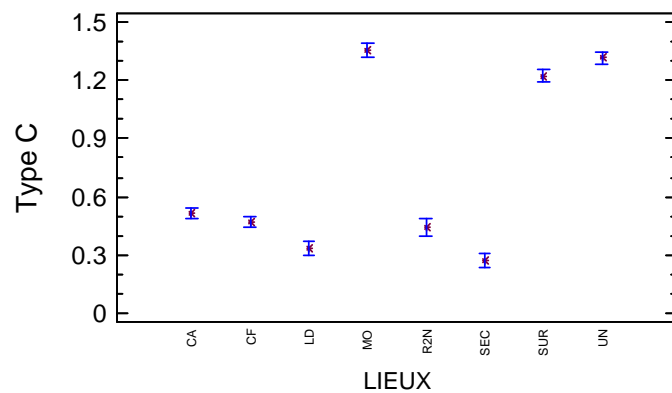
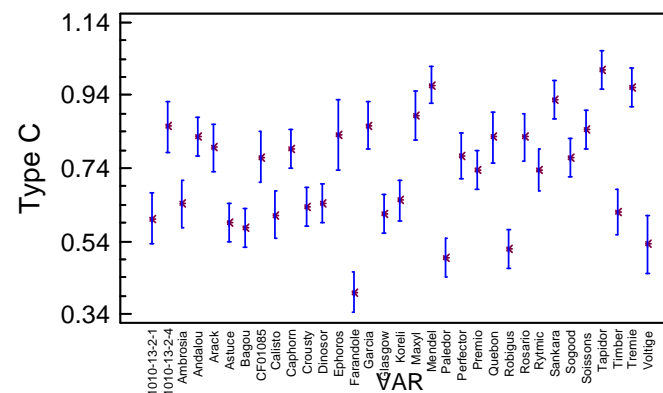
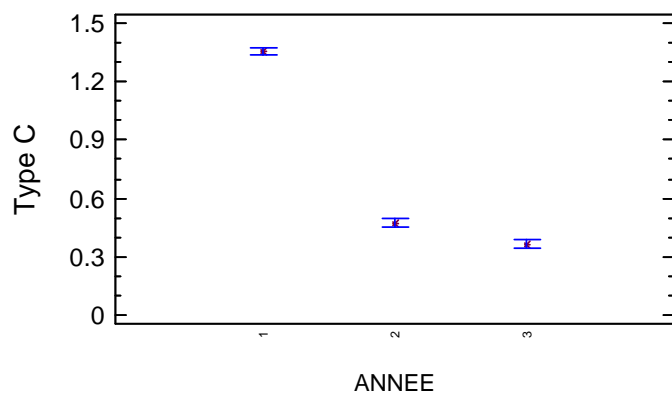
## ANNEXES - Proportion de granules de type B pour les variétés françaises en %

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	14.1 ± 3.1	21,6	12.8 ± 2.7	21,2	12.5 ± 5.5	44,3	13.7 ± 2.8	20,3
Andalou	25.9 ± 0.2	0,6	26.6 ± 0.1	0,2	28.1 ± 0.1	0,5	26.2 ± 0.5	2
Arack	27.9 ± 4	14,2	24.5 ± 1	3,9	24.2 ± 0.9	3,7	23.3 ± 0.9	3,9
Astuce	7.4 ± 2.5	34,2	11 ± 0.6	5,7	13.5 ± 0.5	3,6	11.2 ± 1	8,9
Bagou	16.9 ± 0.9	5,3	16.7 ± 1.3	7,9	18.9 ± 2.3	12,3	18.3 ± 0.3	1,8
Calisto	21 ± 1.9	9,1	21.3 ± 2	9,4	20.1 ± 2.2	11,2	20.8 ± 0.2	1,1
Caphorn	27.7 ± 0.9	3,2	27.3 ± 1.3	4,6	28 ± 0.3	1,1	26.5 ± 1.3	4,9
CF01085	25.1 ± 0.5	1,8			25.4 ± 0.7	2,9	26.1 ± 1.1	4,1
Crousty	20.1 ± 3.4	16,7	15.8 ± 4.8	30,3	18 ± 0.1	0,4	18 ± 0.9	4,9
Dinosor	17.3 ± 0.4	2,2	16 ± 1.3	8,4	17.3 ± 0.4	2,1	15.7 ± 0.3	1,9
Ephoros	15 ± 1.2	8,1			15.8 ± 0.8	5,2	14.3 ± 0.9	6,6
Farandole	12 ± 0.1	0,9			11.7 ± 1.3	11,2	10.4 ± 1.3	12,6
Garcia	17.7 ± 0.2	1,3	15.9 ± 1.1	7,2	17.3 ± 2.7	15,7	16 ± 0.7	4,5
Glasgow	15.4 ± 3.6	23,5			8.2 ± 0.6	7,4	15.9 ± 1.8	11,5
Koreli	29.2 ± 1.3	4,6			28.8 ± 0.1	0,5	18.3 ± 13.4	73,2
Maxyl	23.6 ± 0.4	1,6	22.2 ± 0.1	0,5	23 ± 0.8	3,6	22.2 ± 0.9	4,1
Mendel	19.9 ± 0.1	0,6	19.8 ± 0.1	0,3	20.6 ± 1.6	7,8	22.3 ± 1.4	6,1
Paledor	16.2 ± 5.3	32,4	13 ± 2.7	20,6	14.9 ± 6.5	43,9	18.3 ± 0.2	1,1
Perfector	23.5 ± 0.2	0,8	25 ± 1.2	4,6	23.6 ± 0.6	2,4	23 ± 1.5	6,4
Premio	27.7 ± 3.6	12,8	25.6 ± 1.3	4,9	25 ± 4.5	18,1	26.1 ± 0.8	3,1
Robigus	21.1 ± 2.8	13	22.9 ± 0.2	0,7	19.9 ± 1.9	9,6	16.4 ± 5.7	34,9
Rosario	26.2 ± 3.3	12,7	25.5 ± 1.6	6,4	28.5 ± 0.8	3	25.6 ± 0.6	2,2
Rytmic	24.1 ± 0.5	2			24.9 ± 1.7	6,9	23.2 ± 2.3	9,8
Sankara	19.7 ± 0.8	4,1	19 ± 1	5,1	20.9 ± 1.4	6,6	18 ± 1.8	10,2
Sogood	25.7 ± 0	0,2	26.4 ± 1.8	6,8	28.1 ± 0.5	1,6	26.1 ± 0.3	1,2
Soissons	30.9 ± 0.5	1,6	27.8 ± 0.3	1	30.5 ± 1.9	6,3	31 ± 2.9	9,4
Tapidor	21.2 ± 0.2	0,8	19.7 ± 2	10	19.8 ± 0.9	4,7	20.5 ± 1.1	5,3
Timber	20 ± 1	4,9	22.5 ± 2	8,9	22.2 ± 1.2	5,3	20 ± 0.6	3,1
Tremie	21.2 ± 0.4	1,9	21.4 ± 0.8	3,5	23.2 ± 0.2	0,9	19.6 ± 0.6	3
Voltige	17.2 ± 3.3	19			13.4 ± 0.1	0,8	17.1 ± 0.6	3,5

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	10.1 ± 1.7	17,2	11.3 ± 0.7	6,6	12,77	12,07
1010-13-2-4	14.9 ± 1.1	7,4	17.8 ± 0.5	3	14,84	15,35
Ambrosia	12.4 ± 1.3	10,8	11.2 ± 1.1	10,2	9,06	11,62
Andalou	18 ± 0.6	3,5	19.7 ± 1.2	6,1	20,16	16,71
Arack	15.7 ± 0.1	0,7	15.8 ± 0.8	5	16,37	17,51
Astuce	12 ± 0	0,3	8.8 ± 4.1	46,2	9,98	14,3
Bagou	11.6 ± 1.5	13	14.3 ± 1.9	13,4	12,25	15,12
Calisto	14.6 ± 1.5	10,2	15.4 ± 0.6	3,6	10,98	18,22
Caphorn	16.9 ± 0.4	2,1	18.8 ± 1.3	6,9	15,96	18,47
CF01085	17.3 ± 0.7	4,1	16.2 ± 0.5	3	15,39	20,59
Crousty	14.7 ± 2.1	14,5	11 ± 1.2	11	15,12	12,81
Dinosor	11.9 ± 1.2	10,4	12.7 ± 1.1	8,6	12,99	12,4
Farandole	9.9 ± 1.2	11,8	9.9 ± 2	20,6	7,14	12,19
Garcia	10.9 ± 0.6	5,2	11.1 ± 1.5	13,5	12,69	14,19
Glasgow	15 ± 0.7	4,7	11.9 ± 0.9	7,9	11,81	13,18
Koreli	16.2 ± 0	0,1	18.3 ± 2.2	11,9	18,15	17,92
Maxyl	13.3 ± 0.2	1,7	15.7 ± 3.3	20,9		14,23
Mendel	15 ± 0.1	0,6	13.7 ± 0.2	1,3	15,44	14,76
Paledor	11 ± 1.3	11,7	9.7 ± 3.5	35,7	8,5	12,99
Perfector	16.8 ± 0.2	1,3	16.5 ± 0.4	2,6	14,98	16,88
Premio	17.2 ± 2.9	16,7	16.6 ± 0.6	3,9	16,59	17,24
Quebon	14.4 ± 1.4	9,9	14.7 ± 0.1	0,9	13,17	15,95
Robigus	14.9 ± 0.5	3,3	17.8 ± 3.6	20,4	14,69	16,62
Rosario	18.2 ± 1.2	6,7	15.4 ± 0.9	6	15,87	17,51
Rytmic	16.3 ± 0.5	3,3	15.6 ± 2.1	13,3	15,71	17,31
Sankara	13.4 ± 0.1	0,9	13.2 ± 0.7	5,6	15,14	13,34
Sogood	15.2 ± 0	0,2	16.5 ± 0.7	4,2	15,38	18,42
Soissons	17.9 ± 2	11,1	16.9 ± 1.3	7,8	19,4	20,08
Tapidor	15.8 ± 4	25,1	13.1 ± 0.7	5,3	17,12	14,23
Timber	14.6 ± 0.1	0,4	12.2 ± 1.2	9,6	12,83	17,85
Tremie	11.2 ± 0.2	1,8	19 ± 3.5	18,6	14,04	12,48
Voltige			11.8 ± 3.2	27,1		11,81

	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	9.9 ± 1.4	14	11 ± 0.1	1	11.8 ± 1.8	15
1010-13-2-4	15.2 ± 3.7	24,2	13.6 ± 0.3	2,4	15.2 ± 1.7	11,4
Andalou	14.7 ± 2.4	16,1	13.6 ± 2.8	20,5	18.1 ± 0.4	2,1
Astuce	7.5 ± 0.7	9	8.5 ± 2.3	27,3	8 ± 0.4	4,9
Bagou	10.3 ± 1.6	15,2	9.8 ± 2.7	27,2	14.7 ± 0.6	4,3
Caphorn	14.2 ± 0.8	5,6	15.6 ± 0.7	4,3	18.9 ± 0.7	3,9
Crousty	11.6 ± 2.8	24,5	11.5 ± 0.6	5,3	12.7 ± 0.6	4,6
Dinosor	12.6 ± 0.6	4,9	12.4 ± 1.5	11,8	12.8 ± 0.9	6,9
Farandole	9.9 ± 1.7	17	10.5 ± 2	18,8	10.9 ± 2	18,1
Glasgow	10.3 ± 0.2	1,8	11 ± 1.6	14,1	11.9 ± 3.6	30,5
Koreli	17.5 ± 1.3	7,6	14.7 ± 0.9	6,3	20.9 ± 6.5	31,3
Mendel	12.4 ± 2	16,1	12.2 ± 0.7	6,1	14.9 ± 0.2	1,1
Paledor	9.8 ± 0.5	5,5	10.6 ± 1.6	15,1	12.2 ± 1.9	15,7
Premio	13.6 ± 0.6	4,8	14.7 ± 0.7	4,9	15.8 ± 0	0
Quebon	14.9 ± 1.4	9,6	13.2 ± 0.1	0,9	15.3 ± 1.3	8,6
Robigus	12.5 ± 3.7	29,7	14.5 ± 0.4	2,8	14.2 ± 0.1	1
Rytmic	15.2 ± 1.7	11,3	15.4 ± 0.8	5,1	15.8 ± 1.3	8,3
Sankara	13.4 ± 0.8	5,7	12.4 ± 0.2	1,2	12.6 ± 0.9	7,3
Sogood	15.6 ± 0.8	5	15.1 ± 0.3	1,8	17.1 ± 2.2	12,8
Soissons	16.7 ± 0.4	2,2	17.5 ± 1	5,9	18.7 ± 1.2	6,2
Tapidor	10.1 ± 1.7	16,7	14.5 ± 3.2	22,1	13.6 ± 0.6	4,5
Tremie	13.9 ± 2	14,1	13.6 ± 1	7,6	14.8 ± 1.2	8

## ANNEXES – Proportion de granules de type C pour les variétés françaises en %



VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Farandole	18	0.400597	0.040002	X
Paledor	20	0.494299	0.0378575	XX
Robigus	20	0.517443	0.0378575	XX
Voltige	9	0.532191	0.0571519	XXXX
Bagou	20	0.577872	0.0378575	XXX
Astuce	20	0.593059	0.0378575	XXX
1010-13-2-1	12	0.602246	0.0495639	XXX
Calisto	14	0.61204	0.0458735	XX
Glasgow	19	0.614627	0.0391481	XX
Timber	14	0.620843	0.0458735	XXX
Crousty	20	0.634026	0.0378575	XX
Ambrosia	14	0.641968	0.0458735	XXX
Dinosor	20	0.643314	0.0378575	XX
Koreli	18	0.653085	0.040002	XXX
Premio	20	0.734417	0.0378575	XXX
Rytmic	18	0.73516	0.040002	XXX
CF01085	12	0.76971	0.0497632	XXX
Sogood	20	0.769776	0.0378575	XX
Perfector	14	0.773801	0.0458735	XX
Caphorn	20	0.794905	0.0378575	XX
Arack	14	0.796228	0.0458735	XX
Rosario	14	0.824561	0.0458735	XXX
Quebon	12	0.824818	0.0495639	XXX
Andalou	20	0.827165	0.0378575	XXX
Ephoros	6	0.830478	0.0697601	XXXX
Soissons	20	0.843907	0.0378575	XX
1010-13-2-4	12	0.853104	0.0495639	XXXX
Garcia	14	0.856957	0.0458735	XXX
Maxyl	13	0.883403	0.0473402	XXX
Sankara	20	0.92844	0.0378575	XXX
Tremie	20	0.961978	0.0378575	XX
Mendel	20	0.967996	0.0378575	XX
Tapidor	20	1.00684	0.0378575	X



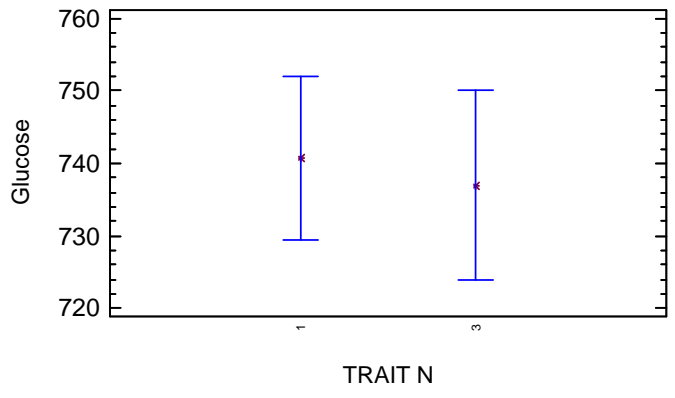
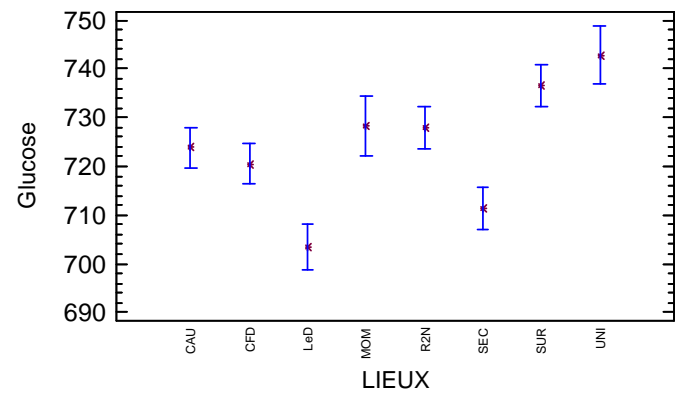
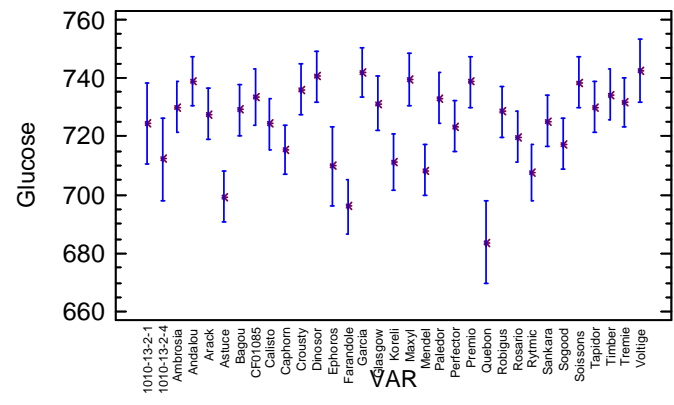
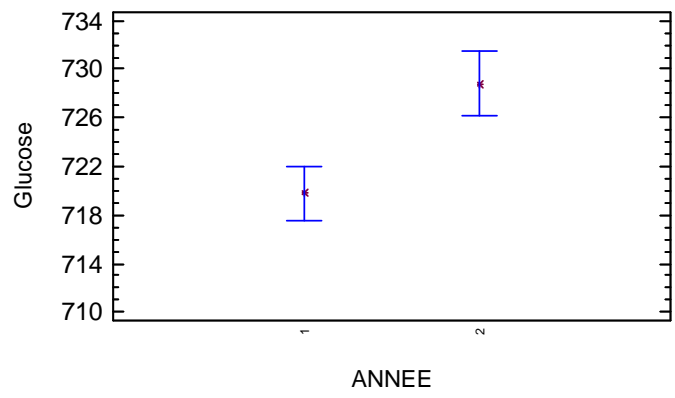
## ANNEXES – Proportion de granules de type C pour les variétés françaises en %

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	1.2 ± 0	0,9	1.1 ± 0.1	5,9	1.3 ± 0.2	12,4	1.3 ± 0.1	6,9
Andalou	1.3 ± 0.1	5,9	1.3 ± 0.1	5,9	1.4 ± 0.1	6,1	1.7 ± 0.2	11,2
Arack	1.2 ± 0	0,4	1.5 ± 0.2	13,6	1.6 ± 0.3	18,1	1.5 ± 0	2,9
Astuce	1 ± 0.1	13,3	1.2 ± 0	2,8	1.3 ± 0	0,6	1.3 ± 0.2	12,6
Bagou	1 ± 0	0,5	1 ± 0.1	6,7	1.1 ± 0.2	16,6	1.3 ± 0	2,7
Calisto	1 ± 0.3	24,9	1.3 ± 0.2	17	1.2 ± 0.2	16,1	1.4 ± 0	3,2
Caphorn	1.3 ± 0.1	5,2	1.4 ± 0	2	1.4 ± 0.1	6,1	1.5 ± 0.1	3,4
CF01085	1.1 ± 0.1	7,7			1.3 ± 0.1	7,1	1.8 ± 0	2,6
Crousty	1.1 ± 0.2	16,1	1.1 ± 0.2	13,9	1.1 ± 0	2,9	1.4 ± 0	1,3
Dinosor	1.2 ± 0.3	26	1.4 ± 0	0,8	1.2 ± 0.2	12,4	1.5 ± 0.2	12
Ephoros	1.4 ± 0.3	21,7			1.3 ± 0	2,2	1.7 ± 0	0,6
Farandole	0.8 ± 0.2	31,9			0.8 ± 0.1	8,7	0.8 ± 0	1
Garcia	1.4 ± 0.1	5	1.5 ± 0	1,7	1.6 ± 0.1	8	1.7 ± 0.3	15,9
Glasgow	1 ± 0	2,3			1 ± 0.2	22	1.3 ± 0.2	15,9
Koreli	1.2 ± 0.1	11			1.2 ± 0.2	19,3	1.3 ± 0.3	20
Maxyl	1.4 ± 0.1	5,9	1.5 ± 0.2	11,5	1.3 ± 0.1	7,5	1.8 ± 0.1	6,3
Mendel	1.7 ± 0.1	5,5	1.7 ± 0.2	9,5	1.6 ± 0.1	6,6	1.8 ± 0.4	19,2
Paledor	1 ± 0.5	50,7	0.7 ± 0.1	13,2	0.9 ± 0.2	19,8	1.4 ± 0.2	12
Perfector	1.1 ± 0.1	12,5	1.3 ± 0.1	5,1	1.2 ± 0	2,3	1.9 ± 0	1,3
Premio	1.1 ± 0.1	5,7	1.3 ± 0.2	17,8	1.4 ± 0.4	29,7	1.4 ± 0.3	18,3
Robigus	0.8 ± 0.1	17,3	1.2 ± 0	0,8	0.9 ± 0.1	13,3	1 ± 0	1
Rosario	1.5 ± 0.1	9	1.3 ± 0.2	17,7	1.5 ± 0.1	4,7	1.6 ± 0.3	19,8
Rytmic	1.2 ± 0.2	15,9			1.3 ± 0.1	6,1	1.4 ± 0.2	10,6
Sankara	1.5 ± 0	1,9	1.8 ± 0.1	6	1.6 ± 0	1,3	1.9 ± 0.4	18,4
Sogood	1.3 ± 0.1	9	1.5 ± 0.2	14,7	1.6 ± 0.3	19,7	1.6 ± 0.1	4,9
Soissons	1.4 ± 0	0,9	1.4 ± 0.2	14,7	1.6 ± 0.2	14	1.7 ± 0	2,4
Tapidor	1.9 ± 0.3	17,5	1.7 ± 0.3	18,3	1.8 ± 0.1	5,2	1.8 ± 0.2	8,8
Timber	1 ± 0.1	7,2	1.6 ± 0.2	13	1.1 ± 0.1	9,1	1.2 ± 0.4	39
Tremie	1.4 ± 0	1	1.6 ± 0	2	1.7 ± 0.2	10,3	1.9 ± 0.2	9,6
Voltige	1 ± 0.4	37,6			1 ± 0.1	7,9	1.4 ± 0	3,4

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	0.2 ± 0.1	42,3	0.3 ± 0.1	24,5	0,33	0,33
1010-13-2-4	0.6 ± 0	3,8	0.9 ± 0.1	14,9	0,55	0,54
Ambrosia	0.5 ± 0.2	46,4	0.3 ± 0.1	22,5	0,19	0,28
Andalou	0.7 ± 0	7,1	0.7 ± 0.1	19,8	0,55	0,65
Arack	0.5 ± 0.1	13,5	0.5 ± 0.1	16,4	0,53	0,35
Astuce	0.5 ± 0.1	10,1	0.3 ± 0.3	89,5	0,38	0,31
Bagou	0.3 ± 0.1	54,8	0.5 ± 0.1	22	0,25	0,49
Calisto	0.4 ± 0.1	25,9	0.4 ± 0	2,8	0,19	0,72
Caphorn	0.5 ± 0	1	0.6 ± 0.1	17,6	0,4	0,28
CF01085	0.5 ± 0.1	13,1	0.5 ± 0.1	23,3	0,4	0,49
Crousty	0.5 ± 0.3	48,4	0.3 ± 0.1	27,6	0,43	0,4
Dinosor	0.3 ± 0.1	41,5	0.4 ± 0.1	30	0,28	0,57
Farandole	0.2 ± 0	15,3	0.2 ± 0	17,8	0,09	0,24
Garcia	0.5 ± 0.1	22,6	0.4 ± 0.2	43,8	0,57	0,53
Glasgow	0.7 ± 0.2	34,9	0.4 ± 0	7,3	0,43	0,58
Koreli	0.4 ± 0	0,4	0.4 ± 0.1	13,5	0,46	0,63
Maxyl	0.5 ± 0.2	28,8	0.8 ± 0.3	40,1		0,43
Mendel	0.7 ± 0	1,7	0.6 ± 0.1	12,4	0,75	0,5
Paledor	0.3 ± 0	10	0.2 ± 0.2	65,8	0,13	0,61
Perfector	0.6 ± 0.2	36	0.4 ± 0	7,2	0,38	0,5
Premio	0.6 ± 0.2	37	0.5 ± 0	2,7	0,59	0,51
Quebon	0.6 ± 0.2	40,3	0.7 ± 0	1,1	0,41	0,21
Robigus	0.4 ± 0	6,3	0.6 ± 0.2	27,7	0,22	0,35
Rosario	0.7 ± 0.1	7,3	0.4 ± 0	3,5	0,4	0,53
Rytmic	0.5 ± 0	2,8	0.4 ± 0.2	39,8	0,5	0,43
Sankara	0.6 ± 0.1	13,2	0.5 ± 0.2	33	0,8	0,58
Sogood	0.4 ± 0.1	26,1	0.4 ± 0	9	0,36	0,43
Soissons	0.6 ± 0.2	39	0.5 ± 0.1	26,5	0,48	0,61
Tapidor	1 ± 0.4	47	0.5 ± 0.1	24,7	1,14	0,54
Timber	0.5 ± 0.1	15,1	0.3 ± 0	6,7	0,42	0,58
Tremie	0.5 ± 0	1,9	0.7 ± 0.1	19	0,62	0,38
Voltige			0.3 ± 0.2	59,1		0,24

	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	0.2 ± 0	17,5	0.2 ± 0	19	0.5 ± 0	9,2
1010-13-2-4	0.5 ± 0.2	50,5	0.3 ± 0	12	0.5 ± 0.2	30,5
Andalou	0.4 ± 0	7,6	0.4 ± 0.2	42,6	0.5 ± 0.1	25,8
Astuce	0.1 ± 0	15,3	0.2 ± 0	14,8	0.2 ± 0	18
Bagou	0.2 ± 0	9,6	0.1 ± 0	29,6	0.5 ± 0	6,3
Caphorn	0.3 ± 0	2,4	0.3 ± 0.1	32	0.7 ± 0.2	29,5
Crousty	0.3 ± 0.2	81,9	0.3 ± 0.1	27,4	0.5 ± 0	0,6
Dinosor	0.2 ± 0.1	26	0.2 ± 0	6,8	0.4 ± 0.1	17,6
Farandole	0.2 ± 0	21,7	0.1 ± 0.1	63,9	0.3 ± 0.2	49
Glasgow	0.3 ± 0.1	27,9	0.2 ± 0.1	47,3	0.4 ± 0.2	66,2
Koreli	0.4 ± 0	2,8	0.2 ± 0	11,9	0.5 ± 0.2	42,2
Mendel	0.4 ± 0.1	35	0.3 ± 0	4,6	0.6 ± 0.1	17,3
Paledor	0.2 ± 0	0,1	0.2 ± 0	11,5	0.4 ± 0.3	63,2
Premio	0.4 ± 0	3,1	0.3 ± 0.1	19,7	0.5 ± 0.1	21,8
Quebon	0.5 ± 0.1	28,2	0.3 ± 0	8,1	0.5 ± 0.1	14,9
Robigus	0.3 ± 0.2	59,7	0.2 ± 0	12,6	0.3 ± 0.1	31,2
Rytmic	0.5 ± 0.2	31,6	0.3 ± 0	6,1	0.4 ± 0.1	13,3
Sankara	0.5 ± 0.1	25,7	0.3 ± 0.1	18,8	0.5 ± 0.1	21,7
Sogood	0.4 ± 0.1	14	0.3 ± 0.1	45,6	0.5 ± 0.2	50
Soissons	0.4 ± 0	8,2	0.4 ± 0	1,6	0.7 ± 0.1	18,3
Tapidor	0.3 ± 0	10,4	0.3 ± 0.1	19	0.6 ± 0.2	28,1
Tremie	0.5 ± 0.2	36,7	0.5 ± 0.1	12,7	0.8 ± 0.3	36,5

## ANNEXES – Rendement en glucose pour les variétés françaises en kg/t



Method: 95.0 percent LSD

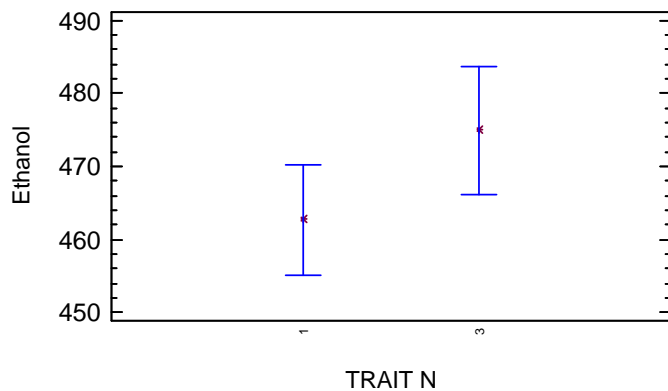
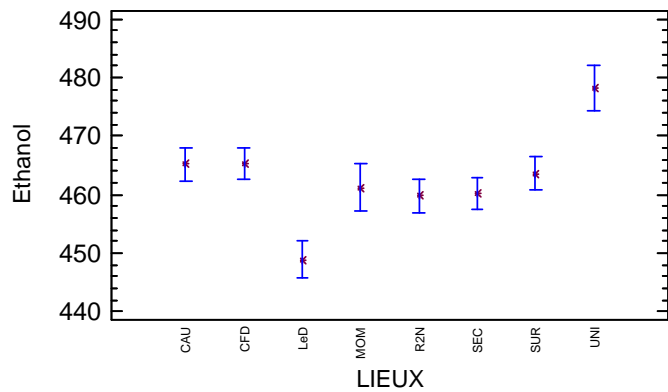
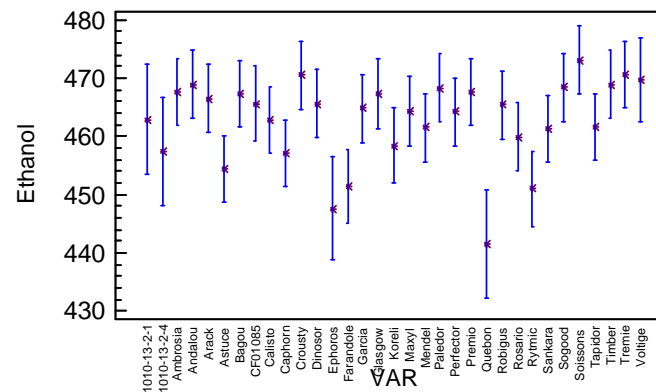
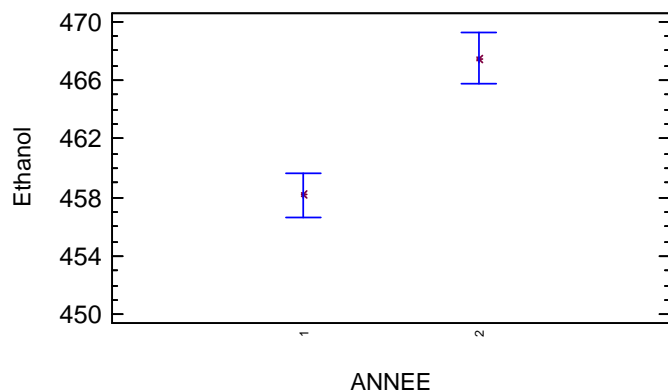
VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Quebon	6	683.844	10.0282	X
Farandole	12	695.967	6.75051	XX
Astuce	14	699.493	6.21407	XXX
Ryrmic	11	707.628	6.97769	XXXX
Mendel	14	708.447	6.21407	XXX
Ephoros	6	709.709	9.49799	XXXXXX
Koreli	11	711.118	6.97769	XXXX
1010-13-2-4	6	712.207	10.0282	XXXXXXXX
Caphorn	14	715.385	6.21407	XXXX X
Sogood	14	717.425	6.21407	XXXXX
Rosario	14	719.85	6.21407	XXXXXX
Perfector	14	723.325	6.21407	XXXXXXXX
Calisto	14	724.227	6.21407	XXXXXXXX
1010-13-2-1	6	724.369	10.0282	XXXXXXXXXX
Sankara	14	725.104	6.21407	XXXXXXXXXX
Arack	14	727.572	6.21407	XXXXXXXXXX
Robigus	14	728.337	6.21407	XXXXXXXXXX
Bagou	14	729.135	6.21407	XXXXXXXXXX
Tapidor	14	729.987	6.21407	XXXXXX
Ambrosia	14	730.002	6.21407	XXXXXX
Glasgow	13	731.263	6.5643	XXXXXX
Tremie	14	731.61	6.21407	XXXXXX
Paledor	14	732.952	6.21407	X XXX
CF01085	11	733.449	6.97772	XXXXX
Timber	14	734.127	6.21407	X XXX
Crousty	14	735.904	6.21407	XXX
Soissons	14	738.429	6.21407	XX
Premio	14	738.568	6.21407	XX
Andalou	14	738.758	6.21407	XX
Maxyl	13	739.185	6.41968	XX
Dinosor	14	740.522	6.21407	XX
Garcia	14	741.772	6.21407	X
Voltige	9	742.141	7.76581	XX

## ANNEXES – Rendement en glucose pour les variétés françaises en kg/t

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	748 ± 14.2	1,9	687.2 ± 34.8	5,1	729.1 ± 11.7	1,6	748.9 ± 9.8	1,3
Andalou	728.2 ± 0.2	0	737.1 ± 9.3	1,3	722.6 ± 13.5	1,9	718.1 ± 29.6	4,1
Arack	744 ± 4.7	0,6	715.1 ± 37.3	5,2	725.1 ± 46.3	6,4	735.9 ± 27.2	3,7
Astuce	688.6 ± 10.7	1,6	682.8 ± 10.2	1,5	693.7 ± 13	1,9	722 ± 35.4	4,9
Bagou	734.2 ± 19.8	2,7	709.4 ± 62.8	8,9	703.5 ± 17.7	2,5	743.6 ± 52.5	7,1
Calisto	746.8 ± 18.6	2,5	675.2 ± 58.6	8,7	710.1 ± 25.8	3,6	742.6 ± 40.4	5,4
Caphorn	715.4 ± 27	3,8	701.5 ± 31.8	4,5	727.6 ± 42.3	5,8	706.5 ± 0.1	0
CF01085	718,8	NA			711.1 ± 31.2	4,4	746.5 ± 31.2	4,2
Crousty	738.2 ± 16.8	2,3	700.9 ± 91.2	13	722.8 ± 15.4	2,1	766.2 ± 25.2	3,3
Dinosor	766.3 ± 22.9	3	753 ± 20	2,7	712.3 ± 9.8	1,4	754.8 ± 6.7	0,9
Ephoros	701.6 ± 25.8	3,7			704.4 ± 20.2	2,9	726 ± 42	5,8
Farandole	693.7 ± 9.8	1,4			670.5 ± 33.1	4,9	719.1 ± 24.2	3,4
Garcia	727.7 ± 2.2	0,3	754.4 ± 10.2	1,4	723 ± 3.1	0,4	725.2 ± 43.6	6
Glasgow	743.5 ± 20.6	2,8			711.8 ± 5.7	0,8	719.5 ± 61	8,5
Koreli	710.1 ± 32.7	4,6			687.1 ± 19.2	2,8	745,5	NA
Maxyl	736.8 ± 15.8	2,1	742.2 ± 9.3	1,3	734.9 ± 6.3	0,9	744.8 ± 12.3	1,7
Mendel	689.2 ± 48.6	7	680.1 ± 28.2	4,1	693.5 ± 55.2	8	744.3 ± 6.7	0,9
Paledor	738.8 ± 1.8	0,2	701.7 ± 104.5	14,9	723.7 ± 28	3,9	786.9 ± 1.2	0,2
Perfector	713.4 ± 52.8	7,4	674.6 ± 31.6	4,7	692.8 ± 16.3	2,4	759.9 ± 8.9	1,2
Premio	751.6 ± 9.8	1,3	722.9 ± 24	3,3	742.8 ± 5.3	0,7	745.4 ± 18.5	2,5
Robigus	740.5 ± 2.2	0,3	695.9 ± 85.2	12,2	713.1 ± 41.3	5,8	738.1 ± 9.6	1,3
Rosario	715.6 ± 7.2	1	703.9 ± 2.2	0,3	723.4 ± 0.5	0,1	703.8 ± 16.1	2,3
Rytmic	701.2 ± 28.1	4			689.4 ± 17.6	2,6	757,8	NA
Sankara	729.4 ± 8	1,1	732.7 ± 7.7	1	709.7 ± 19.5	2,7	712.8 ± 17	2,4
Sogood	724.1 ± 14.6	2	692.4 ± 8.4	1,2	701.5 ± 2	0,3	728.3 ± 45.9	6,3
Soissons	734 ± 6.8	0,9	718.1 ± 104.6	14,6	727.8 ± 12.2	1,7	768.5 ± 25.1	3,3
Tapidor	727.4 ± 11.4	1,6	710.4 ± 8.5	1,2	709.3 ± 13.5	1,9	726.1 ± 1.5	0,2
Timber	767 ± 24.3	3,2	704.7 ± 19.5	2,8	734 ± 15.1	2,1	741 ± 6	0,8
Tremie	744.5 ± 7.2	1	669.1 ± 62.8	9,4	730.1 ± 11.2	1,5	746.7 ± 9.3	1,3
Voltige	763.7 ± 11.3	1,5			712.6 ± 29.4	4,1	761.7 ± 10.4	1,4

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	709.3 ± 5.2	0,7	744.4 ± 8.7	1,2	710,64	742,61
1010-13-2-4	713.5 ± 8.1	1,1	709.9 ± 0.7	0,1	718,34	724,29
Ambrosia	726.7 ± 10.7	1,5	718.7 ± 0.6	0,1	739,15	745,25
Andalou	753.8 ± 6	0,8	740.8 ± 1.3	0,2	732,11	790,83
Arack	722.9 ± 0.3	0	712.1 ± 28.2	4	728,55	741,52
Astuce	698.2 ± 18.4	2,6	678.3 ± 28.5	4,2	710,34	729,12
Bagou	727.1 ± 7.5	1	724.6 ± 27.7	3,8	717,28	790,01
Calisto	734.9 ± 6.1	0,8	715.2 ± 6.4	0,9	724	733,51
Caphorn	717.5 ± 9.3	1,3	720.1 ± 29.6	4,1	725,83	716,79
CF01085	744.9 ± 6.8	0,9	741.6 ± 24.7	3,3	719,23	753,67
Crousty	741 ± 11.5	1,5	733.8 ± 24.9	3,4	748,49	727,3
Dinosor	728 ± 3.2	0,4	715.3 ± 18.5	2,6	741,66	748,41
Farandole	695.1 ± 17.8	2,6	694.3 ± 15.5	2,2	694,28	715,06
Garcia	726.7 ± 13.3	1,8	767.8 ± 7.5	1	758,3	753,83
Glasgow	752.2 ± 21.5	2,9	718.9 ± 3.3	0,5	750,53	762,7
Koreli	707 ± 5.4	0,8	705.3 ± 39.3	5,6	735,01	716,3
Maxyl	741.6 ± 1.6	0,2	726.9 ± 35.4	4,9		735,92
Mendel	689.5 ± 1.3	0,2	704 ± 8	1,1	740,23	735,68
Paledor	721.6 ± 21	2,9	712.6 ± 19	2,7	728,37	759,49
Perfector	732.8 ± 25.3	3,5	717.4 ± 7.3	1	745,08	756,99
Premio	721.9 ± 1	0,1	730 ± 2.2	0,3	741,77	744,69
Quebon	697.9 ± 22.7	3,3	666.8 ± 0.3	0	697,6	705,04
Robigus	714.6 ± 11.5	1,6	744.7 ± 19.6	2,6	753,42	767,12
Rosario	729.9 ± 12.7	1,7	729.3 ± 7.3	1	698,57	740,93
Rytmic	707.3 ± 1.8	0,3	696.8 ± 10.9	1,6	720,76	714,97
Sankara	723.3 ± 22.5	3,1	728.2 ± 2.1	0,3	704,73	757,19
Sogood	715.6 ± 6.7	0,9	709.3 ± 25.9	3,6	738,56	737,11
Soissons	735.4 ± 8.9	1,2	744.2 ± 10.9	1,5	734,27	753,08
Tapidor	739.8 ± 12.8	1,7	752.3 ± 22.3	3	727,5	730,42
Timber	719.8 ± 27.4	3,8	716.8 ± 10.7	1,5	735,82	768,92
Tremie	744.8 ± 18.9	2,5	722.8 ± 13.3	1,8	752,21	770,58
Voltige			727.9 ± 5.8	0,8		760,02

# ANNEXES - Rendement en éthanol pour les variétés françaises en L/t



Method: 95.0 percent LSD

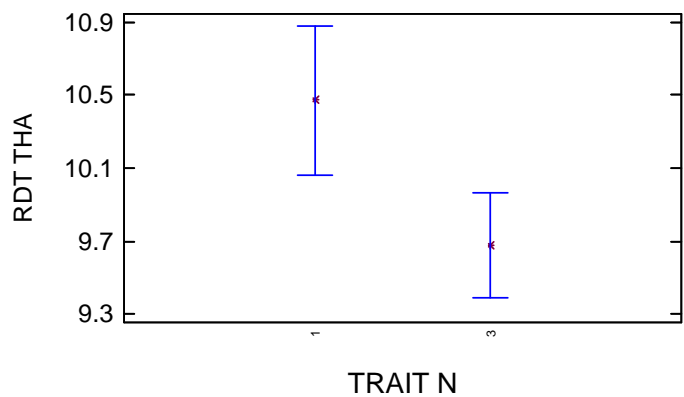
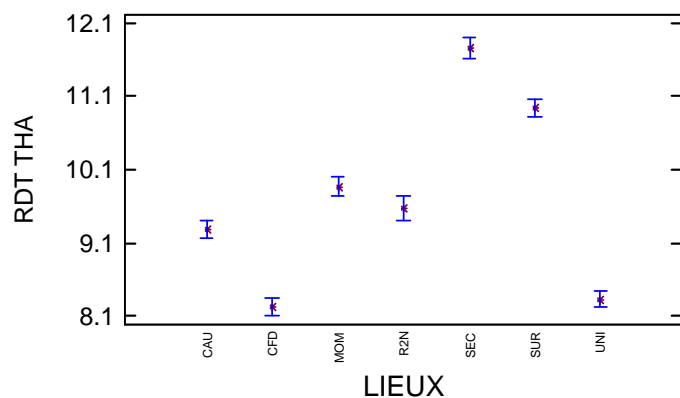
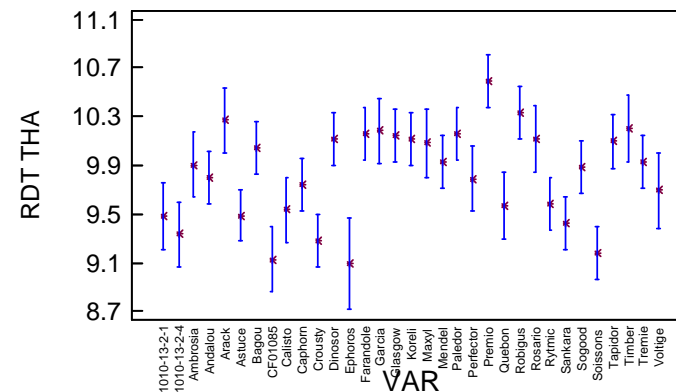
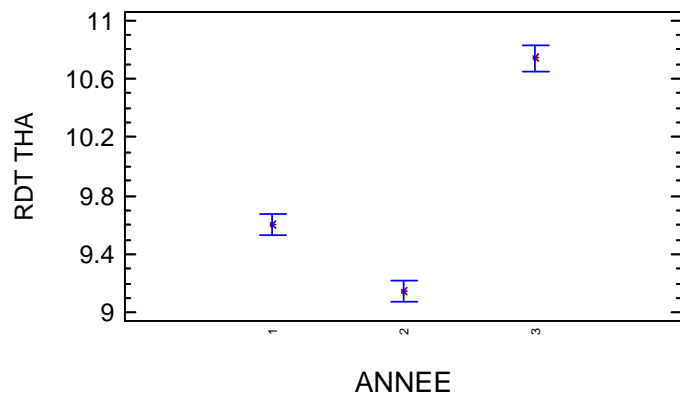
VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Quebon	6	441.514	6.71212	X
Ephoros	6	447.511	6.35722	XX
Rytmic	11	451.012	4.67032	XXX
Farandole	12	451.42	4.51827	XXX
Astuce	14	454.422	4.15922	XXXX
Caphorn	14	457.118	4.15922	XXXX
1010-13-2-4	6	457.339	6.71212	XXXXXX
Koreli	11	458.39	4.67032	XXXXXX
Rosario	14	459.924	4.15922	XXXXXX
Sankara	14	461.297	4.15922	XXXXXX
Mendel	14	461.462	4.15922	XXXXXX
Tapidor	14	461.553	4.15922	XXXXXX
Calisto	14	462.774	4.15922	XXXXXX
1010-13-2-1	6	462.939	6.71212	XXXXXXX
Perfector	14	464.157	4.15922	XXXX
Maxyl	13	464.218	4.29683	XXXX
Garcia	14	464.814	4.15922	XXXX
Robigus	14	465.434	4.15922	XXXX
CF01085	11	465.609	4.67034	XXXX
Dinosor	14	465.612	4.15922	XXXX
Arack	14	466.545	4.15922	XXX
Glasgow	13	467.287	4.39363	XXX
Bagou	14	467.345	4.15922	XXX
Premio	14	467.576	4.15922	XXX
Ambrosia	14	467.616	4.15922	XXX
Paledor	14	468.326	4.15922	XXX
Sogood	14	468.38	4.15922	XXX
Timber	14	468.878	4.15922	XX
Andalou	14	468.912	4.15922	XX
Voltige	9	469.666	5.19783	XXX
Crousty	14	470.476	4.15922	XX
Tremie	14	470.557	4.15922	XX
Soissons	14	473.12	4.15922	X

## ANNEXES - Rendement en éthanol pour les variétés françaises en L/t

	ANNEE 1							
	R2N		LeD		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	481.5 ± 27.1	5,6	434.1 ± 31.4	7,2	465.3 ± 11.6	2,5	478.9 ± 8.3	1,7
Andalou	463.4 ± 40.7	8,8	443.7 ± 7.3	1,6	467.2 ± 24.1	5,2	431.4 ± 10.5	2,4
Arack	468.1 ± 22.5	4,8	455.6 ± 58.6	12,9	477.5 ± 19.4	4,1	457.8 ± 59.4	13
Astuce	450.6 ± 0.8	0,2	441.2 ± 23.8	5,4	444.6 ± 0.5	0,1	471.3 ± 10.2	2,2
Bagou	461.1 ± 8.8	1,9	454.8 ± 12.9	2,8	460.6 ± 13.3	2,9	464.1 ± 35.5	7,6
Calisto	467 ± 17.3	3,7	444.9 ± 13.2	3	448.7 ± 20.2	4,5	465.9 ± 18.9	4,1
Caphorn	458.8 ± 3.1	0,7	438.3 ± 30.1	6,9	460.8 ± 9.9	2,2	445.4 ± 38.7	8,7
CF01085	458,3	NA			462.1 ± 1.6	0,4	458.6 ± 9.7	2,1
Crousty	456.2 ± 45.9	10,1	466.4 ± 45.2	9,7	470.1 ± 3.1	0,7	484.8 ± 13.5	2,8
Dinosor	471.8 ± 11.5	2,4	438 ± 11	2,5	448.4 ± 30.7	6,8	473.8 ± 6.2	1,3
Ephoros	424.8 ± 43.2	10,2			459.4 ± 12.1	2,6	453.6 ± 1.8	0,4
Farandole	443.9 ± 4.5	1			444.5 ± 23.3	5,2	462.4 ± 3.2	0,7
Garcia	459.1 ± 10.7	2,3	438.7 ± 27	6,2	452.6 ± 22.6	5	459.2 ± 25.9	5,6
Glasgow	466.8 ± 19.2	4,1			459.3 ± 27.5	6	453.4 ± 1	0,2
Koreli	447.1 ± 14.3	3,2			457.7 ± 6.7	1,5	457,8	NA
Maxyl	450.4 ± 17.1	3,8	439.2 ± 31.8	7,2	467.6 ± 32.3	6,9	471.5 ± 22	4,7
Mendel	458.8 ± 12	2,6	460.8 ± 22.9	5	470.6 ± 20.3	4,3	462.5 ± 1.5	0,3
Paledor	478 ± 11.7	2,5	454.1 ± 57.8	12,7	458.7 ± 24	5,2	489.3 ± 14.9	3
Perfector	463.7 ± 19	4,1	455.3 ± 25	5,5	462.4 ± 15.4	3,3	470.4 ± 19.6	4,2
Premio	465.9 ± 13	2,8	455.6 ± 11.3	2,5	466.3 ± 12.3	2,6	474.7 ± 2.1	0,4
Robigus	461.4 ± 38.8	8,4	472.6 ± 44.4	9,4	444.8 ± 49.6	11,1	467.1 ± 9.6	2,1
Rosario	453.6 ± 33.4	7,4	440.7 ± 4.6	1,1	451.9 ± 21.7	4,8	468.6 ± 12.6	2,7
Rytmic	443.5 ± 12.8	2,9			455.4 ± 4.8	1,1	449,1	NA
Sankara	467.3 ± 1.2	0,3	456.2 ± 50.8	11,1	453.5 ± 12	2,6	448.5 ± 25.4	5,7
Sogood	478.6 ± 21	4,4	464.3 ± 11.7	2,5	463.6 ± 18.4	4	476.3 ± 0.8	0,2
Soissons	462 ± 6.9	1,5	456.5 ± 53.1	11,6	483.3 ± 11.9	2,5	477.8 ± 1.7	0,4
Tapidor	463.6 ± 1	0,2	448.4 ± 42.3	9,4	467.8 ± 8	1,7	449.6 ± 43.4	9,7
Timber	465 ± 25.7	5,5	472.5 ± 29.9	6,3	467.6 ± 25.9	5,5	463.2 ± 25.8	5,6
Tremie	469.2 ± 3.5	0,7	452.7 ± 40	8,8	468.1 ± 2.5	0,5	471.9 ± 4.4	0,9
Voltige	462 ± 9.6	2,1			473.5 ± 11.5	2,4	472.4 ± 32.5	6,9

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	453.7 ± 1.6	0,4	475.9 ± 8	1,7	460,51	476,03
1010-13-2-4	454.5 ± 6.7	1,5	462 ± 0.8	0,2	456,74	476,64
Ambrosia	470.1 ± 4.7	1	465.3 ± 1.4	0,3	475,93	477,37
Andalou	481.9 ± 0.6	0,1	489.1 ± 1.4	0,3	479,14	506,29
Arack	466.3 ± 5.6	1,2	473.8 ± 5	1	470,72	481,7
Astuce	452.5 ± 14.5	3,2	453.7 ± 7.9	1,8	450,54	471,07
Bagou	466.7 ± 10.3	2,2	468.3 ± 14.5	3,1	469,58	501,11
Calisto	459.7 ± 1.7	0,4	461.4 ± 10.8	2,3	476,09	486,53
Caphorn	466.4 ± 11.5	2,5	461.2 ± 0.1	0	461,13	478,55
CF01085	468.4 ± 10.3	2,2	474.1 ± 1.5	0,3	464,72	487,86
Crousty	471.2 ± 1.4	0,3	472.9 ± 2.1	0,4	472,16	478,3
Dinosor	473.3 ± 3.1	0,6	469.6 ± 5.7	1,2	467,32	486,36
Farandole	451.6 ± 9.5	2,1	447.6 ± 14.4	3,2	453,47	469,6
Garcia	473.6 ± 6.1	1,3	481.4 ± 4.9	1	481,33	481,56
Glasgow	481.1 ± 2.5	0,5	464.9 ± 1	0,2	475,46	493,47
Koreli	463.7 ± 13.6	2,9	462.1 ± 10.5	2,3	463,13	473,82
Maxyl	471.7 ± 2.8	0,6	473.6 ± 3.8	0,8		473,65
Mendel	455.5 ± 1.6	0,3	450.7 ± 8.7	1,9	459,76	472,43
Paledor	465.3 ± 5.1	1,1	458.5 ± 8.8	1,9	468,62	486,18
Perfector	465.1 ± 10.7	2,3	460.1 ± 13.8	3	458,92	482,61
Premio	464.4 ± 3.8	0,8	465.8 ± 0.5	0,1	475,35	480,46
Quebon	448.5 ± 2.1	0,5	440.8 ± 11.2	2,5	438,02	461
Robigus	464 ± 0	0	468.8 ± 1	0,2	477,51	496,94
Rosario	470.2 ± 4.9	1	462.6 ± 1.1	0,2	456,24	476,7
Rytmic	458.3 ± 3.4	0,7	452.4 ± 5.4	1,2	435,34	471,62
Sankara	469.7 ± 5.3	1,1	471.3 ± 10.2	2,2	452,96	477,07
Sogood	461.9 ± 7.7	1,7	458.6 ± 3.5	0,8	463,79	482,05
Soissons	472.7 ± 3.4	0,7	479.6 ± 0.1	0	475,96	482,79
Tapidor	464.2 ± 6.3	1,4	473.8 ± 6.5	1,4	455,95	472,15
Timber	465.6 ± 7.3	1,6	464.5 ± 11.3	2,4	467,29	483,36
Tremie	477.4 ± 14.2	3	471.8 ± 8.8	1,9	462,45	494,51
Voltige			472.8 ± 0.2	0,1		485,04

## ANNEXES - Rendement parcellaire pour les variétés françaises en t/ha




---

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Ephoros	6	9.0906	0.270623	X
CF01085	12	9.12585	0.19312	X
Soissons	18	9.18513	0.155273	X
Crousty	18	9.28735	0.155273	X
1010-13-2-4	12	9.33464	0.192877	XX
Sankara	18	9.42324	0.155273	XXX
1010-13-2-1	12	9.48399	0.192877	XXXXX
Astuce	18	9.48946	0.155273	XXXX
Calisto	12	9.53733	0.19312	XXXXX
Quebon	12	9.56941	0.192877	XXXXXX
Rytmic	18	9.57868	0.155273	XXXXX
Voltige	9	9.69366	0.221749	XXXXXXXXX
Caphorn	18	9.74138	0.155273	XXXXXXX
Perfector	12	9.78754	0.19312	XXXXXXXXX
Andalou	18	9.79678	0.155273	XXXXXXXXX
Sogood	18	9.88078	0.155273	XXXXXX
Ambrosia	12	9.90271	0.19312	XXXXXXXXX
Mendel	18	9.92261	0.155273	XXXXXX
Tremie	18	9.93225	0.155273	XXXXXX
Bagou	18	10.0467	0.155273	XXXX
Maxyl	11	10.0833	0.200044	XXXX
Tapidor	17	10.0991	0.161465	XXX
Dinosor	18	10.1133	0.155273	XXX
Koreli	18	10.1144	0.155273	XXX
Rosario	12	10.1168	0.19312	XXXX
Glasgow	18	10.1392	0.155273	XXX
Farandole	18	10.1533	0.155273	XXX
Paledor	18	10.1623	0.155273	XXXX
Garcia	12	10.1827	0.19312	XXXX
Timber	12	10.2028	0.19312	XXXX
Arack	12	10.2707	0.19312	XXX
Robigus	18	10.3274	0.155273	XX
Premio	18	10.5932	0.155273	X

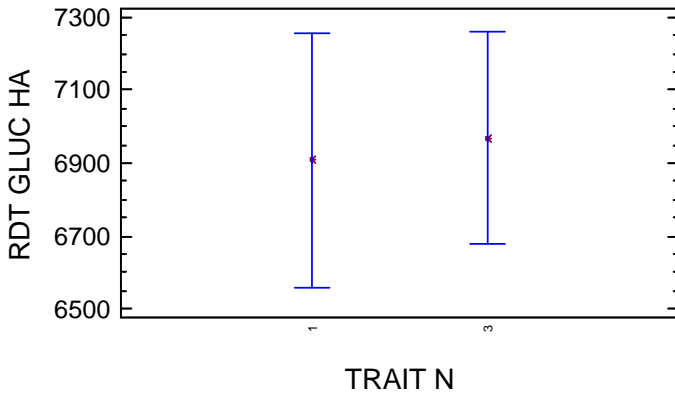
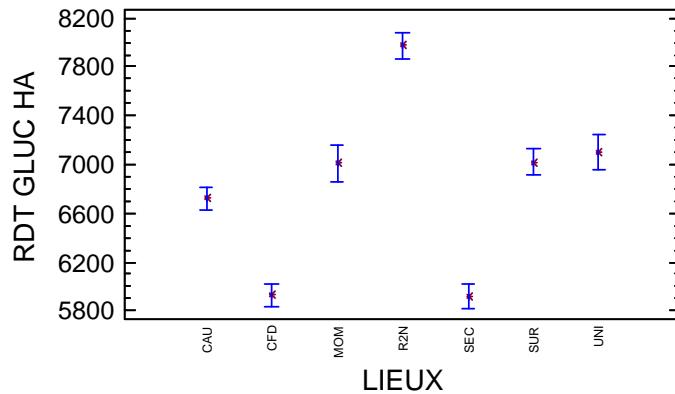
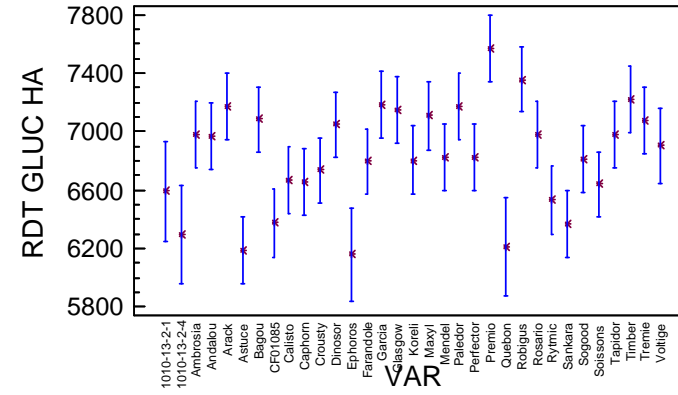
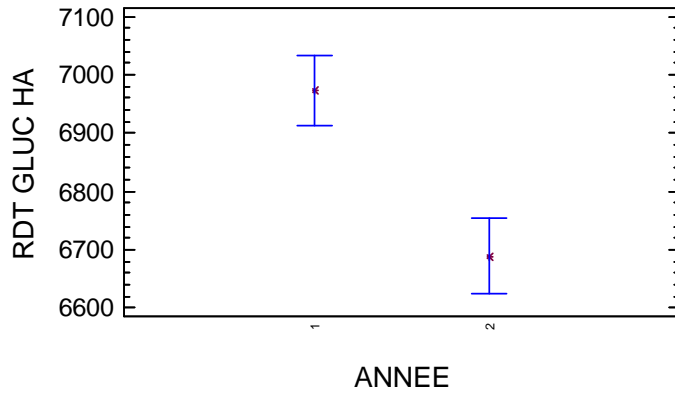
## ANNEXES - Rendement parcellaire pour les variétés françaises en t/ha

	ANNEE 1					
	R2N		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	11,13 ± 0,34	3,08	8,12 ± 0,86	10,58	9,63 ± 0,23	2,41
Andalou	10,88 ± 0,64	5,85	7,86 ± 0,42	5,31	10,14 ± 0,09	0,93
Arack	11,95 ± 0,67	5,59	9,19 ± 0,22	2,39	9,31 ± 0,03	0,3
Astuce	10 ± 0,1	1,05	8,37 ± 0,05	0,59	9,54 ± 0,04	0,44
Bagou	11,04 ± 0,25	2,28	8,24 ± 0,28	3,43	10,37 ± 0,12	1,14
Calisto	10,39 ± 0,25	2,38	8,15 ± 0,12	1,48	9,08 ± 0,75	8,3
Caphorn	10,33 ± 0,31	2,96	8,53 ± 0,51	5,93	9,86 ± 0,53	5,37
CF01085	10,65 ± 0,32	3,03	7,72 ± 0,27	3,48	9,03 ± 0,24	2,69
Crousty	9,94 ± 1,17	11,8	8,11 ± 0,28	3,4	9,92 ± 0,1	1,05
Dinosor	12,25 ± 0,79	6,47	8,4 ± 0,08	0,93	7,5 ± 0,21	2,79
Ephoros	10,43 ± 0,88	8,45	7,57 ± 0,14	1,87	8,6 ± 0,13	1,48
Farandole	11,05 ± 1,5	13,57	8,43 ± 0,28	3,36	9,9 ± 0,57	5,79
Garcia	11,15 ± 1,04	9,3	8,35 ± 0,18	2,12	10,31 ± 0,47	4,59
Glasgow	11,8 ± 0,43	3,62	8,98 ± 0,18	2,05	9,42 ± 0,15	1,55
Koreli	11,04 ± 0,75	6,79	7,77 ± 0,11	1,41	10,13 ± 0,05	0,48
Maxyl	10,78 ± 1,63	15,14	8,57 ± 0,05	0,62	10,5 ± 0,05	0,43
Mendel	10,68 ± 0,58	5,4	9,03 ± 0,14	1,53	10,37 ± 0,08	0,75
Paledor	11,14 ± 1,25	11,21	8,77 ± 0,04	0,44	9,96 ± 0,64	6,38
Perfector	12,07 ± 0,97	8,05	8,72 ± 0,46	5,23	8,76 ± 0,79	9,04
Premio	11,92 ± 0,79	6,66	8,86 ± 0,06	0,72	11,18 ± 0,12	1,12
Robigus	11,89 ± 0,87	7,34	8,48 ± 0,78	9,21	9,89 ± 0,54	5,43
Rosario	11,14 ± 0,74	6,64	8,58 ± 0,19	2,18	8,4 ± 0,01	0,17
Rytmic	10,75 ± 0,69	6,44	8,09 ± 0,3	3,67	8,12 ± 0,29	3,58
Sankara	10,18 ± 0,57	5,55	8,28 ± 0,09	1,07	8,56 ± 0,36	4,22
Sogood	11,35 ± 0,41	3,6	8,27 ± 0,05	0,64	9,53 ± 0,05	0,53
Soissons	9,86 ± 1,09	11,03	8,32 ± 0,42	5,1	9,59 ± 0,03	0,26
Tapidor	10,86 ± 0,82	8,5	8,52 ± 0,7	8,18	10,23 ± 0,09	0,88
Timber	11,77 ± 0,29	2,48	8,67 ± 0,19	2,2	10,2 ± 0,36	3,51
Tremie	10,79 ± 0,86	8,94	8,15 ± 0,07	0,82	9,83 ± 0,01	0,13
Voltige	10,37 ± 0,14	1,38	8,08 ± 0,47	5,87	9,04 ± 0,93	10,29

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	9,31 ± 0,22	2,36	8,29 ± 1,05	12,65	8,53	8,72
1010-13-2-4	8,9 ± 0,12	1,35	8,01 ± 1,01	12,66	8,44	8,58
Ambrosia	9,33 ± 0,61	6,52	8,14 ± 0,13	1,54	9,54	10,59
Andalou	9,87 ± 0,19	1,9	8,53 ± 0,61	7,14	8,9	9,01
Arack	9,68 ± 0,3	3,07	8,82 ± 0,05	0,6	8,99	9,73
Astuce	6,67 ± 0,5	7,53	7,76 ± 1,33	17,2	10,52	10,22
Bagou	9,6 ± 0,19	2,03	8,5 ± 0,49	5,78	9,57	9,93
Calisto	9,3 ± 0,16	1,71	7,66 ± 0,08	1,03	9,67	9,71
Caphorn	9,09 ± 0,05	0,51	8,33 ± 0,38	4,56	9,69	8,38
CF01085	8,22 ± 0,41	4,99	7,51 ± 0,47	6,24	8,71	8,32
Crousty	9,24 ± 0,23	2,49	7,72 ± 1,02	13,24	9,48	8,18
Dinosor	9,96 ± 0,06	0,6	8,57 ± 0,1	1,17	9,92	10,27
Farandole	10,06 ± 0,36	3,55	8,43 ± 0,11	1,35	9,76	10,03
Garcia	9,98 ± 0,48	4,82	8,74 ± 0,39	4,43	10,66	8,21
Glasgow	9,61 ± 0,33	3,38	7,96 ± 0,67	8,4	9,7	10,88
Koreli	10,02 ± 0,36	3,56	7,74 ± 1,12	14,45	10	10,56
Maxyl	9,72 ± 0,42	4,33	8,39 ± 0,51	6,02	8,61	8,91
Mendel	9,47 ± 0,19	2,05	8,43 ± 0,18	2,16	8,61	8,91
Paledor	9,89 ± 0,49	4,97	8,39 ± 1,12	13,39	10,27	9,16
Perfector	8,26 ± 0,12	1,41	8,06 ± 0,56	6,97	10,16	9,66
Premio	10,69 ± 0,21	1,92	8,1 ± 0,73	9	10,3	9,68
Quebon	7,99 ± 0,15	1,9	8,71 ± 0,13	1,52	9,04	9,38
Robigus	9,55 ± 0,18	1,93	8,71 ± 0,27	3,1	10,94	11,56
Rosario	10,38 ± 0,33	3,13	8,36 ± 0,01	0,08	10,87	10,69
Rytmic	8,85 ± 0,23	2,6	8,82 ± 0,79	8,93	8,91	10,35
Sankara	8,47 ± 0,02	0,21	8,01 ± 0,01	0,09	8,81	8,85
Sogood	9,96 ± 0,01	0,07	7,47 ± 0,84	11,24	9,5	9,71
Soissons	8,94 ± 0,35	3,91	7,68 ± 1,03	13,43	9,37	8,16
Tapidor	9,23 ± 0,16	1,69	8,55 ± 1,24	14,5	9,44	9,16
Timber	9,03 ± 0,23	2,59	8,29 ± 0,87	10,45	10,08	10,69
Tremie	9,34 ± 0,18	1,97	8,74 ± 0,03	0,3	10,31	9,4
Voltige			8,7 ± 0,23	2,59		10,09

	ANNEE 3					
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
1010-13-2-1	9,85 ± 0,395	4,01	10,85 ± 0,27	2,48	10,4 ± 0,767	7,38
1010-13-2-4	9,91 ± 0,375	3,79	10,97 ± 0,464	4,23	10,09 ± 0,382	3,78
Andalou	10,14 ± 0,269	2,65	10,95 ± 0,507	4,63	10,44 ± 0,134	1,29
Astuce	9,85 ± 0,624	6,34	12,08 ± 0,189	1,56	10,57 ± 0,336	3,18
Bagou	9,77 ± 0,024	0,25	12,02 ± 0,043	0,36	10,76 ± 0,166	1,54
Caphorn	10,05 ± 0,323	3,21	11,44 ± 0,135	1,18	10,54 ± 0,315	2,99
Crousty	8,76 ± 0,416	4,76	11,09 ± 0,495	4,46	9,57 ± 0,474	4,95
Dinosor	10,68 ± 0,037	0,35	11,99 ± 0,113	0,94	11,2 ± 0,598	5,34
Farandole	10,1 ± 0,269	2,66	12,2 ± 0,85	6,96	10,94 ± 0,47	4,3
Glasgow	8,99 ± 0,177	1,97	12,69 ± 0,31	2,44	11,2 ± 0,24	2,15
Koreli	10,61 ± 0,836	7,88	12,12 ± 0,317	2,61	11,04 ± 0,562	5,09
Mendel	9,6 ± 0,541	5,64	11,86 ± 0,243	2,05	10,51 ± 0,194	1,85
Paledor	10,21 ± 0,297	2,91	12,44 ± 0,497	3,99	10,68 ± 0,562	5,26
Premio	10,53 ± 0,357	3,39	12,74 ± 0,081	0,64	10,89 ± 0,279	2,56
Quebon	10,44 ± 0,214	2,05	11,55 ± 0,391	3,39	9,77 ± 0,113	1,16
Robigus	9,12 ± 0,969	10,63	12,3 ± 0,081	0,66	11,46 ± 0,41	3,58
Rytmic	9,67 ± 0,329	3,4	11,68 ± 0,076	0,65	10,19 ± 0,643	6,32
Sankara	9,83 ± 0,211	2,15	11,85 ± 0,081	0,68	10,37 ± 0,194	1,87
Sogood	9,58 ± 0,339	3,54	12,08 ± 0,4	3,31	10,79 ± 0,682	6,33
Soissons	9,03 ± 0,062	0,68	10,4 ± 0,07	0,67	9,74 ± 0,721	7,41
Tapidor	10,32 ± 0,447	4,33	12,28 ± 0,13	1,06	11,33	NA
Tremie	10,25 ± 0,793	7,74	11,24 ± 0,022	0,19	10,73 ± 0,184	1,71

ANNEXES - Rendement en glucose à l'hectare pour les variétés françaises en kg/ha



Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Ephoros	6	6158.13	228.758	XX
Astuce	12	6184.22	162.705	X
Quebon	6	6209.16	242.534	XXX
1010-13-2-4	6	6295.35	242.534	XXXXX
Sankara	12	6364.15	162.705	XXXX
CF01085	11	6375.89	168.272	XXXXX
Rytmic	11	6533.07	168.273	XXXXXXX
1010-13-2-1	6	6590.33	242.534	XXXXXXXXXX
Soissons	12	6638.54	162.705	XXXXXXX
Caphorn	12	6657.61	162.705	XXXXXXXXXX
Calisto	12	6670.88	162.705	XXXXXXXXXX
Crousty	12	6734.44	162.705	XXXXXXXXXX
Farandole	12	6795.15	162.705	XXXXXXXXXX
Koreli	11	6800.25	168.273	XXXXXXXXXX
Sogood	12	6809.88	162.705	XXXXXXXXXX
Perfactor	12	6823.43	162.705	XXXXXXXXXX
Mendel	12	6826.31	162.705	XXXXXXXXXX
Voltige	9	6902.35	187.102	XXXXXXXXXX
Andalou	12	6970.84	162.705	XXXXXXXXXX
Tapidor	12	6976.59	162.705	XXXXXXXXXX
Ambrosia	12	6977.81	162.705	XXXXXXXXXX
Rosario	12	6978.6	162.705	XXXXXXXXXX
Dinosor	12	7046.75	162.705	XXXXXXX
Tremie	12	7080.26	162.705	XXXXXXX
Bagou	12	7083.57	162.705	XXXXXXX
Maxyl	11	7110.85	168.703	XXXXXXX
Glasgow	12	7151.18	162.705	XXXXXX
Arack	12	7172.47	162.705	XXXX
Paledor	12	7173.39	162.705	XXXX
Garcia	12	7184.8	162.705	XXXX
Timber	12	7221.45	162.705	XXX
Robigus	12	7357.34	162.705	XX
Premio	12	7565.18	162.705	X

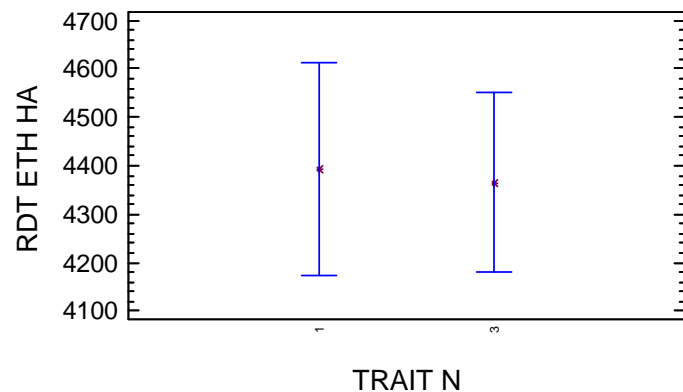
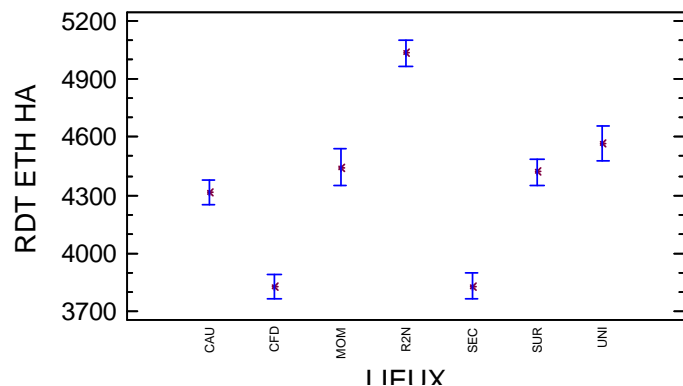
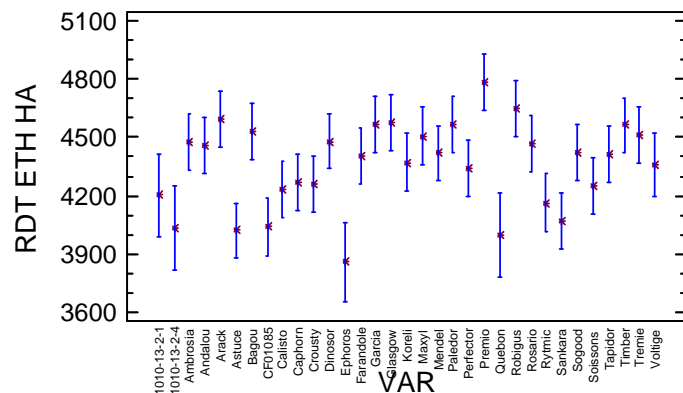


ANNEXES - Rendement en glucose à l'hectare pour les variétés françaises en kg/ha

	ANNEE 1					
	R2N		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	8331,1 ± 414,74	4,98	5927,41 ± 721,38	12,17	7213,73 ± 79,5	1,1
Andalou	7920,28 ± 460,91	5,82	5673,37 ± 195,07	3,44	7280,07 ± 233,03	3,2
Arack	8888,78 ± 440,04	4,95	6665,48 ± 584,22	8,76	6852,33 ± 232,63	3,39
Astuce	6888,2 ± 34,71	0,5	5802,48 ± 74,5	1,28	6887,58 ± 367,83	5,34
Bagou	8101,93 ± 33,78	0,42	5794,47 ± 53,13	0,92	7712,04 ± 632,68	8,2
Calisto	7758,14 ± 377,75	4,87	5781,92 ± 124,71	2,16	6729,03 ± 193,53	2,88
Caphorn	7382,87 ± 60,05	0,81	6197,5 ± 7,14	0,12	6964,27 ± 372,28	5,35
CF01085	7820,73	NA	5485,12 ± 49,68	0,91	6747,23 ± 463,79	6,87
Crousty	7349,27 ± 1032,47	14,05	5860,45 ± 324,23	5,53	7598,8 ± 329,57	4,34
Dinosor	9375,21 ± 326,84	3,49	5979,8 ± 138,02	2,31	5662,96 ± 107,49	1,9
Ephoros	7326,8 ± 887,13	12,11	5330,5 ± 52,94	0,99	6243,89 ± 453,58	7,26
Farandole	7675,41 ± 1149,39	14,97	5657 ± 468,62	8,28	7115,6 ± 173,05	2,43
Garcia	8116,02 ± 730,21	9	6033,79 ± 153,88	2,55	7463,85 ± 106,88	1,43
Glasgow	8780,11 ± 561,05	6,39	6392,83 ± 182,15	2,85	6784,87 ± 679,88	10,02
Koreli	7847,8 ± 893,42	11,38	5341,15 ± 224,24	4,2		
Maxyl	7930,1 ± 1032,16	13,02	6296,19 ± 93,17	1,48	7822,21 ± 163,3	2,09
Mendel	7375,24 ± 916,71	12,43	6268,28 ± 594,48	9,48	7721,92 ± 11,59	0,15
Paledor	8230,07 ± 903,01	10,97	6345,29 ± 273,24	4,31	7836,89 ± 512,39	6,54
Perfector	8636,91 ± 1330,53	15,41	6038,96 ± 173,73	2,88	6657,01 ± 679,49	10,21
Premio	8959,34 ± 712,42	7,95	6577,85 ± 93,87	1,43	8334,28 ± 114,21	1,37
Robigus	8800,85 ± 620,13	7,05	6065,22 ± 907,77	14,97	7301,38 ± 490,65	6,72
Rosario	7973,55 ± 609,65	7,65	6208,11 ± 131,3	2,11	5914,05 ± 145,01	2,45
Rytmic	7548,55 ± 787,21	10,43	5574,23 ± 62,29	1,12	6001,07	NA
Sankara	7419,94 ± 330,42	4,45	5878,74 ± 224,06	3,81	6105,22 ± 403,33	6,61
Sogood	8224,44 ± 461,14	5,61	5803,21 ± 20,68	0,36	6937,8 ± 400,43	5,77
Soissons	7230,38 ± 730,59	10,1	6058,03 ± 410,19	6,77	7371,88 ± 260,45	3,53
Tapidor	7892,82 ± 546,86	6,93	6046,58 ± 609,12	10,07	7426,13 ± 80,15	1,08
Timber	9023,96 ± 61,78	0,68	6361,56 ± 271,26	4,26	7557,65 ± 204,32	2,7
Tremie	8033,31 ± 640,21	7,97	5948,95 ± 140,19	2,36	7337,85 ± 82,34	1,12
Voltige	7916,93 ± 226,24	2,86	5761,08 ± 575,33	9,99	6888,54 ± 802,22	11,65

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	6600,88 ± 204,31	3,1	6176,52 ± 852,37	13,8	6064,15	6475,54
1010-13-2-4	6346,9 ± 158,15	2,49	5687,19 ± 714,55	12,56	6065,95	6213,69
Ambrosia	6776,48 ± 342,34	5,05	5849,28 ± 94,64	1,62	7054,13	7894,41
Andalou	7441,09 ± 81,74	1,1	6322,45 ± 461,96	7,31	6516,47	7125,38
Arack	6997,5 ± 217,23	3,1	6282,56 ± 286,18	4,56	6551,57	7214,22
Astuce	4648,73 ± 227,99	4,9	5243,04 ± 684,3	13,05	7474,42	7447,92
Bagou	6977,18 ± 69,86	1	6151,38 ± 120,02	1,95	6864,61	7840,88
Calisto	6836,22 ± 59,87	0,88	5479,77 ± 105,84	1,93	7004,03	7118,69
Caphorn	6524,26 ± 117,58	1,8	5993,82 ± 27	0,45	7032,44	6004,51
CF01085	6124,35 ± 361,6	5,9	5577,9 ± 533,18	9,56	6263,58	6270,54
Crousty	6843,8 ± 64,46	0,94	5654,51 ± 557,42	9,86	7096,83	5946,38
Dinosor	7249,32 ± 11,54	0,16	6129,95 ± 229,74	3,75	7356,49	7688,41
Farandole	6997,96 ± 427,81	6,11	5851,2 ± 51,45	0,88	6778,26	7173,44
Garcia	7255,49 ± 482,31	6,65	6713,1 ± 363,41	5,41	8083,38	6187,42
Glasgow	7225,58 ± 38,24	0,53	5724,29 ± 454,29	7,94	7279,25	8296,65
Koreli	7084,49 ± 198,55	2,8	5435,82 ± 485,03	8,92	7347,28	7565,55
Maxyl	7210,66 ± 327,62	4,54	6108,24 ± 664,34	10,88		6431,18
Mendel	6531,31 ± 146,6	2,24	5935,46 ± 60,27	1,02	6371,46	6551,96
Paledor	7129,97 ± 147,19	2,06	5966,62 ± 641,17	10,75	7477,93	6953,13
Perfector	6053,37 ± 123,62	2,04	5782,94 ± 344,29	5,95	7573,5	7310,97
Premio	7713 ± 137,61	1,78	5914,6 ± 514,83	8,7	7637,53	7211,61
Quebon	5576,08 ± 75,49	1,35	5806,21 ± 85,75	1,48	6307,28	6613,96
Robigus	6823,43 ± 21,72	0,32	6482,8 ± 30,36	0,47	8240,71	8865,59
Rosario	7573,83 ± 105,94	1,4	6097,2 ± 65,34	1,07	7589,94	7917,58
Rytmic	6257,67 ± 178,87	2,86	6141,73 ± 453,05	7,38	6420,72	7396,32
Sankara	6127,87 ± 177,82	2,9	5829,53 ± 21,93	0,38	6208,61	6697,32
Sogood	7123,57 ± 61,35	0,86	5308,64 ± 788,48	14,85	7019,26	7155,84
Soissons	6574,43 ± 177,55	2,7	5712,81 ± 684,1	11,97	6880,87	6145,89
Tapidor	6826,95 ± 2,94	0,04	6415,65 ± 741,78	11,56	6865,47	6686,95
Timber	6499,61 ± 414,94	6,38	5938,95 ± 532,17	8,96	7419,28	8219,77
Tremie	6954,78 ± 39,42	0,57	6314,51 ± 97,31	1,54	7756,15	7239,63
Voltige			6335,59 ± 113,64	1,79		7666,29

## ANNEXES - Rendement en éthanol à l'hectare pour les variétés françaises en L/ha



Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Ephoros	6	3859.72	145.279	X
Quebon	6	4000.13	154.028	XXX
Astuce	12	4021.5	103.33	XX
1010-13-2-4	6	4033.01	154.028	XXXX
CF01085	11	4041.36	106.866	XX
Sankara	12	4068.15	103.33	XXX
Rytmic	11	4162.98	106.866	XXXXXX
1010-13-2-1	6	4202.61	154.028	XXXXXXXXXX
Calisto	12	4234.16	103.33	XXXXXX
Soissons	12	4251.64	103.33	XXXXXXXX
Crousty	12	4257.13	103.33	XXXXXXXX
Caphorn	12	4271.65	103.33	XXXXXXX
Perfector	12	4342.89	103.33	XXXXXXXXXX
Voltige	9	4358.44	118.824	XXXXXXXXXXX
Koreli	11	4370.4	106.866	XXXXXXXXXX
Farandole	12	4400.92	103.33	XXXXXXXXXX
Tapidor	12	4412.64	103.33	XXXXXXXXXX
Mendel	12	4417.57	103.33	XXXXXXXXXX
Sogood	12	4421.26	103.33	XXXXXXXXXX
Andalou	12	4457.36	103.33	XXXXXX
Rosario	12	4466.01	103.33	XXXXXX
Ambrosia	12	4477.9	103.33	XXXXXX
Dinosor	12	4480.4	103.33	XXXXXX
Maxyl	11	4504.64	107.139	XXXXXXXXXX
Tremie	12	4511.84	103.33	XXXXXXXXXX
Bagou	12	4526.99	103.33	XXXXXX
Timber	12	4561.67	103.33	XXXX
Garcia	12	4563.07	103.33	XXXX
Paledor	12	4570.11	103.33	XXX
Glasgow	12	4572.38	103.33	XXX
Arack	12	4597.25	103.33	XXX
Robigus	12	4646.99	103.33	XX
Premio	12	4784.48	103.33	X

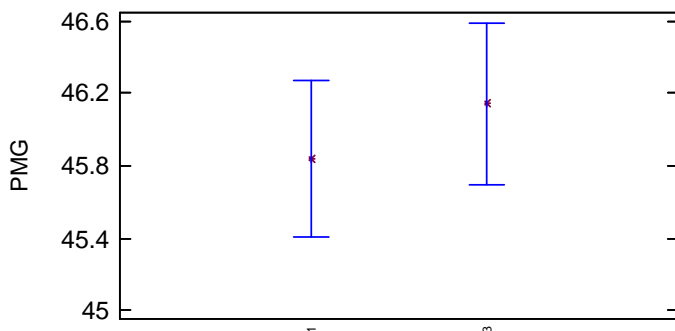
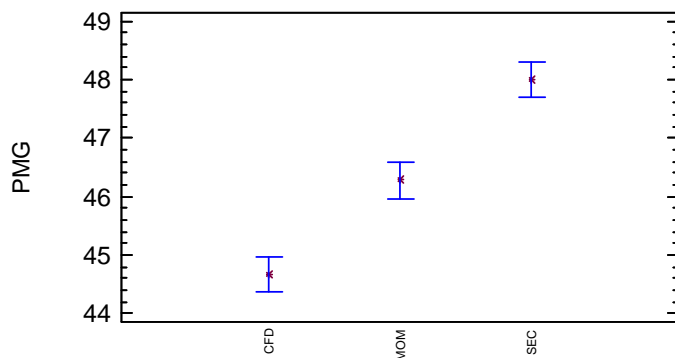
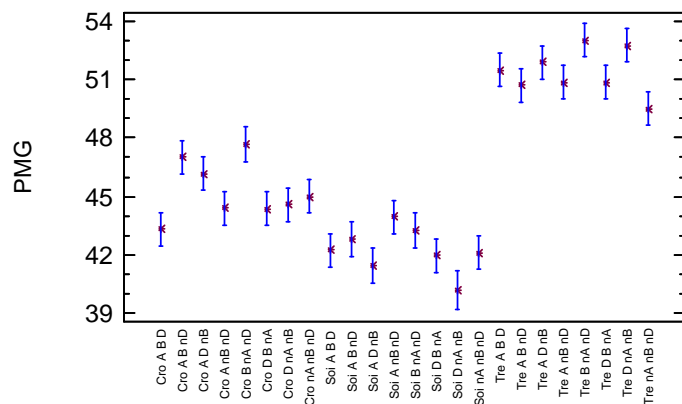
ANNEXES - Rendement en éthanol à l'hectare pour les variétés françaises en L/ha

	ANNEE 1					
	R2N		SEC		SUR	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Ambrosia	5365,72 ± 466,63	8,7	3784,46 ± 493,84	13,05	4615,15 ± 191,05	4,14
Andalou	5052,78 ± 737,79	14,6	3664,49 ± 5,58	0,15	4375,36 ± 146,84	3,36
Arack	5586,84 ± 43,15	0,77	4388,41 ± 283,26	6,45	4262,5 ± 540,67	12,68
Astuce	4508,09 ± 38,7	0,86	3718,65 ± 17,86	0,48	4495,94 ± 117,39	2,61
Bagou	5088,57 ± 19,46	0,38	3797,42 ± 239,54	6,31	4813,33 ± 422,96	8,79
Calisto	4852,35 ± 294,79	6,08	3653,68 ± 110,45	3,02	4224,23 ± 179,52	4,25
Caphorn	4737,93 ± 172,45	3,64	3934,1 ± 317,7	8,08	4400,19 ± 616,7	14,02
CF01085	4986,42	NA	3566,81 ± 111,6	3,13	4143,88 ± 199,6	4,82
Crousty	4508,16 ± 78,51	1,74	3809,7 ± 104,47	2,74	4806,12 ± 82,72	1,72
Dinosor	5773,74 ± 232,98	4,04	3763,14 ± 222,73	5,92	3554,98 ± 52,14	1,47
Ephoros	4410,06 ± 76,35	1,73	3476,42 ± 26,57	0,76	3899,81 ± 42,63	1,09
Farandole	4903,25 ± 616,7	12,58	3750 ± 321,82	8,58	4581,29 ± 296,98	6,48
Garcia	5127,04 ± 595,94	11,62	3774,93 ± 108,83	2,88	4726,15 ± 49,92	1,06
Glasgow	5513,76 ± 426,39	7,73	4122,32 ± 162,72	3,95	4272,96 ± 76,02	1,78
Koreli	4928,48 ± 177,45	3,6	3556,72 ± 2,05	0,06	#DIV/0!	#DIV/0!
Maxyl	4841,6 ± 550,78	11,38	4005,73 ± 252,07	6,29	4951,63 ± 209,16	4,22
Mendel	4896,57 ± 136,42	2,79	4252,2 ± 248,69	5,85	4798,36 ± 51,5	1,07
Paledor	5318,36 ± 466,52	8,77	4021,9 ± 228,32	5,68	4878,17 ± 459,21	9,41
Perfector	5588,39 ± 221,63	3,97	4036,45 ± 344,85	8,54	4126,3 ± 543,89	13,18
Premio	5546,69 ± 214,26	3,86	4129,62 ± 138,82	3,36	5308,2 ± 35,9	0,68
Robigus	5467,89 ± 58,07	1,06	3792,07 ± 768,12	20,26	4616,12 ± 155,91	3,38
Rosario	5040,41 ± 36,57	0,73	3876,02 ± 101,57	2,62	3937,74 ± 99,41	2,52
Rytmic	4763,69 ± 169,22	3,55	3684,9 ± 174,15	4,73	3555,95	NA
Sankara	4754,61 ± 251,54	5,29	3756,38 ± 139,27	3,71	3843,96 ± 379,17	9,86
Sogood	5430,12 ± 42,66	0,79	3834,52 ± 127,33	3,32	4537,96 ± 31,97	0,7
Soissons	4557,45 ± 569,75	12,5	4023,67 ± 304,02	7,56	4582,41 ± 28,25	0,62
Tapidor	5034,01 ± 438,86	8,72	3981,39 ± 257,57	6,47	4600,82 ± 484,27	10,53
Timber	5469,58 ± 167,31	3,06	4049,43 ± 134,77	3,33	4720,47 ± 96,96	2,05
Tremie	5067,04 ± 490,18	9,67	3814,01 ± 11,06	0,29	4637,23 ± 37,06	0,8
Voltige	4788,04 ± 33,57	0,7	3820,45 ± 131,13	3,43	4284,41 ± 733,22	17,11

	ANNEE 2					
	CAU		CFD		MOM	UNI
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)		
1010-13-2-1	4221,67 ± 84,63	2	3941,83 ± 432,55	10,97	3929,66	4151,02
1010-13-2-4	4042,7 ± 4,73	0,12	3702,3 ± 474,72	12,82	3856,93	4089,11
Ambrosia	4384,97 ± 242,02	5,52	3787,07 ± 69,23	1,83	4542,01	5056,82
Andalou	4757,5 ± 84,82	1,78	4173,37 ± 286,34	6,86	4264,8	4561,68
Arack	4514,93 ± 192,88	4,27	4179,45 ± 18,81	0,45	4232,99	4686,44
Astuce	3019,73 ± 323,8	10,72	3524,93 ± 667,18	18,93	4740,79	4811,96
Bagou	4477,96 ± 8,53	0,19	3976,3 ± 106,79	2,69	4494,08	4973,52
Calisto	4276,71 ± 88,94	2,08	3535,45 ± 119,55	3,38	4605,7	4721,75
Caphorn	4240,87 ± 126,02	2,97	3841,96 ± 174,15	4,53	4467,8	4008,82
CF01085	3848 ± 107,11	2,78	3562,47 ± 233,17	6,55	4047,1	4058,97
Crousty	4352,56 ± 121,33	2,79	3650,78 ± 467,42	12,8	4476,75	3910,57
Dinosor	4713,02 ± 59,01	1,25	4023,01 ± 1,49	0,04	4635,3	4996,42
Farandole	4542,36 ± 66,13	1,46	3771,3 ± 70,22	1,86	4427,17	4711
Garcia	4728,14 ± 289	6,11	4208,8 ± 229,7	5,46	5130,9	3952,62
Glasgow	4622,77 ± 132,7	2,87	3701,69 ± 302,48	8,17	4611,36	5367,97
Koreli	4645,01 ± 29,14	0,63	3570,1 ± 435,26	12,19	4629,54	5004,44
Maxyl	4586,28 ± 225,71	4,92	3974,77 ± 271,35	6,83		4139,26
Mendel	4315,12 ± 103,3	2,39	3799,99 ± 8,9	0,23	3957,32	4207,49
Paledor	4599,32 ± 178,17	3,87	3840,84 ± 441,46	11,49	4811,19	4450,99
Perfector	3842,16 ± 34,1	0,89	3706,15 ± 147,04	3,97	4664,8	4661,08
Premio	4961,27 ± 54,15	1,09	3774,03 ± 335,79	8,9	4894,37	4652,82
Quebon	3585,16 ± 84,67	2,36	3837,73 ± 39,41	1,03	3960,33	4324,63
Robigus	4431,22 ± 85,22	1,92	4082,6 ± 117,95	2,89	5222,81	5743,11
Rosario	4881,31 ± 203,76	4,17	3867,43 ± 6,04	0,16	4957,04	5094,06
Rytmic	4055,26 ± 135,57	3,34	3991,9 ± 404,31	10,13	3878,08	4878,96
Sankara	3979,36 ± 36,73	0,92	3772,61 ± 85,24	2,26	3990,53	4219,7
Sogood	4597,95 ± 73,15	1,59	3427,01 ± 410,77	11,99	4407,9	4679,74
Soissons	4226,56 ± 135,08	3,2	3685,38 ± 495,97	13,46	4460,22	3940,04
Tapidor	4284,44 ± 13,91	0,32	4044,94 ± 531,67	13,14	4302,8	4322,55
Timber	4201,24 ± 42,84	1,02	3846,52 ± 308,55	8,02	4711,67	5167,08
Tremie	4457,79 ± 44,66	1	4121,64 ± 64,22	1,56	4768,35	4645,92
Voltige			4115,84 ± 104,38	2,54		4892,59

## **B. ANNEXES DES LIGNÉES ISOGÉNIQUES WAXY**

## ANNEXES – PMG des lignées isogéniques waxy en grammes

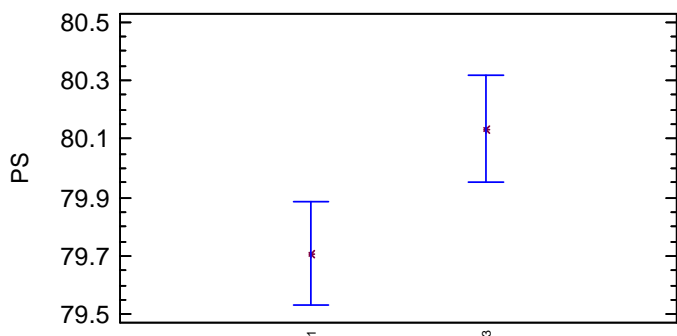
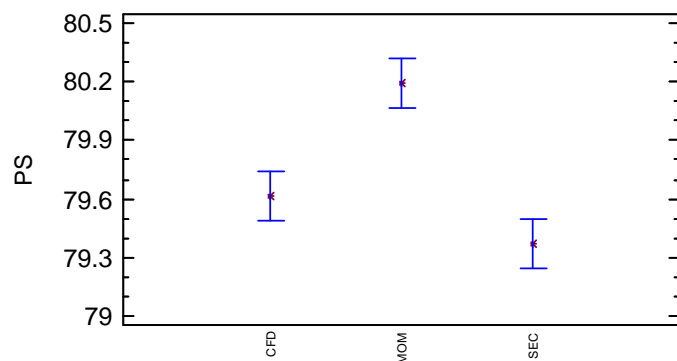
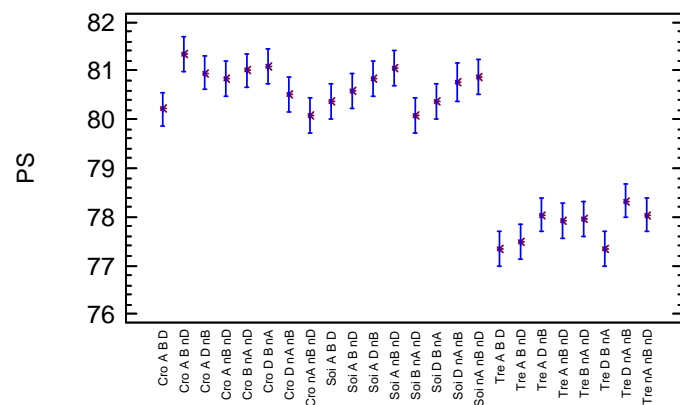


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	41.91 ± 4.03	9,62	44.04 ± 0.2	0,45	43.99 ± 0.27	0,61
Cro A B nD	44.81 ± 1	2,23	47.77 ± 0.44	0,92	48.47 ± 0.21	0,43
Cro A D nB	43.75 ± 2.36	5,39	47.44 ± 0.4	0,84	47.35 ± 0.58	1,22
Cro D B nA	42.58 ± 1.5	3,52	44.58 ± 0.79	1,77	45.93 ± 0.78	1,7
Cro A nB nD	42.3 ± 0.74	1,75	45.87 ± 0.44	0,96	45.06 ± 0.23	0,51
Cro B nA nD	48.5 ± 0.34	0,7	46.7 ± 0.2	0,43	47.81 ± 0.18	0,38
Cro D nA nB	42.95 ± 0.3	0,7	45.06 ± 1.3	2,89	45.74 ± 0.59	1,29
Cro nA nB nD	41.91 ± 1.85	4,41	45.95 ± 0.18	0,39	47.16 ± 1.16	2,46
Soi A B D	40.55 ± 0.78	1,92	42.33 ± 0.81	1,91	43.87 ± 1.82	4,15
Soi A B nD	41.12 ± 0	0	43.17 ± 0.47	1,09	44.16 ± 0.11	0,25
Soi A D nB	40.99 ± 0.49	1,2	40.82 ± 1.58	3,87	42.57 ± 0.24	0,56
Soi D B nA	41.53 ± 0.13	0,31	40.81 ± 0.33	0,81	43.57 ± 0.72	1,65
Soi A nB nD	42.86 ± 2.06	4,81	43.86 ± 1.53	3,49	45.14 ± 0.71	1,57
Soi B nA nD	41.44 ± 1.24	2,99	43.37 ± 0.01	0,02	44.98 ± 0.51	1,13
Soi nA nB nD	38.68 ± 3.76	9,72	38,64	NA	41.96 ± 1.73	4,12
Soi nA nB nD	42.02 ± 1.1	2,62	41.75 ± 1.74	4,17	42.54 ± 0.96	2,26
Tre A B D	49.13 ± 2.62	5,33	51.36 ± 2.72	5,3	53.96 ± 0.45	0,83
Tre A B nD	48.86 ± 2.63	5,38	48.72 ± 0.31	0,64	54.49 ± 3.18	5,84
Tre A D nB	50.18 ± 2.97	5,92	51 ± 2.91	5,71	54.45 ± 3.75	6,89
Tre D B nA	49.66 ± 3.17	6,38	49.8 ± 1.16	2,33	53.04 ± 2.66	5,02
Tre A nB nD	48.13 ± 1.46	3,03	51.5 ± 0.91	1,77	52.89 ± 1.82	3,44
Tre B nA nD	51.56 ± 1.41	2,73	52.16 ± 4.13	7,92	55.31 ± 2.56	4,63
Tre D nA nB	48.82 ± 1.7	3,48	54.53 ± 0.86	1,58	54.86 ± 0.51	0,93
Tre nA nB nD	47.64 ± 2.21	4,64	48.03 ± 0.55	1,15	52.87 ± 1.88	3,56

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Soi D nA nB	5	40.2109	0.690787	X
Soi A D nB	6	41.46	0.615189	XX
Soi D B nA	6	41.97	0.615189	XXX
Soi nA nB nD	6	42.1033	0.615189	XX
Soi A B D	6	42.25	0.615189	XXX
Soi A B nD	6	42.8167	0.615189	XXXX
Soi B nA nD	6	43.2633	0.615189	XXXX
Cro A B D	6	43.3133	0.615189	XXXXX
Soi A nB nD	6	43.9533	0.615189	XXXX
Cro D B nA	6	44.3633	0.615189	XXX
Cro A nB nD	6	44.41	0.615189	XXX
Cro D nA nB	6	44.5833	0.615189	XXX
Cro nA nB nD	6	45.0067	0.615189	XX
Cro A D nB	6	46.18	0.615189	XX
Cro A B nD	6	47.0167	0.615189	X
Cro B nA nD	6	47.67	0.615189	X
Tre nA nB nD	6	49.5133	0.615189	X
Tre A B nD	6	50.69	0.615189	XX
Tre D B nA	6	50.8333	0.615189	XX
Tre A nB nD	6	50.84	0.615189	XX
Tre A B D	6	51.4833	0.615189	XX
Tre A D nB	6	51.8767	0.615189	XX
Tre D nA nB	6	52.7367	0.615189	X
Tre B nA nD	6	53.01	0.615189	X

## ANNEXES - PS des lignées isogéniques waxy

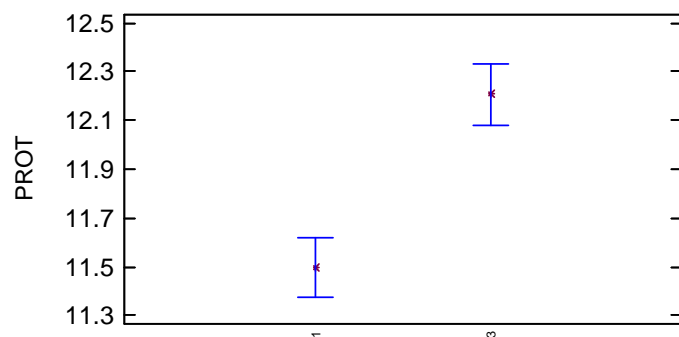
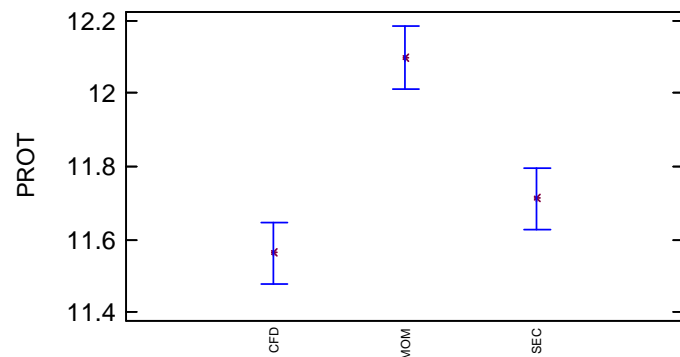
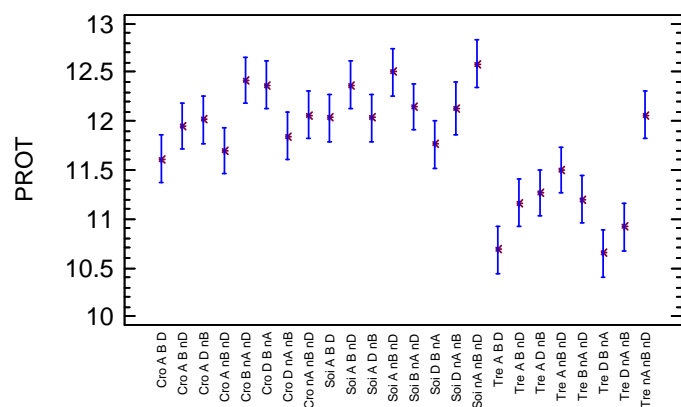


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	79.25 ± 0.71	0,9	80.75 ± 0.35	0,43	80.63 ± 0.18	0,22
<b>Cro A B nD</b>	80.88 ± 0.18	0,22	82 ± 0	0	81.13 ± 0.18	0,22
Cro A D nB	80.63 ± 0.53	0,66	81.38 ± 0.53	0,65	80.88 ± 0.53	0,66
Cro D B nA	80.63 ± 0.18	0,22	81.63 ± 0.18	0,22	81 ± 0.35	0,43
Cro A nB nD	80.13 ± 0.18	0,22	81.25 ± 0.35	0,43	81.13 ± 0.18	0,22
Cro B nA nD	81.63 ± 0.18	0,22	80.63 ± 0.53	0,66	80.75 ± 0.35	0,43
Cro D nA nB	80.25 ± 0	0	81.13 ± 0.18	0,22	80.13 ± 0.18	0,22
Cro nA nB nD	79.5 ± 0.71	0,89	80.75 ± 0.35	0,43	80 ± 0	0
Soi A B D	80.75 ± 0.71	0,88	80.88 ± 0.18	0,22	79.5 ± 0.71	0,89
Soi A B nD	81 ± 0.35	0,43	80.88 ± 0.18	0,22	79.88 ± 0.18	0,23
Soi A D nB	81 ± 0	0	81.5 ± 0.35	0,43	80 ± 0	0
Soi D B nA	81 ± 0	0	80.38 ± 0.18	0,22	79.75 ± 0	0
Soi A nB nD	81.25 ± 0.35	0,43	81.88 ± 0.18	0,22	80 ± 0	0
Soi B nA nD	80 ± 0	0	80.88 ± 0.18	0,22	79.38 ± 0.88	1,11
Soi D nA nB	81 ± 0	0	81,25	NA	80.13 ± 0.18	0,22
Soi nA nB nD	81.75 ± 0	0	80.88 ± 0.18	0,22	80 ± 0	0
Tre A B D	76.5 ± 0.71	0,93	78.13 ± 0.18	0,23	77.38 ± 0.88	1,14
Tre A B nD	77.13 ± 0.18	0,23	77.5 ± 0.71	0,92	77.88 ± 0.18	0,23
Tre A D nB	78 ± 0	0	77.75 ± 0.71	0,91	78.38 ± 0.53	0,68
<b>Tre D B nA</b>	77.38 ± 0.53	0,68	77.75 ± 1.41	1,81	76.88 ± 0.18	0,23
Tre A nB nD	77.63 ± 0.18	0,23	79.13 ± 0.18	0,23	77 ± 0	0
Tre B nA nD	77.88 ± 0.18	0,23	78.25 ± 0.35	0,45	77.75 ± 0	0
Tre D nA nB	77.75 ± 0.35	0,45	79.75 ± 0.35	0,44	77.5 ± 0.71	0,92
Tre nA nB nD	77.88 ± 0.18	0,23	78.38 ± 0.53	0,68	77.88 ± 0.18	0,23

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tre D B nA	6	77.3333	0.252484	X
Tre A B D	6	77.3333	0.252484	X
Tre A B nD	6	77.5	0.252484	X
Tre A nB nD	6	77.9167	0.252484	XX
Tre B nA nD	6	77.9583	0.252484	XX
Tre A D nB	6	78.0417	0.252484	XX
Tre nA nB nD	6	78.0417	0.252484	XX
Tre D nA nB	6	78.3333	0.252484	X
Soi B nA nD	6	80.0833	0.252484	X
Cro nA nB nD	6	80.0833	0.252484	X
Cro A B D	6	80.2083	0.252484	XX
Soi D B nA	6	80.375	0.252484	XXX
Soi A B D	6	80.375	0.252484	XXX
Cro D nA nB	6	80.5	0.252484	XXX
Soi A B nD	6	80.5833	0.252484	XXX
Soi D nA nB	5	80.7781	0.28351	XXXX
Soi A D nB	6	80.8333	0.252484	XXX
Cro A nB nD	6	80.8333	0.252484	XXX
Soi nA nB nD	6	80.875	0.252484	XXX
Cro A D nB	6	80.9583	0.252484	XX
Cro B nA nD	6	81.0	0.252484	XX
Soi A nB nD	6	81.0417	0.252484	XX
Cro D B nA	6	81.0833	0.252484	XX
Cro A B nD	6	81.3333	0.252484	X

## ANNEXES – Taux de protéines des lignées isogéniques waxy en %

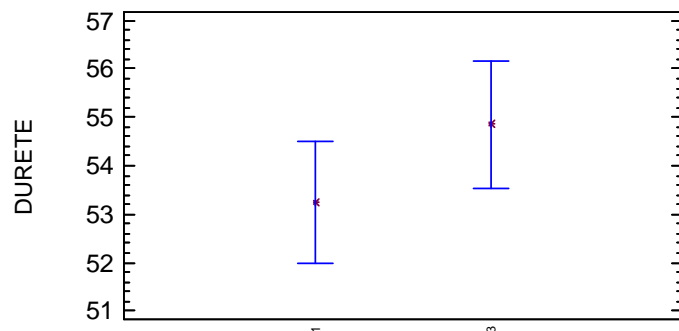
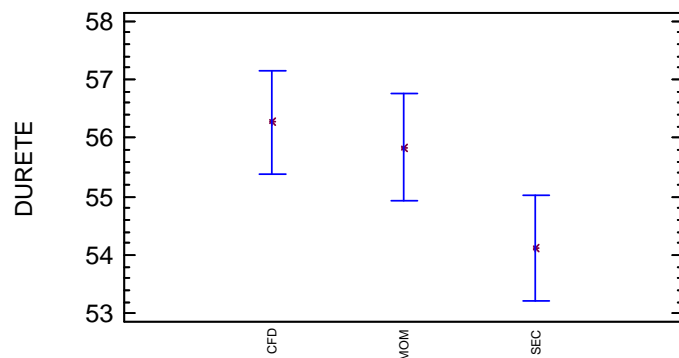
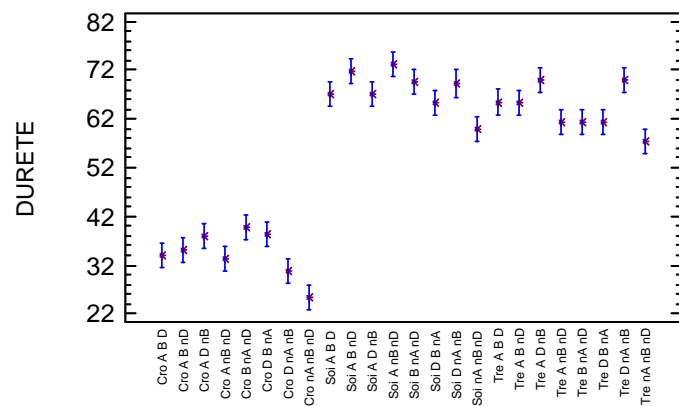


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	11.43 ± 0.14	1,22	11.18 ± 0.09	0,81	12.33 ± 0.27	2,19
Cro A B nD	11.63 ± 0.29	2,49	11.96 ± 0.02	0,17	12.28 ± 0.53	4,32
Cro A D nB	11.99 ± 0.43	3,59	12.33 ± 0.07	0,57	11.66 ± 0.85	7,29
Cro D B nA	12.36 ± 0.64	5,18	12.43 ± 0.19	1,53	12.29 ± 0.93	7,57
Cro A nB nD	11.37 ± 0.32	2,81	11.88 ± 0.55	4,63	11.88 ± 0.5	4,21
Cro B nA nD	12.13 ± 0.23	1,9	12.32 ± 0.95	7,71	12.73 ± 1.04	8,17
Cro D nA nB	11.7 ± 0.19	1,62	11.79 ± 0.46	3,9	12.05 ± 1.01	8,38
Cro nA nB nD	11.78 ± 0	0	12.15 ± 0.16	1,32	12.27 ± 0.62	5,05
Soi A B D	11.83 ± 0.22	1,86	12.41 ± 0.33	2,66	11.84 ± 0.31	2,62
Soi A B nD	11.94 ± 0.02	0,17	13.15 ± 0.01	0,08	12.02 ± 0.86	7,15
Soi A D nB	11.8 ± 0.26	2,2	12.42 ± 0.06	0,48	11.89 ± 0.78	6,56
Soi D B nA	11.78 ± 0.05	0,42	11.9 ± 0.03	0,25	11.65 ± 1	8,58
Soi A nB nD	12.52 ± 0.45	3,59	12.88 ± 0.44	3,42	12.14 ± 0.56	4,61
Soi B nA nD	12.09 ± 0.31	2,56	12.36 ± 0.64	5,18	11.96 ± 0.28	2,34
Soi D nA nB	11.75 ± 0.24	2,04	12,98	NA	11.9 ± 0.51	4,29
<b>Soi nA nB nD</b>	<b>12.34 ± 0.08</b>	<b>0,65</b>	<b>13.1 ± 0.31</b>	<b>2,37</b>	<b>12.33 ± 0.99</b>	<b>8,03</b>
Tre A B D	10.24 ± 0.4	3,91	11.26 ± 0.39	3,46	10.57 ± 0.32	3,03
Tre A B nD	10.45 ± 0.02	0,19	12.45 ± 0.12	0,96	10.6 ± 0.28	2,64
Tre A D nB	11.33 ± 0.63	5,56	11.7 ± 0.92	7,86	10.73 ± 0.59	5,5
<b>Tre D B nA</b>	<b>10.37 ± 0.27</b>	<b>2,6</b>	<b>10.84 ± 0.34</b>	<b>3,14</b>	<b>10.71 ± 1.13</b>	<b>10,55</b>
Tre A nB nD	11.26 ± 0.14	1,24	11.61 ± 0.01	0,09	11.6 ± 0.82	7,07
Tre B nA nD	10.75 ± 0.17	1,58	11.6 ± 0.6	5,17	11.24 ± 0.23	2,05
Tre D nA nB	10.65 ± 0.22	2,07	11.3 ± 0.1	0,88	10.78 ± 0.59	5,47
Tre nA nB nD	11.96 ± 0.36	3,01	12.47 ± 0.12	0,96	11.79 ± 0.77	6,53

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tre D B nA	6	10.65	0.171355	X
Tre A B D	6	10.6833	0.171355	X
Tre D nA nB	6	10.9167	0.171355	XX
Tre A B nD	6	11.1667	0.171355	XX
Tre B nA nD	6	11.2	0.171355	XX
Tre A D nB	6	11.2667	0.171355	XXX
Tre A nB nD	6	11.5	0.171355	XXX
Cro A B D	6	11.6167	0.171355	XXXX
Cro A nB nD	6	11.7	0.171355	XXXX
Soi D B nA	6	11.7667	0.171355	XXX
Cro D nA nB	6	11.85	0.171355	XXX
Cro A B nD	6	11.95	0.171355	XXXX
Cro A D nB	6	12.0167	0.171355	XXX
Soi A D nB	6	12.0333	0.171355	XXXX
Soi A B D	6	12.0333	0.171355	XXXX
Tre nA nB nD	6	12.0667	0.171355	XXXX
Cro nA nB nD	6	12.0667	0.171355	XXXX
Soi D nA nB	5	12.1275	0.192412	XXXXX
Soi B nA nD	6	12.15	0.171355	XXXX
Cro D B nA	6	12.3667	0.171355	XXX
Soi A B nD	6	12.3667	0.171355	XXX
Cro B nA nD	6	12.4167	0.171355	XXX
Soi A nB nD	6	12.5	0.171355	XX
Soi nA nB nD	6	12.5833	0.171355	X

## ANNEXES – Dureté des lignées isogéniques waxy



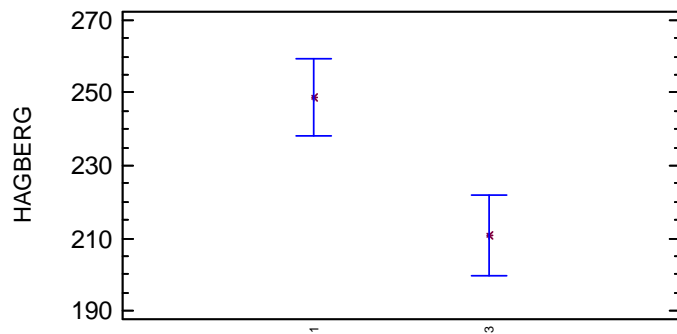
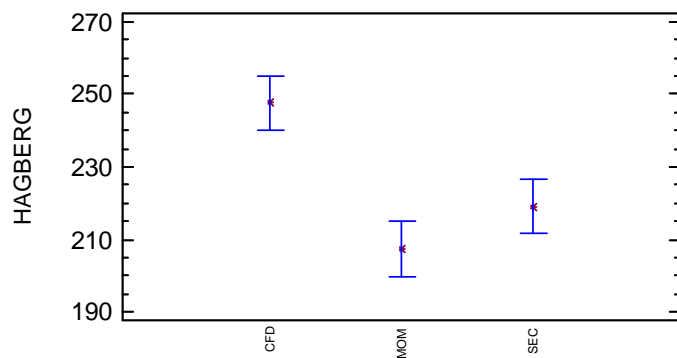
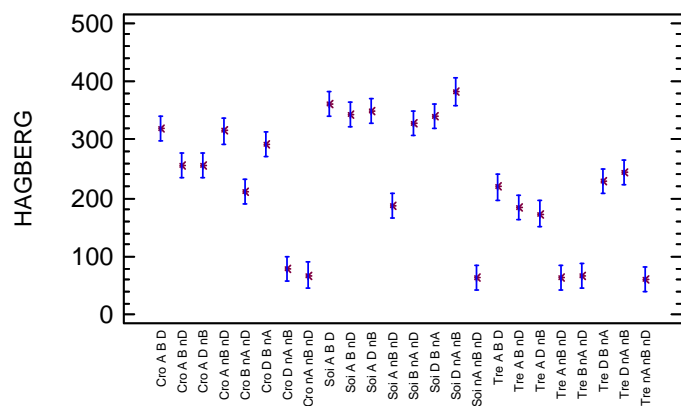
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	33.75 ± 9.95	29,48	32.57 ± 0.17	0,52	34.88 ± 4.22	12,1
Cro A B nD	31.31 ± 5.06	16,16	38.87 ± 2.02	5,2	35.14 ± 4.33	12,32
Cro A D nB	35.97 ± 7.88	21,91	41.65 ± 0.85	2,04	35.83 ± 5.52	15,41
Cro D B nA	35.59 ± 6.91	19,42	42.47 ± 1.7	4	36.4 ± 4.8	13,19
Cro A nB nD	30.01 ± 10.67	35,55	36.13 ± 0.98	2,71	33.96 ± 0.12	0,35
Cro B nA nD	39.42 ± 2.93	7,43	41.65 ± 2.86	6,87	37.91 ± 1.35	3,56
Cro D nA nB	28.33 ± 1.2	4,24	32.6 ± 0.78	2,39	31.16 ± 2.22	7,12
<b>Cro nA nB nD</b>	<b>23.36 ± 3.16</b>	<b>13,53</b>	<b>30.26 ± 0.29</b>	<b>0,96</b>	<b>22.23 ± 7.53</b>	<b>33,87</b>
Soi A B D	72.53 ± 5.54	7,64	63.48 ± 3.14	4,95	65.1 ± 2.72	4,18
Soi A B nD	69.09 ± 3.29	4,76	73.23 ± 0.84	1,15	72.97 ± 1.46	2
Soi A D nB	72.16 ± 3.47	4,81	65.51 ± 0.76	1,16	63.22 ± 4.72	7,47
Soi A nB nD	70.93 ± 2.79	3,93	63.62 ± 0.17	0,27	61.79 ± 6.46	10,45
<b>Soi A nB nD</b>	<b>75.52 ± 0.99</b>	<b>1,31</b>	<b>73.15 ± 1.96</b>	<b>2,68</b>	<b>71.16 ± 3.84</b>	<b>5,4</b>
Soi B nA nD	70.11 ± 3.9	5,56	67.88 ± 2.98	4,39	71.02 ± 1.13	1,59
Soi D B nA	71.12 ± 9.09	12,78	69,04	NA	68 ± 1.45	2,13
Soi nA nB nD	60.03 ± 5.03	8,38	58.67 ± 5.44	9,27	60.9 ± 4.71	7,73
Tre A B D	67.86 ± 3.27	4,82	65.13 ± 1.36	2,09	63.61 ± 4	6,29
Tre A B nD	63.84 ± 0.43	0,67	68.73 ± 2.6	3,78	63.25 ± 1.18	1,87
Tre A D nB	75.34 ± 9.14	12,13	67.97 ± 5.1	7,5	66.21 ± 0.96	1,45
Tre D B nA	69.98 ± 0.61	0,87	50.98 ± 11.44	22,44	63.3 ± 4.39	6,94
Tre A nB nD	63.37 ± 6.28	9,91	63.61 ± 4.56	7,17	57.79 ± 0.59	1,02
Tre B nA nD	60.15 ± 0.22	0,37	61.68 ± 1.22	1,98	61.83 ± 4.66	7,54
Tre D nA nB	69.9 ± 2.82	4,03	71.48 ± 2.77	3,88	69.03 ± 4.57	6,62
<b>Tre nA nB nD</b>	<b>60.23 ± 6.75</b>	<b>11,21</b>	<b>59.99 ± 2.39</b>	<b>3,98</b>	<b>52.39 ± 1.49</b>	<b>2,84</b>

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Cro nA nB nD	6	25.3333	1.7964	X
Cro D nA nB	6	30.6667	1.7964	X
Cro A nB nD	6	33.3333	1.7964	XX
Cro A B D	6	33.8333	1.7964	XX
Cro A B nD	6	35.0	1.7964	XXX
Cro A D nB	6	37.8333	1.7964	XX
Cro D B nA	6	38.1667	1.7964	XX
Cro B nA nD	6	39.6667	1.7964	X
Tre nA nB nD	6	57.3333	1.7964	X
Soi nA nB nD	6	60.0	1.7964	X
Tre D B nA	6	61.3333	1.7964	XX
Tre B nA nD	6	61.3333	1.7964	XX
Tre A nB nD	6	61.5	1.7964	XX
Soi D B nA	6	65.3333	1.7964	XX
Tre A B nD	6	65.3333	1.7964	XX
Tre A B D	6	65.5	1.7964	XX
Soi A B D	6	67.0	1.7964	XX
Soi A D nB	6	67.1667	1.7964	XX
Soi D nA nB	5	69.2174	2.01715	XXX
Soi B nA nD	6	69.6667	1.7964	XXX
Tre A D nB	6	70.0	1.7964	XXX
Tre D nA nB	6	70.1667	1.7964	XXX
Soi A B nD	6	71.8333	1.7964	XX
Soi A nB nD	6	73.3333	1.7964	X



## ANNEXES – Temps de chute de Hagberg des lignées isogéniques waxy en secondes

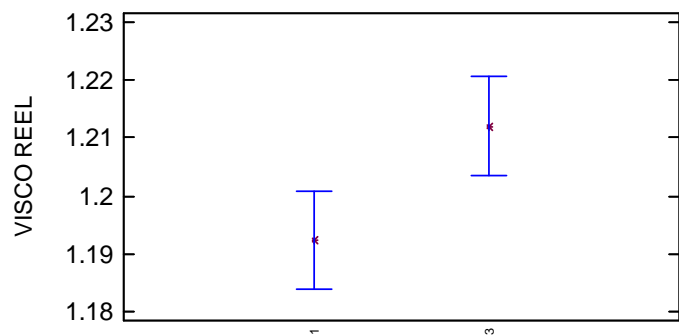
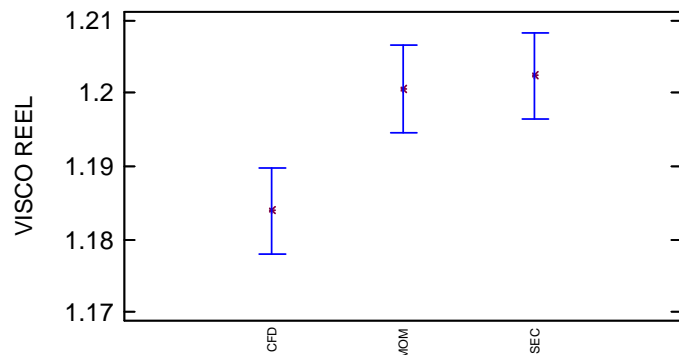
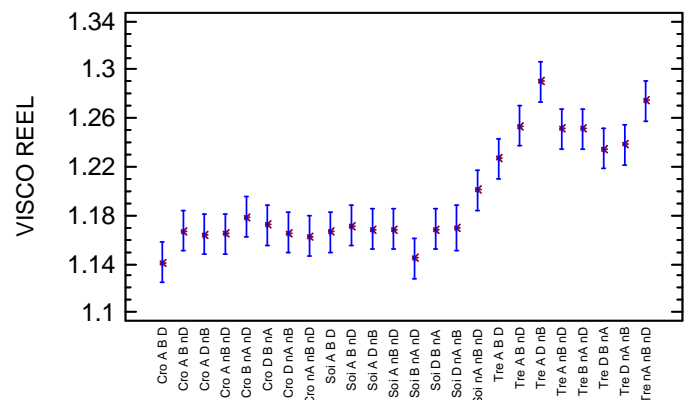


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	331.5 ± 23.33	7,04	340.5 ± 16.26	4,78	287 ± 11.31	3,94
Cro A B nD	264 ± 19.8	7,5	251 ± 4.24	1,69	255 ± 16.97	6,65
Cro A D nB	258 ± 4.24	1,64	250 ± 9.9	3,96	262 ± 0	0
Cro D B nA	318.5 ± 14.85	4,66	268 ± 8.49	3,17	289 ± 1.41	0,49
Cro A nB nD	327 ± 32.53	9,95	320 ± 46.67	14,58	296.5 ± 0.71	0,24
Cro B nA nD	236.5 ± 26.16	11,06	228.5 ± 3.54	1,55	164.5 ± 13.44	8,17
Cro D nA nB	90 ± 4.24	4,71	76.5 ± 2.12	2,77	73 ± 2.83	3,88
Cro nA nB nD	71.5 ± 0.71	0,99	69 ± 0	0	65 ± 0	0
Soi A B D	373.5 ± 4.95	1,33	345.5 ± 12.02	3,48	367.5 ± 30.41	8,27
Soi A B nD	369.5 ± 2.12	0,57	259.5 ± 4.95	1,91	398.5 ± 20.51	5,15
Soi A D nB	353.5 ± 3.54	1	313.5 ± 3.54	1,13	376.5 ± 3.54	0,94
Soi D B nA	342.5 ± 20.51	5,99	304.5 ± 28.99	9,52	372.5 ± 13.44	3,61
Soi A nB nD	192.5 ± 77.07	40,04	154 ± 15.56	10,1	215.5 ± 57.28	26,58
Soi B nA nD	346 ± 12.73	3,68	293.5 ± 10.61	3,61	344 ± 14.14	4,11
<b>Soi D nA nB</b>	<b>387 ± 7.07</b>	<b>1,83</b>	<b>326</b>	<b>NA</b>	<b>413 ± 35.36</b>	<b>8,56</b>
Soi nA nB nD	65 ± 0	0	64 ± 0	0	65.5 ± 0.71	1,08
Tre A B D	284.5 ± 23.33	8,2	191.5 ± 7.78	4,06	179.5 ± 26.16	14,57
Tre A B nD	249.5 ± 7.78	3,12	138 ± 0	0	162 ± 12.73	7,86
Tre A D nB	233 ± 16.97	7,28	146.5 ± 24.75	16,89	141 ± 33.94	24,07
Tre D B nA	318.5 ± 6.36	2	201 ± 18.38	9,14	167.5 ± 14.85	8,87
Tre A nB nD	66 ± 2.83	4,29	65 ± 1.41	2,17	64 ± 0	0
Tre B nA nD	70 ± 2.83	4,04	63.5 ± 0.71	1,12	63.5 ± 0.71	1,12
Tre D nA nB	330.5 ± 41.72	12,62	227 ± 7.07	3,11	172 ± 24.04	13,98
<b>Tre nA nB nD</b>	<b>63 ± 0</b>	<b>0</b>	<b>62 ± 0</b>	<b>0</b>	<b>62 ± 0</b>	<b>0</b>

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tre nA nB nD	6	62.3333	15.003	X
Soi nA nB nD	6	64.8333	15.003	X
Tre A nB nD	6	65.0	15.003	X
Tre B nA nD	6	65.6667	15.003	X
Cro nA nB nD	6	68.5	15.003	X
Cro D nA nB	6	79.8333	15.003	X
Tre A D nB	6	173.5	15.003	X
Tre A B nD	6	183.167	15.003	XX
Soi A nB nD	6	187.333	15.003	XXX
Cro B nA nD	6	209.833	15.003	XXXX
Tre A B D	6	218.5	15.003	XXXXX
Tre D B nA	6	229.0	15.003	XXX
Tre D nA nB	6	243.167	15.003	XX
Cro A D nB	6	256.667	15.003	XX
Cro A B nD	6	256.667	15.003	XX
Cro D B nA	6	291.833	15.003	XX
Cro A nB nD	6	314.5	15.003	XX
Cro A B D	6	319.667	15.003	XX
Soi B nA nD	6	327.833	15.003	XXX
Soi D B nA	6	339.833	15.003	XXX
Soi A B nD	6	342.5	15.003	XXX
Soi A D nB	6	347.833	15.003	XXX
Soi A B D	6	362.167	15.003	XX
Soi D nA nB	5	382.283	16.8466	X

## ANNEXES – Viscosité réelle des lignées isogéniques waxy

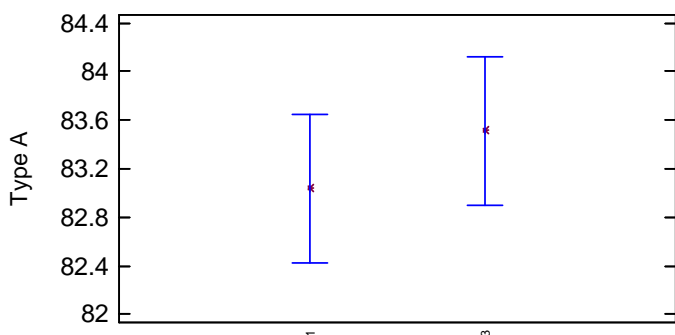
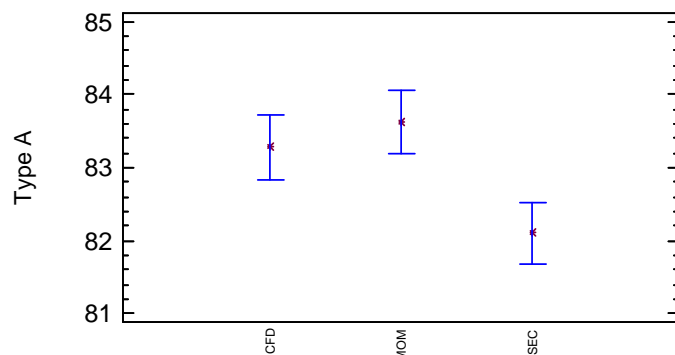
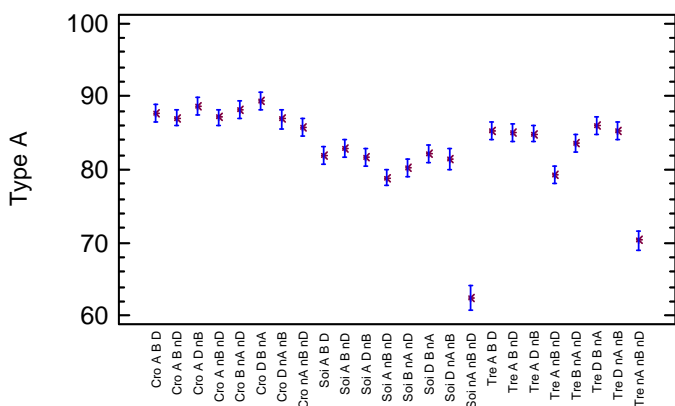


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
<b>Cro A B D</b>	1.13 ± 0.02	1,77	1.15 ± 0.02	1,74	1.15 ± 0	0
Cro A B nD	1.16 ± 0.01	0,86	1.15 ± 0	0	1.19 ± 0.01	0,84
Cro A D nB	1.16 ± 0.01	0,86	1.134 ± 0	0	1.2 ± 0	0
Cro D B nA	1.18 ± 0.01	0,85	1.14 ± 0.01	0,88	1.19 ± 0	0
Cro A nB nD	1.17 ± 0.01	0,85	1.14 ± 0.01	0,88	1.19 ± 0	0
Cro B nA nD	1.19 ± 0.03	2,52	1.16 ± 0.01	0,86	1.19 ± 0	0
Cro D nA nB	1.15 ± 0.03	2,61	1.18 ± 0.04	3,39	1.17 ± 0.02	1,71
Cro nA nB nD	1.15 ± 0.02	1,74	1.15 ± 0.04	3,48	1.19 ± 0.01	0,84
Soi A B D	1.16 ± 0	0	1.17 ± 0.01	0,85	1.17 ± 0.02	1,71
Soi A B nD	1.17 ± 0.04	3,42	1.17 ± 0.01	0,85	1.18 ± 0.05	4,24
Soi A D nB	1.16 ± 0	0	1.17 ± 0.01	0,85	1.17 ± 0.02	1,71
Soi D B nA	1.16 ± 0.01	0,86	1.18 ± 0.01	0,85	1.16 ± 0.01	0,86
Soi A nB nD	1.17 ± 0.03	2,56	1.16 ± 0.01	0,86	1.17 ± 0.03	2,56
Soi B nA nD	1.14 ± 0.01	0,88	1.15 ± 0.01	0,87	1.15 ± 0.02	1,74
Soi D nA nB	1.16 ± 0.02	1,72	1,16	NA	1.17 ± 0.01	0,85
Soi nA nB nD	1.21 ± 0.03	2,48	1.19 ± 0.02	1,68	1.2 ± 0.02	1,67
Tre A B D	1.2 ± 0.02	1,67	1.26 ± 0.02	1,59	1.22 ± 0.03	2,46
Tre A B nD	1.22 ± 0.03	2,46	1.27 ± 0.03	2,36	1.27 ± 0.02	1,57
<b>Tre A D nB</b>	1.26 ± 0.01	0,79	1.33 ± 0.07	5,26	1.28 ± 0.04	3,13
Tre D B nA	1.2 ± 0	0	1.21 ± 0.01	0,83	1.29 ± 0.02	1,55
Tre A nB nD	1.22 ± 0.02	1,64	1.29 ± 0.03	2,33	1.24 ± 0.1	8,06
Tre B nA nD	1.23 ± 0.03	2,44	1.28 ± 0.03	2,34	1.25 ± 0.02	1,6
Tre D nA nB	1.23 ± 0.02	1,63	1.27 ± 0.03	2,36	1.21 ± 0.03	2,48
Tre nA nB nD	1.25 ± 0.04	3,2	1.32 ± 0.02	1,52	1.25 ± 0.06	4,8

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Cro A B D	6	1.14133	0.0118485	X
Soi B nA nD	6	1.14467	0.0118485	X
Cro nA nB nD	6	1.1625	0.0118485	XX
Cro A D nB	6	1.16417	0.0118485	XX
Cro A nB nD	6	1.16483	0.0118485	XX
Cro D nA nB	6	1.16567	0.0118485	XX
Soi A B D	6	1.16617	0.0118485	XX
Cro A B nD	6	1.16717	0.0118485	XX
Soi A D nB	6	1.16867	0.0118485	XXX
Soi D B nA	6	1.16883	0.0118485	XXX
Soi A nB nD	6	1.16883	0.0118485	XXX
Soi D nA nB	5	1.16999	0.0133045	XXX
Soi A B nD	6	1.17117	0.0118485	XXX
Cro D B nA	6	1.17233	0.0118485	XXX
Cro B nA nD	6	1.1785	0.0118485	XX
Soi nA nB nD	6	1.20067	0.0118485	XX
Tre A B D	6	1.22683	0.0118485	XX
Tre D B nA	6	1.23467	0.0118485	X
Tre D nA nB	6	1.23817	0.0118485	X
Tre B nA nD	6	1.251	0.0118485	XX
Tre A nB nD	6	1.2515	0.0118485	XX
Tre A B nD	6	1.25333	0.0118485	XX
Tre nA nB nD	6	1.2745	0.0118485	XX
Tre A D nB	6	1.29017	0.0118485	X

## ANNEXES – Proportion de granules de type A des lignées isogéniques waxy en %

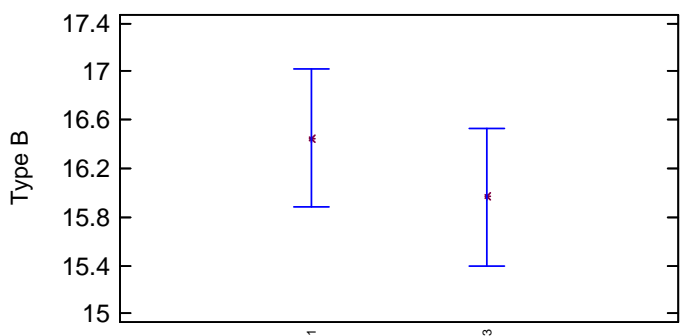
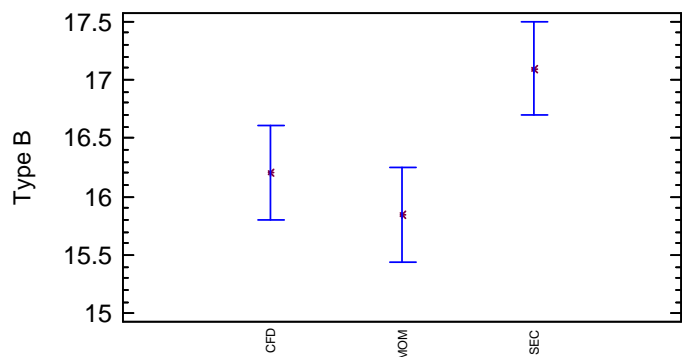
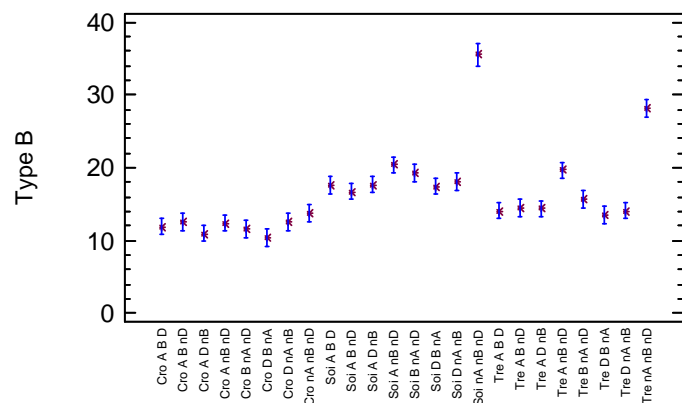


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	88.17 ± 3.05	3,46	88.22 ± 0.68	0,77	86.76 ± 0.59	0,68
Cro A B nD	87.06 ± 2.74	3,15	87.7 ± 0.82	0,94	86.45 ± 3.79	4,38
Cro A D nB	87.51 ± 1.3	1,49	89.48 ± 1.95	2,18	89.05 ± 1.01	1,13
<b>Cro D B nA</b>	<b>88.56 ± 2.49</b>	<b>2,81</b>	<b>89.4 ± 0.62</b>	<b>0,69</b>	<b>89.95 ± 1.32</b>	<b>1,47</b>
Cro A nB nD	86.71 ± 2.49	2,87	87.99 ± 0.03	0,03	86.55 ± 4.08	4,71
Cro B nA nD	88.91 ± 0.66	0,74	88.7 ± 0.3	0,34	86.59 ± 2.57	2,97
Cro D nA nB	86.59 ± 2.38	2,75	88.4 ± 0.73	0,83	87,04	NA
Cro nA nB nD	84.69 ± 1.51	1,78	86.45 ± 1.8	2,08	85.95 ± 1.42	1,65
Soi A B D	82.95 ± 0.4	0,48	82.14 ± 1.03	1,25	80.59 ± 1.29	1,6
Soi A B nD	82.21 ± 0.24	0,29	83.58 ± 0.89	1,06	82.68 ± 3.69	4,46
Soi A D nB	82.45 ± 1.17	1,42	81.63 ± 0.4	0,49	81.23 ± 3.06	3,77
Soi D B nA	82.62 ± 0.65	0,79	82.44 ± 0.81	0,98	81.37 ± 1.42	1,75
Soi A nB nD	80.35 ± 2.21	2,75	79.94 ± 3.07	3,84	76.44 ± 4.75	6,21
Soi B nA nD	79.73 ± 4.55	5,71	80.82 ± 1.25	1,55	80.1 ± 3.84	4,79
Soi D nA nB	81.83 ± 0.53	0,65	80,89	NA	80.74 ± 1.99	2,46
<b>Soi nA nB nD</b>	<b>65,7</b>	<b>NA</b>	<b>59,71</b>	<b>NA</b>	<b>61.29 ± 0.28</b>	<b>0,46</b>
Tre A B D	85.64 ± 2.13	2,49	85.87 ± 1.1	1,28	84.46 ± 1.46	1,73
Tre A B nD	84.49 ± 0.65	0,77	86.52 ± 1.17	1,35	83.79 ± 3.43	4,09
Tre A D nB	85.93 ± 1.06	1,23	85.09 ± 0.71	0,83	83.72 ± 1.49	1,78
Tre D B nA	86.3 ± 1.23	1,43	87.46 ± 2.14	2,45	84.05 ± 0.91	1,08
Tre A nB nD	80.93 ± 4.66	5,76	82.18 ± 0.64	0,78	74.62 ± 6.02	8,07
Tre B nA nD	85.36 ± 0.19	0,22	84.26 ± 1.74	2,07	81.5 ± 3.51	4,31
Tre D nA nB	84.25 ± 1.32	1,57	86.14 ± 0.48	0,56	85.7 ± 0.61	0,71
Tre nA nB nD	71,65	NA	68.95 ± 3.99	5,79	71.28 ± 4.39	6,16

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Soi nA nB nD	4	62.5764	1.2064	X
Tre nA nB nD	5	70.3391	0.947226	X
Soi A nB nD	6	78.9117	0.843524	X
Tre A nB nD	6	79.2433	0.843524	X
Soi B nA nD	6	80.2183	0.843524	XX
Soi D nA nB	5	81.4317	0.947226	XXX
Soi A D nB	6	81.7683	0.843524	XX
Soi A B D	6	81.8933	0.843524	XX
Soi D B nA	6	82.1433	0.843524	XX
Soi A B nD	6	82.8233	0.843524	XX
Tre B nA nD	6	83.705	0.843524	XXX
Tre A D nB	6	84.91	0.843524	XXX
Tre A B nD	6	84.9367	0.843524	XXX
Tre A B D	6	85.3183	0.843524	XX
Tre D nA nB	6	85.3633	0.843524	XXX
Cro nA nB nD	6	85.7	0.843524	XXXX
Tre D B nA	6	85.9383	0.843524	XXXX
Cro D nA nB	5	86.8793	0.947365	XXXX
Cro A B nD	6	87.0683	0.843524	XXXX
Cro A nB nD	6	87.085	0.843524	XXXX
Cro A B D	6	87.7183	0.843524	XXX
Cro B nA nD	6	88.065	0.843524	XX
Cro A D nB	6	88.6817	0.843524	X
Cro D B nA	6	89.305	0.843524	X

## ANNEXES – Proportion de granules de type B des lignées isogéniques waxy en %

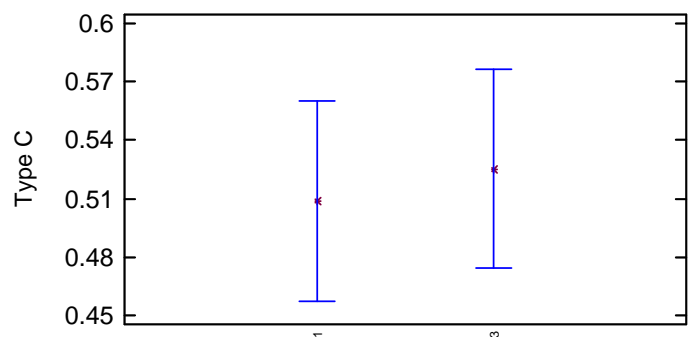
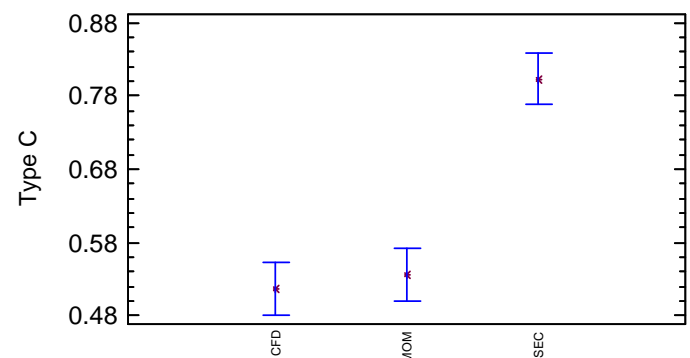
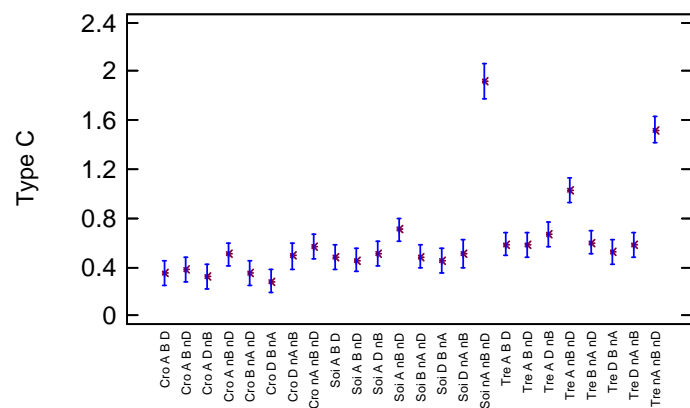


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	11.56 ± 2.83	24,48	11.51 ± 0.61	5,3	12.72 ± 0.59	4,64
Cro A B nD	12.6 ± 2.53	20,08	12.02 ± 0.75	6,24	13.02 ± 3.59	27,57
Cro A D nB	12.27 ± 1.25	10,19	10.2 ± 1.73	16,96	10.5 ± 0.86	8,19
<b>Cro D B nA</b>	11.16 ± 2.36	21,15	10.41 ± 0.59	5,67	9.66 ± 1.28	13,25
Cro A nB nD	12.82 ± 2.35	18,33	11.66 ± 0.02	0,17	12.76 ± 3.88	30,41
Cro B nA nD	10.89 ± 0.62	5,69	11.02 ± 0.34	3,09	12.83 ± 2.35	18,32
Cro D nA nB	12.98 ± 2.29	17,64	11.27 ± 0.69	6,12	12,37	NA
Cro nA nB nD	14.88 ± 1.35	9,07	13.08 ± 1.46	11,16	13.25 ± 1.47	11,09
Soi A B D	16.69 ± 0.37	2,22	17.48 ± 1.02	5,84	18.7 ± 1.16	6,2
Soi A B nD	17.35 ± 0.29	1,67	16.07 ± 0.8	4,98	16.74 ± 3.46	20,67
Soi A D nB	17.12 ± 1.09	6,37	17.89 ± 0.41	2,29	18.16 ± 2.84	15,64
Soi D B nA	17.02 ± 0.63	3,7	17.21 ± 0.78	4,53	18.01 ± 1.22	6,77
Soi A nB nD	19.12 ± 2.14	11,19	19.38 ± 2.97	15,33	22.65 ± 4.5	19,87
Soi B nA nD	19.77 ± 4.29	21,7	18.73 ± 1.2	6,41	19.38 ± 3.65	18,83
Soi D nA nB	17.71 ± 0.46	2,6	18,69	NA	18.6 ± 1.79	9,62
<b>Soi nA nB nD</b>	32,89	NA	37,97	NA	36.59 ± 0.21	0,57
Tre A B D	13.9 ± 1.96	14,1	13.61 ± 1.03	7,57	14.78 ± 1.19	8,05
Tre A B nD	14.87 ± 0.78	5,25	13.1 ± 1.19	9,08	15.47 ± 3.1	20,04
Tre A D nB	13.59 ± 1.03	7,58	14.28 ± 0.64	4,48	15.4 ± 1.1	7,14
Tre D B nA	13.24 ± 1.15	8,69	12.1 ± 2.05	16,94	15.3 ± 0.77	5,03
Tre A nB nD	18.26 ± 4.48	24,53	17.12 ± 0.72	4,21	23.81 ± 5.35	22,47
Tre B nA nD	14.21 ± 0.44	3,1	15.24 ± 1.6	10,5	17.62 ± 3.31	18,79
Tre D nA nB	15.14 ± 1.22	8,06	13.43 ± 0.43	3,2	13.6 ± 0.45	3,31
Tre nA nB nD	27,23	NA	29.42 ± 4.17	14,17	27 ± 3.88	14,37

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Cro D B nA	6	10.4133	0.78816	X
Cro A D nB	6	10.99	0.78816	X
Cro B nA nD	6	11.58	0.78816	XX
Cro A B D	6	11.9333	0.78816	XXX
Cro A nB nD	6	12.415	0.78816	XXXX
Cro A B nD	6	12.545	0.78816	XXXX
Cro D nA nB	5	12.6336	0.885186	XXXX
Tre D B nA	6	13.5433	0.78816	XXXX
Cro nA nB nD	6	13.735	0.78816	XXXX
Tre D nA nB	6	14.0533	0.78816	XXX
Tre A B D	6	14.0933	0.78816	XXX
Tre A D nB	6	14.425	0.78816	XX
Tre A B nD	6	14.4817	0.78816	XX
Tre B nA nD	6	15.6917	0.78816	XX
Soi A B nD	6	16.7183	0.78816	XX
Soi D B nA	6	17.415	0.78816	XXX
Soi A B D	6	17.6233	0.78816	XXXX
Soi A D nB	6	17.72	0.78816	XXXX
Soi D nA nB	5	18.0577	0.885056	XXXX
Soi B nA nD	6	19.295	0.78816	XXX
Tre A nB nD	6	19.7283	0.78816	XX
Soi A nB nD	6	20.3833	0.78816	X
Tre nA nB nD	5	28.1362	0.885056	X
Soi nA nB nD	4	35.5044	1.12722	

ANNEXES – Proportion de granules de type C des lignées isogéniques waxy en %

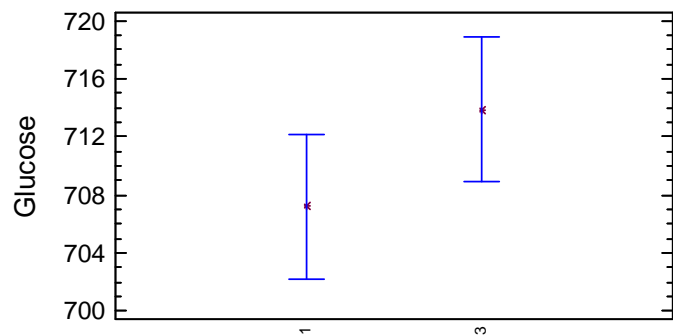
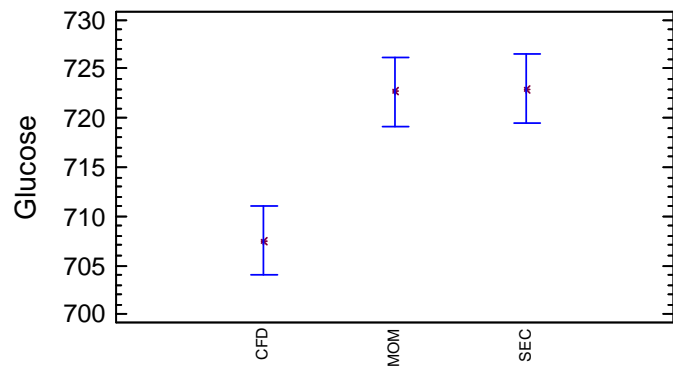
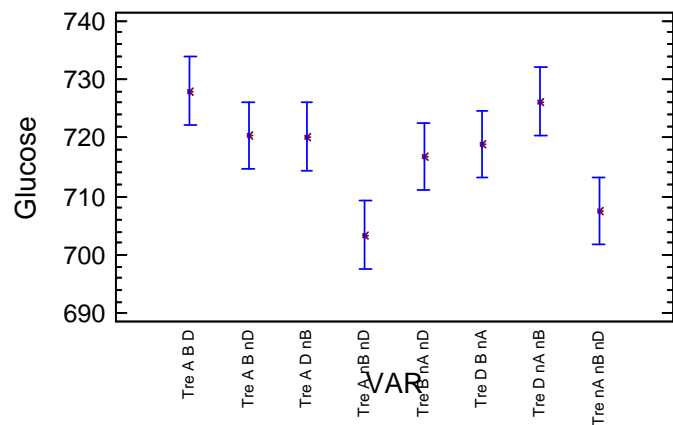


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	0.27 ± 0.22	81,48	0.26 ± 0.07	26,92	0.52 ± 0	0
Cro A B nD	0.34 ± 0.21	61,76	0.28 ± 0.07	25	0.53 ± 0.2	37,74
Cro A D nB	0.22 ± 0.05	22,73	0.31 ± 0.22	70,97	0.45 ± 0.15	33,33
<b>Cro D B nA</b>	0.27 ± 0.13	48,15	0.19 ± 0.02	10,53	0.39 ± 0.04	10,26
Cro A nB nD	0.47 ± 0.14	29,79	0.35 ± 0	0	0.69 ± 0.2	28,99
Cro B nA nD	0.2 ± 0.03	15	0.28 ± 0.04	14,29	0.58 ± 0.22	37,93
Cro D nA nB	0.43 ± 0.08	18,6	0.34 ± 0.04	11,76	0,6	NA
Cro nA nB nD	0.43 ± 0.16	37,21	0.47 ± 0.34	72,34	0.79 ± 0.05	6,33
Soi A B D	0.36 ± 0.03	8,33	0.38 ± 0.01	2,63	0.71 ± 0.13	18,31
Soi A B nD	0.44 ± 0.05	11,36	0.35 ± 0.09	25,71	0.58 ± 0.23	39,66
Soi A D nB	0.43 ± 0.07	16,28	0.48 ± 0.02	4,17	0.62 ± 0.22	35,48
Soi D B nA	0.36 ± 0.02	5,56	0.35 ± 0.03	8,57	0.62 ± 0.2	32,26
Soi A nB nD	0.53 ± 0.07	13,21	0.67 ± 0.1	14,93	0.91 ± 0.25	27,47
Soi B nA nD	0.5 ± 0.26	52	0.45 ± 0.04	8,89	0.51 ± 0.19	37,25
Soi D nA nB	0.46 ± 0.07	15,22	0,42	NA	0.65 ± 0.2	30,77
<b>Soi nA nB nD</b>	1,42	NA	2,32	NA	2.12 ± 0.07	3,3
Tre A B D	0.47 ± 0.17	36,17	0.52 ± 0.07	13,46	0.77 ± 0.28	36,36
Tre A B nD	0.64 ± 0.13	20,31	0.38 ± 0.02	5,26	0.74 ± 0.32	43,24
Tre A D nB	0.48 ± 0.03	6,25	0.63 ± 0.08	12,7	0.89 ± 0.39	43,82
Tre D B nA	0.46 ± 0.09	19,57	0.44 ± 0.09	20,45	0.65 ± 0.15	23,08
Tre A nB nD	0.81 ± 0.19	23,46	0.7 ± 0.08	11,43	1.57 ± 0.67	42,68
Tre B nA nD	0.44 ± 0.25	56,82	0.5 ± 0.14	28	0.87 ± 0.2	22,99
Tre D nA nB	0.61 ± 0.1	16,39	0.43 ± 0.05	11,63	0.7 ± 0.16	22,86
Tre nA nB nD	1,12	NA	1.63 ± 0.19	11,66	1.71 ± 0.51	29,82

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Cro D B nA	6	0.285	0.0703568	X
Cro A D nB	6	0.326667	0.0703568	XX
Cro A B D	6	0.35	0.0703568	XX
Cro B nA nD	6	0.353333	0.0703568	XX
Cro A B nD	6	0.383333	0.0703568	XXX
Soi D B nA	6	0.446667	0.0703568	XXXX
Soi A B nD	6	0.458333	0.0703568	XXXX
Soi A B D	6	0.483333	0.0703568	XXXX
Soi B nA nD	6	0.486667	0.0703568	XXXX
Cro D nA nB	5	0.488674	0.079018	XXXXX
Cro A nB nD	6	0.503333	0.0703568	XXXX
Soi D nA nB	5	0.507853	0.0790064	XXXXXX
Soi A D nB	6	0.51	0.0703568	XXXXXX
Tre D B nA	6	0.52	0.0703568	XXXXXX
Cro nA nB nD	6	0.565	0.0703568	XXXX
Tre D nA nB	6	0.578333	0.0703568	XXXX
Tre A B nD	6	0.585	0.0703568	XXX
Tre A B D	6	0.586667	0.0703568	XXX
Tre B nA nD	6	0.601667	0.0703568	XXX
Tre A D nB	6	0.665	0.0703568	XX
Soi A nB nD	6	0.705	0.0703568	X
Tre A nB nD	6	1.02667	0.0703568	X
Tre nA nB nD	5	1.52374	0.0790064	X
Soi nA nB nD	4	1.92098	0.100624	X

ANNEXES – Rendement en glucose des lignées isogéniques waxy de la variété Trémie en kg/t

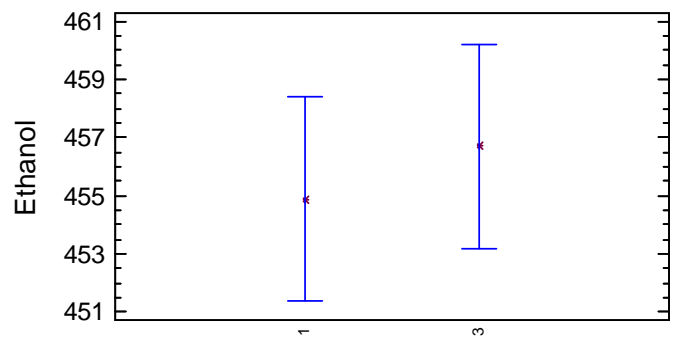
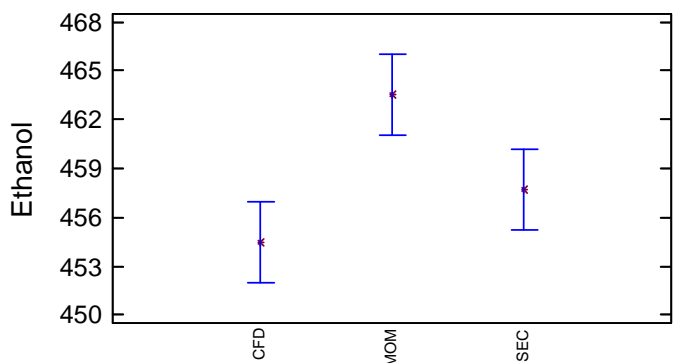
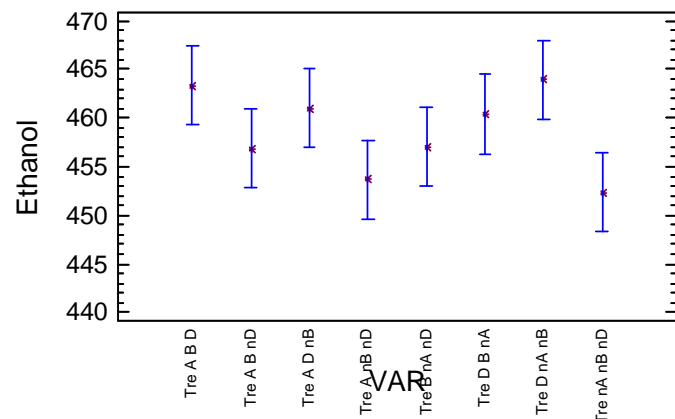


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
<b>Tre A B D</b>	719.2 ± 6.14	0,85	732.5 ± 19.62	2,68	732.43 ± 3.99	0,54
Tre A B nD	713.27 ± 0.52	0,07	715.53 ± 11.04	1,54	732.38 ± 3	0,41
Tre A D nB	703.89 ± 4.68	0,66	731.46 ± 18.66	2,55	725.21 ± 5.63	0,78
Tre D B nA	706.82 ± 3.79	0,54	719.49 ± 25.73	3,58	730.41 ± 14.78	2,02
<b>Tre A nB nD</b>	699.65 ± 6.42	0,92	714.16 ± 11.8	1,65	696.51 ± 12.46	1,79
Tre B nA nD	712.33 ± 3.48	0,49	718.14 ± 7.3	1,02	719.84 ± 0.02	0
Tre D nA nB	716.63 ± 5.69	0,79	738.92 ± 13.02	1,76	723.2 ± 9.64	1,33
Tre nA nB nD	688.09 ± 7.02	1,02	711.16 ± 6.87	0,97	723.49 ± 2.82	0,39

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tre A nB nD	6	703.433	3.97743	X
Tre nA nB nD	6	707.567	3.97743	XX
Tre B nA nD	6	716.783	3.97743	XX
Tre D B nA	6	718.917	3.97743	XX
Tre A D nB	6	720.2	3.97743	X
Tre A B nD	6	720.383	3.97743	X
Tre D nA nB	6	726.25	3.97743	X
Tre A B D	6	728.05	3.97743	X

ANNEXES – Rendement en éthanol des lignées isogéniques waxy de la variété Trémie en L/t

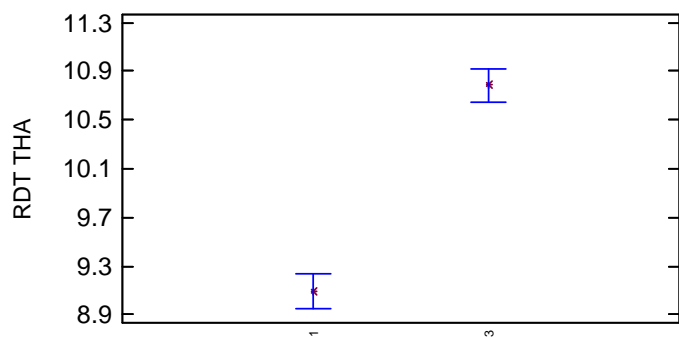
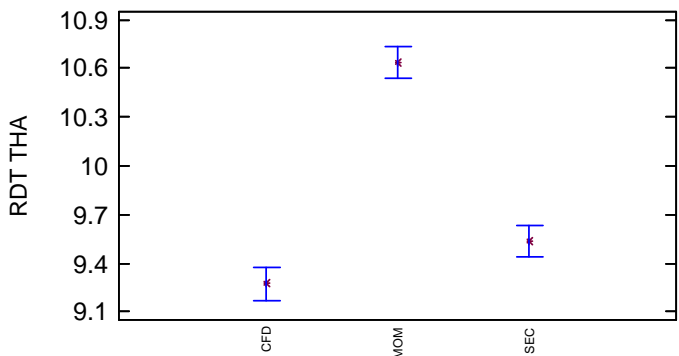
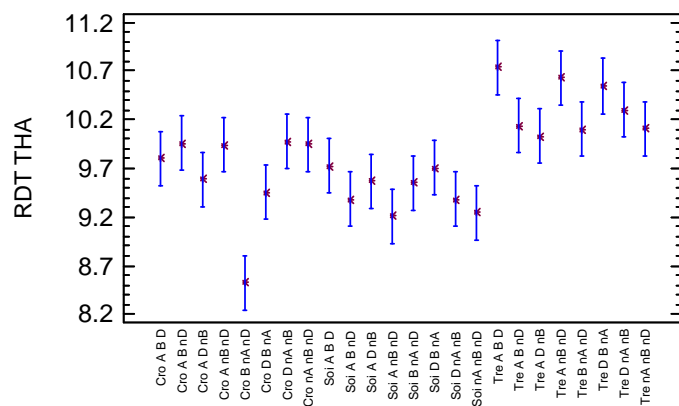


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Tre A B D	459.39 ± 6.67	1,45	467.39 ± 10.87	2,33	463.22 ± 2.48	0,54
Tre A B nD	453.94 ± 3.32	0,73	453.13 ± 13.29	2,93	463.53 ± 2.3	0,5
Tre A D nB	453.03 ± 1.08	0,24	467.14 ± 14.59	3,12	462.82 ± 7.98	1,72
Tre D B nA	457.03 ± 8.12	1,78	464.85 ± 12.91	2,78	459.25 ± 14.57	3,17
Tre A nB nD	449.76 ± 8.66	1,93	463.21 ± 11.36	2,45	448.1 ± 5.86	1,31
Tre B nA nD	453.69 ± 1.51	0,33	465.67 ± 4.39	0,94	451.8 ± 6.49	1,44
<b>Tre D nA nB</b>	464.67 ± 8.19	1,76	471.89 ± 9.37	1,99	455.25 ± 4.76	1,05
<b>Tre nA nB nD</b>	444.48 ± 5.69	1,28	455.14 ± 9.55	2,1	457.47 ± 10.75	2,35

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tre nA nB nD	6	452.383	2.79719	X
Tre A nB nD	6	453.683	2.79719	XX
Tre A B nD	6	456.867	2.79719	XXX
Tre B nA nD	6	457.067	2.79719	XXX
Tre D B nA	6	460.4	2.79719	XXX
Tre A D nB	6	461.017	2.79719	XX
Tre A B D	6	463.35	2.79719	X
Tre D nA nB	6	463.95	2.79719	X

ANNEXES – Rendement parcelaire des lignées isogéniques waxy de la variété Trémie en t/ha



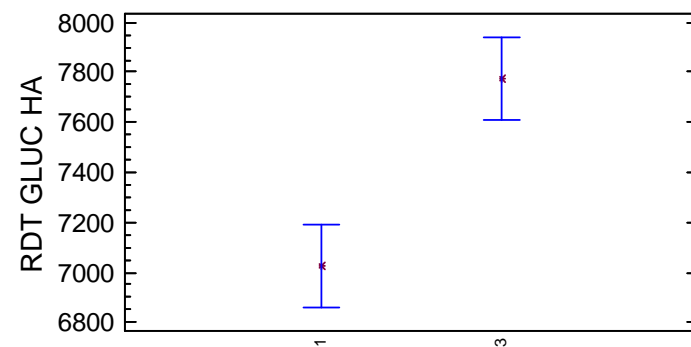
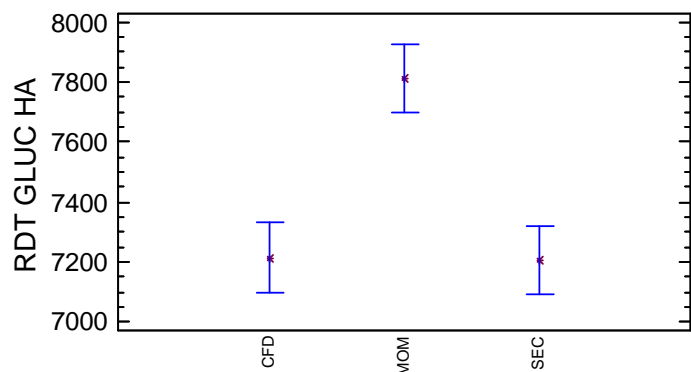
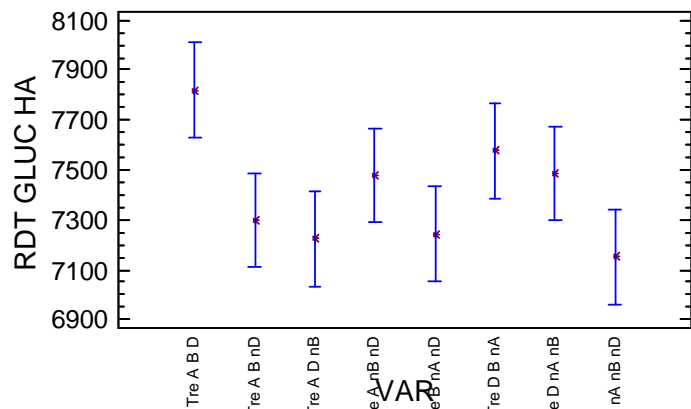
	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
Cro A B D	8.76 ± 0.42	4,76	11.09 ± 0.49	4,46	9.57 ± 0.47	4,95
Cro A B nD	8.91 ± 0.75	8,42	11.21 ± 0.22	1,97	9.74 ± 0.59	6,06
Cro A D nB	8.7 ± 0.19	2,23	10.75 ± 0.18	1,7	9.31 ± 0.64	6,84
Cro D B nA	8.6 ± 0.3	3,44	11.06 ± 0.57	5,12	8.7 ± 0.35	4,02
Cro A nB nD	8.95 ± 0.21	2,38	11.4 ± 0.22	1,9	9.47 ± 0.46	4,86
<b>Cro B nA nD</b>	<b>8.03 ± 0.04</b>	<b>0,5</b>	<b>9.81 ± 0.18</b>	<b>1,87</b>	<b>7.74 ± 0.19</b>	<b>2,47</b>
Cro D nA nB	9.26 ± 0.76	8,24	10.88 ± 0.8	7,36	9.79 ± 0.74	7,51
Cro nA nB nD	8.98 ± 0.64	7,17	11.27 ± 0.16	1,39	9.6 ± 0.6	6,3
Soi A B D	9.03 ± 0.06	0,68	10.4 ± 0.07	0,67	9.74 ± 0.72	7,41
Soi A B nD	8.8 ± 0.22	2,52	9.95 ± 0.48	4,83	9.38 ± 0.84	9,01
Soi A D nB	9.08 ± 0.08	0,92	10.44 ± 0.13	1,29	9.18 ± 0.46	5,04
Soi D B nA	9.01 ± 0	0,02	10.65 ± 0.41	3,84	9.47 ± 0.73	7,69
Soi A nB nD	8.77 ± 0.29	3,31	9.53 ± 0.37	3,87	9.35 ± 0.33	3,56
Soi B nA nD	9.01 ± 0.07	0,77	10.1 ± 0.44	4,33	9.55 ± 0.37	3,93
Soi D nA nB	8.68 ± 0.27	3,16	10.23 ± 0.88	8,61	9.23 ± 0.76	8,27
Soi nA nB nD	8.41 ± 0.01	0,13	10.04 ± 0.56	5,58	9.3 ± 0.74	7,99
<b>Tre A B D</b>	<b>10.25 ± 0.79</b>	<b>7,74</b>	<b>11.24 ± 0.02</b>	<b>0,19</b>	<b>10.73 ± 0.18</b>	<b>1,71</b>
Tre A B nD	10.17 ± 0.34	3,37	10.08 ± 0.28	2,82	10.15 ± 0.51	5,05
Tre A D nB	10.18 ± 0.66	6,49	10.18 ± 0.09	0,86	9.74 ± 0.39	3,99
Tre D B nA	10.65 ± 0.32	3,01	11.14 ± 0.28	2,48	9.85 ± 0.15	1,51
Tre A nB nD	10.26 ± 0.24	2,32	11.33 ± 0.14	1,25	10.3 ± 0.7	6,8
Tre B nA nD	9.84 ± 0.49	4,99	10.83 ± 0.86	7,94	9.64 ± 0.34	3,52
Tre D nA nB	10.22 ± 0.04	0,42	11.01 ± 0.04	0,35	9.68 ± 0.68	7,01
Tre nA nB nD	10 ± 0.08	0,77	10.66 ± 0.02	0,15	9.67 ± 0.17	1,75

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Cro B nA nD	6	8.52303	0.199112	X
Soi A nB nD	6	9.21307	0.199112	X
Soi nA nB nD	6	9.24837	0.199112	XX
Soi A B nD	6	9.3768	0.199112	XX
Soi D nA nB	6	9.37859	0.199112	XX
Cro D B nA	6	9.45298	0.199112	XXX
Soi B nA nD	6	9.55194	0.199112	XXXX
Soi A D nB	6	9.56877	0.199112	XXXX
Cro A D nB	6	9.58665	0.199112	XXXXX
Soi D B nA	6	9.70815	0.199112	XXXXX
Soi A B D	6	9.7223	0.199112	XXXXX
Cro A B D	6	9.80425	0.199112	XXXXX
Cro A nB nD	6	9.93914	0.199112	XXXX
Cro nA nB nD	6	9.95062	0.199112	XXXX
Cro A B nD	6	9.95405	0.199112	XXXX
Cro D nA nB	6	9.97694	0.199112	XXXX
Tre A D nB	6	10.0313	0.199112	XXXX
Tre B nA nD	6	10.1033	0.199112	XXXXX
Tre nA nB nD	6	10.1099	0.199112	XXXXX
Tre A B nD	6	10.1329	0.199112	XXXX
Tre D nA nB	6	10.3019	0.199112	XXXX
Tre D B nA	6	10.5457	0.199112	XXX
Tre A nB nD	6	10.6278	0.199112	XX
Tre A B D	6	10.7396	0.199112	X



ANNEXES – Rendement en glucose des lignées isogéniques waxy de la variété Trémie en kg/ha

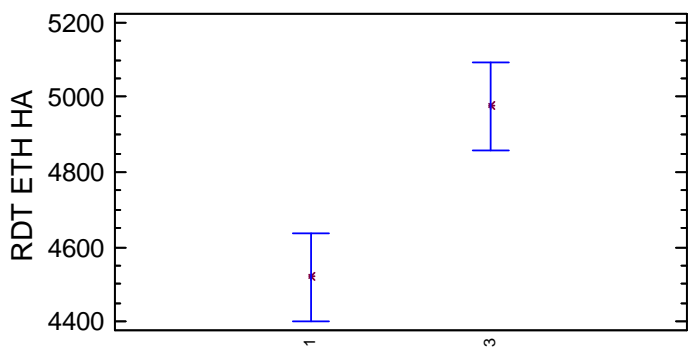
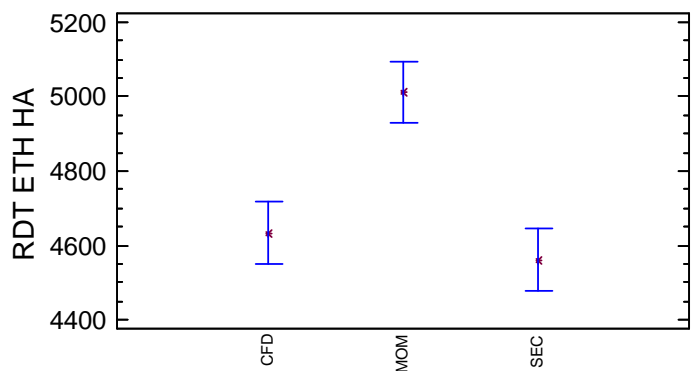
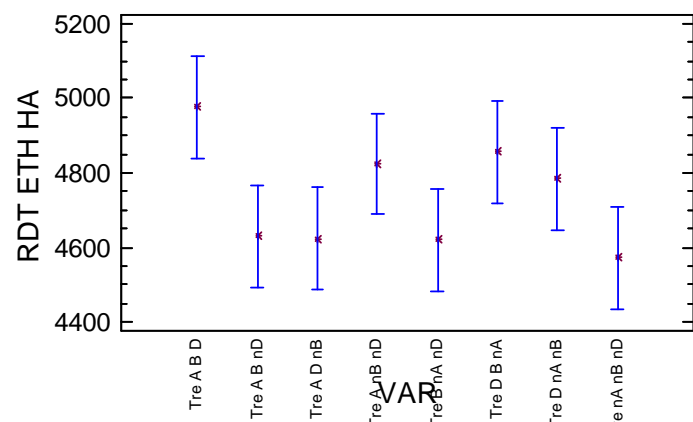


	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
<b>Tre A B D</b>	7368.6 ± 507.7	6,89	8233.06 ± 204.66	2,49	7859.38 ± 177.47	2,26
Tre A B nD	7252.08 ± 239.3	3,3	7216.79 ± 314.51	4,36	7431.01 ± 344.99	4,64
Tre A D nB	7168.87 ± 513.06	7,16	7444.47 ± 253.84	3,41	7058.83 ± 227.23	3,22
Tre D B nA	7529.18 ± 186.57	2,48	8010.81 ± 87.63	1,09	7191.96 ± 253.95	3,53
Tre A nB nD	7180.27 ± 232.59	3,24	8088.37 ± 32.26	0,4	7166.2 ± 359.32	5,01
Tre B nA nD	7012.36 ± 383.84	5,47	7778.29 ± 696.44	8,95	6939.24 ± 244.16	3,52
Tre D nA nB	7324.09 ± 88.58	1,21	8132.66 ± 171.41	2,11	6997.35 ± 397.64	5,68
<b>Tre nA nB nD</b>	6877.5 ± 17.12	0,25	7583.81 ± 61.59	0,81	6996.37 ± 150.07	2,14

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tre nA nB nD	6	7152.56	130.608	X
Tre A D nB	6	7224.06	130.608	XX
Tre B nA nD	6	7243.3	130.608	XX
Tre A B nD	6	7299.96	130.608	XX
Tre A nB nD	6	7478.28	130.608	XXX
Tre D nA nB	6	7484.7	130.608	XXX
Tre D B nA	6	7577.32	130.608	XX
Tre A B D	6	7820.35	130.608	X

## ANNEXES – Rendement en éthanol des lignées isogéniques waxy de la variété Trémie en L/ha



	CFD		MOM		SEC	
	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)	Moy ±ET	CV (%)
<b>Tre A B D</b>	4705.63 ± 296.09	6,29	5253.31 ± 112.08	2,13	4970.54 ± 111.75	2,25
Tre A B nD	4614.86 ± 121.9	2,64	4571.16 ± 262.61	5,74	4703.09 ± 214.26	4,56
Tre A D nB	4613.33 ± 310.5	6,73	4754.51 ± 189.33	3,98	4503.96 ± 102.26	2,27
Tre D B nA	4867.44 ± 60.19	1,24	5176.17 ± 15.2	0,29	4522.43 ± 211.62	4,68
Tre A nB nD	4616.21 ± 196.07	4,25	5245.98 ± 62.9	1,2	4611.18 ± 253.37	5,49
Tre B nA nD	4466.04 ± 237.5	5,32	5043.64 ± 447.87	8,88	4354.28 ± 90.79	2,09
Tre D nA nB	4749.05 ± 103.44	2,18	5193.72 ± 121.03	2,33	4408.48 ± 355.15	8,06
<b>Tre nA nB nD</b>	4442.62 ± 22.58	0,51	4853.62 ± 94.36	1,94	4424.7 ± 181.57	4,1

Method: 95.0 percent LSD

VAR	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tre nA nB nD	6	4573.65	94.0299	X
Tre B nA nD	6	4621.32	94.0299	XX
Tre A D nB	6	4623.94	94.0299	XX
Tre A B nD	6	4629.7	94.0299	XX
Tre D nA nB	6	4783.75	94.0299	XXX
Tre A nB nD	6	4824.45	94.0299	XXX
Tre D B nA	6	4855.35	94.0299	XX
Tre A B D	6	4976.49	94.0299	X

**Titre : Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy**

**Résumé :**

Dans le but d'identifier des critères de sélection du blé (*T. aestivum* L.) destiné à la production de bioéthanol, les objectifs de cette thèse étaient (1) de mettre en évidence les caractéristiques physico-chimiques du grain associées aux rendements en glucose et éthanol, et (2), d'étudier par approche protéomique l'effet de variants génétiques affectant la quantité d'amylose sur le métabolisme des sucres et de l'amidon.

L'analyse de trente variétés implantées dans un essai multilocal pluriannuel a mis en évidence l'importance du taux de protéines, de la dureté et de la distribution des granules d'amidon sur les rendements en glucose et éthanol. Dans une moindre mesure, la composition allélique des protéines de réserves et la viscosité des arabinoxylanes ont également un effet lors de l'étape de transformation de l'amidon en sucres fermentescibles.

Huit lignées isogéniques waxy de trois variétés françaises ont été implantées dans un essai multilocal. Les lignées dépourvues d'amylose ont produit moins de glucose et d'éthanol que les variétés normales. Les analyses protéomiques des protéines de l'albumen (albumines, globulines et amphiphiles) ainsi que des protéines associées aux granules d'amidon des grains matures des lignées isogéniques de la variété Trémie ont mis en évidence : (1) une relation entre le volume spécifique des GBSS et la quantité d'amylose et (2) une modification de l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres et de l'amidon (Susy, AGPase, fructose biphosphate aldolase) mais aussi de protéines de stress et de défense (serpines et HSP). Ces observations suggèrent un développement du grain incomplet pour la lignée dépourvue d'amylose.

**Mots clés :** Bioéthanol, amidon, waxy, protéomique, *Triticum aestivum*

**Title : Identification of grain wheat (*Triticum aestivum* L.) criteria associated with bioethanol production in studying a set of cultivars and using proteomic analysis of waxy isogenic lines**

**Summary :**

To identify selection criteria for wheat (*T. aestivum* L.) used for bioethanol production, our objectives were (1) to identify the physicochemical grain characteristics associated with glucose and ethanol yields and (2) using a proteomic approach, to study the impact on sugar and starch metabolism of genetic variants that influence the quantity of amylose.

The analysis of 30 wheat varieties grown in a 3-year multi-local field trial underlined the importance of protein content, grain hardness and starch granule size distribution for glucose and ethanol yields. A minor effect of the allelic composition of the storage proteins and of viscosity on the transformation of starch in fermentable sugars was also revealed.

Eight waxy isogenic lines of three French varieties were grown in a multi-local field trial. The amylose-free lines produced less glucose and ethanol than normal varieties. Proteomic analyses of endosperm proteins (albumins, globulins and amphiphilic proteins) and of proteins associated with starch granules in mature grains of isogenic lines of the Tremie variety revealed: (1) a relation between the specific volume of the GBSS and amylose quantity and (2) a modification of the expression of enzymes involved in starch and sugar metabolism (Susy, AGPase, Fructose biphosphate aldolase) and also in stress and defence proteins (serpins and HSP). These observations suggest incomplete grain development in the line without amylose.

**Keywords :** Bioethanol, starch, waxy, proteomic, *Triticum aestivum*