

Rapport final du Contrat

PRODUCTION DE SEMENCES DE HAUTE QUALITÉ

sur le thème :

Bases biochimiques, physiologiques et génétiques de la qualité d'une semence : cas de l'orge

Jean-Claude AUTRAN¹, Florence BÉNÉTRIX¹ et Jean-Christian CALMÉ²

¹ Unité Technologie des Céréales, INRA, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1

² Chaire de Phytotechnie, ENSA, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1

INTRODUCTION

L'orge est la quatrième céréale cultivée dans le monde après le blé, le riz et le maïs, avec, pour la France, en 1988, une production d'environ 10 millions de tonnes (dont 17 % d'orge de brasserie) pour un rendement de 43 qx/ha (orge de printemps) à 57 qx/ha (orge et escourgeon d'hiver) (Statistique Agricole Annuelle).

La teneur en protéines du grain est extrêmement importante pour la qualité de ces orges, que ce soit au niveau de l'alimentation animale (des teneurs élevées en protéines sont recherchées) ou au niveau de la germination du grain (des teneurs < à 11,5 % de protéines sont exigées en malterie).

Les protéines du grain (dont 80 % sont des protéines de réserve, notamment la catégorie des hordéines) sont constituées de plusieurs familles qui diffèrent par leur solubilité, leur structure, leur composition en acides aminés, leur hydrophobicité et leurs propriétés agrégatives. A quantité égale, toutes ces protéines n'ont donc pas le même effet sur la qualité de l'orge.

On connaît ainsi (nomenclature fondée sur la mobilité électrophorétique) les B-hordéines, riches en soufre, de poids moléculaire apparent 35000 à 46000, les C-hordéines, dépourvues de soufre, de poids moléculaire 55000 à 72000) et les D-hordéines (100000).

Différents auteurs ont imaginé des schémas relationnels entre la composition des hordéines et l'aptitude du grain à germer. Un état d'agrégation élevé des B- et D-hordéines entourant les granules d'amidon pourrait ainsi limiter l'accès des amylases à leur substrat et retarder ainsi le démarrage actif de la germination. D'autre part, le caractère hydrophobe plus marqué des C-hordéines pourrait rendre ces protéines responsables d'une mauvaise diffusion de l'eau et des substances solubles et gêner plus particulièrement la phase d'imbibition du grain.

Il a été montré également qu'il existe, dans le grain d'orge, une organisation des protéines de réserve en multicouches concentriques, chacune de ces couches présentant un mode d'association protéique propre, avec, de l'extérieur vers l'intérieur :

- une zone d'accumulation des hordéines B, associées par des ponts disulfures,
- une zone d'accumulation des hordéines C, associées par des liaisons de type hydrophobe,
- une plage centrale d'accumulation des hordéines D, dont le type d'agrégation est complexe.

Au cours de la maturation du grain, l'agrégation de type disulfure semblerait être postérieure à la synthèse des hordéine B, tandis que l'agrégation de type hydrophobe semble intervenir au contraire à un stade précoce. D'autre part, l'épaisseur et l'interpénétration de ces différentes couches protéiques varient pour chaque variété, ainsi qu'en fonction du lieu et de l'année de culture au sein d'une même variété (bien que le facteur variété soit prépondérant). Cette répartition entre les éléments protéiques hydrophiles et hydrophobes permettrait alors une

sorte de cloisonnement du grain, et pourrait être déterminante pour l'aptitude de chacune des variétés au maltage, en gérant notamment la qualité des mouvements d'eau centripètes, qui ont lieu lors de la phase d'imbibition de la semence.

Dans ce contexte général et dans le cadre des hypothèses de travail précédentes, l'objectif de ce programme était de préciser les relations pouvant exister entre :

- le métabolisme azoté de la plante d'orge (remobilisation de l'azote des organes végétatifs accumulé avant l'anthèse et assimilation du nitrate après anthèse),
- la composition et les caractéristiques physico-chimiques des protéines de réserve du grain,
- la qualité germinative des semences d'orge.

Au cours des années 1990-1991-1992, les deux approches du programme, fondées respectivement sur l'étude du métabolisme de l'azote dans la plante (thèse de Jean-Christian CALMÉ) - et sur l'étude de la composition des protéines de réserve accumulées dans le grain (thèse de Florence BÉNÉTRIX) ont été menées en étroite collaboration et des progrès importants ont été réalisés dans chacune d'elles.

Première partie (Thèse de Jean-Christian CALMÉ)

Chaire de Phytotechnie :

Contribution de la remobilisation de l'azote des organes végétatifs accumulé avant l'anthèse et de l'assimilation du nitrate après anthèse dans le remplissage du grain

1. Position du problème : Déterminisme de la teneur en azote des grains de céréales

La teneur en protéines est un critère de qualité essentiel pour l'utilisation des grains de céréales. Cette teneur détermine, parmi d'autres critères, la valeur boulangère du blé tendre, le choix des orges destinées à la brasserie ou à l'alimentation, ou encore la vigueur des plantules.

La teneur en azote des grains de céréales est conditionnée par le génotype et l'environnement. Parmi l'ensemble des facteurs environnementaux qui jouent un rôle sur cette teneur, la nutrition azotée est prépondérante.

Toute l'ambiguïté d'une discussion sur la maîtrise de la teneur en azote du grain réside dans le fait que l'azote est directement l'un des facteurs essentiels du rendement en grain et bien sûr du contenu protéique des grains. Si l'on considère que les connaissances actuelles, souvent d'origine empirique, des pratiques culturales mises en oeuvre permettent d'optimiser l'expression du potentiel génétique des variétés cultivées, il paraît judicieux de s'attacher plus particulièrement au remplissage du grain en azote afin de contrôler sa teneur. C'est en tout cas sous cet angle là qu'a été réalisée la majorité des travaux concernant la maîtrise de la teneur. Parmi ces travaux on peut cependant regretter le manque de réflexion concernant la régulation physiologique du rapport N/C dans le grain, et l'on peut se demander dans quelle mesure la difficulté de contrôler précisément la croissance des plantes jusqu'à la maturation des grains n'a pas rebuté les physiologistes. En effet malgré les travaux sur la nutrition minérale de Coïc et Lesaint (1975), on commence à peine à appliquer la modélisation de la croissance des plantes en fonction de leur nutrition azotée (Mattsson *et al.*, 1991, 1992a, 1992b) pour contrôler cette croissance et donc contrôler la taille du puits. Dans l'hypothèse d'une optimisation ou du moins d'un contrôle des conditions de croissance, cette étape est sans doute nécessaire afin de disposer d'un matériel reproductible pour des analyses plus fines sur ce rapport N/C.

Pour ces raisons, l'état des connaissances et l'orientation de notre travail ont concerné l'accumulation et la répartition de l'azote dans la plante entière avec comme objectif final son accumulation dans le grain. Effectivement, comme le soulignent de nombreux auteurs (Bhatia et Rabson, 1976 ; Cox *et al.*, 1985a ; Sander *et al.*, 1987), pour augmenter la teneur en protéines du grain les deux voies possibles sont l'augmentation d'une part de la capacité à absorber

l'azote disponible et d'autre part augmenter la remobilisation de l'azote accumulé dans les parties végétatives.

La conduite de la fertilisation azotée pour le contrôle de la teneur en protéines du grain nécessite, à partir d'un point de repère facilement identifiable, de comprendre l'effet d'un apport d'azote sur la croissance (donc sur le rendement), sur l'absorption et la répartition de l'azote. La période post-anthèse apparaît comme une période sensible pendant laquelle on peut encore augmenter si on le désire la teneur en azote du grain. La difficulté est de distinguer dans la plante l'azote qui provient soit de la remobilisation soit de l'absorption post-anthèse. L'apport de ^{15}N après l'anthesis permet d'effectuer cette distinction. De plus ce marquage pourrait faciliter la comparaison des rapports absorption post-anthèse/remobilisation et son évolution en fonction de différentes fertilisations.

Les sélectionneurs recherchent des critères de sélection. Les principales voies engagées jusqu'à présent pour le choix de ces critères sont :

- la recherche de gènes responsables de teneurs exceptionnelles, comme les gènes *Lys* chez l'orge ou *Opaque* chez le maïs ;
- la recherche de critères morpho-physiologiques, agro-physiologiques ou physiologiques, basée sur le contrôle de l'absorption totale par la plante et de la répartition de cet azote vers le grain. Cette idée repose sur un accroissement limité de la matière sèche du grain, ce qui est le cas génétiquement.

A l'échelle de la plante entière, les grandes étapes qui contribuent au remplissage du grain en azote sont établies et font l'objet d'une abondante littérature. Ces étapes ont pu être intégrées dans un modèle (Moll *et al.*, 1983 ; van Sanford et Mackown, 1987) qui permet des comparaisons intervariétales. Cependant, de par la nature intrinsèque (grande variabilité due à l'environnement, explication limitée des phénomènes par les corrélations) de l'expérimentation agronomique, les résultats peuvent paraître contradictoires. Il s'agit de bien différencier les effets génotypiques des effets environnementaux. Un travail en condition de nutrition azotée contrôlée pourrait accélérer la compréhension des mécanismes responsables de différences intervariétales et d'estimer les plus déterminants dans le remplissage en azote du grain.

Enfin des recherches en vue de maîtriser cette teneur doivent se poursuivre sur l'aspect physiologique de la régulation de l'entrée de l'azote dans le grain en terme de relation source-puits.

En prenant pour modèles les génotypes Karl et Traill, l'objectif de notre travail était de déterminer la cause des différences de teneur en azote :

- à travers les grands processus agro-physiologiques de transfert d'azote dans une étude au champ comprenant deux types de fertilisation dont une tardive ;
- à travers le rôle de l'absorption post-anthèse et de la remobilisation à quatre niveaux de fertilisation avec un marquage au ^{15}N de l'absorption post-anthèse en conditions de nutrition contrôlée (expérimentation en pot) (**Tableau I**) ;
- à travers l'hypothèse d'une régulation de l'accumulation d'azote dans les grains par les grains eux-mêmes.

Le but de cette première partie du travail était de rechercher, pendant la formation du grain, quels sont les processus agro-physiologiques (absorption et répartition de l'azote) qui déterminent cette différence. La teneur en azote du grain étant un rapport à la quantité de matière, le rendement et ses composantes doivent être analysés.

Les raisons de ce choix variétal ont été exposées. N'ayant pas d'information sur leur comportement au champ dans nos conditions climatiques, il nous a paru intéressant de joindre dans cette première partie de l'étude trois variétés connues pour leurs différences morphologiques et/ou leur teneur en protéines contrastée.

Deux modalités d'apport d'engrais azoté permettent d'examiner plus particulièrement l'influence d'un apport tardif sur le remplissage en azote du grain.

Les résultats de cette étude au champ sont de deux types :

- pour l'ensemble des variétés : analyse des composantes du rendement, la répartition de la matière sèche et de l'azote à maturité.

- pour Karl et Traill : suivi des cinétiques d'accumulation et de perte de matière sèche et d'azote dans les différents organes (épi, limbes, tiges et gaines) de la plante.

2. - Caractéristiques du rendement et de l'accumulation d'azote à maturité

A) Les composantes du rendement en grains

Karl a un rendement et un tallage supérieur à Traill pour les deux fertilisations. Karl, Traill et Bérénice ne modifient pas leur rendement avec la fertilisation tardive. Bérénice et Traill ne modifient pas leurs composantes. Par contre, Karl augmente son tallage, et sa fertilité diminue. Ceci s'explique chez Karl par une capacité à produire des talles tardives qui restent réduites et peu fertiles. De plus ces talles tardives ont, par effet de compétition, induit une réduction de la fertilité des talles précoces et donc contribué à la réduction moyenne de la fertilité sans modifier le rendement d'une fertilisation à l'autre.

Plaisant, et surtout Triumph, augmentent leur rendement avec la fertilisation tardive (+20% et +40% respectivement). Pour Plaisant, l'apport tardif d'azote a pour conséquence une augmentation de la fertilité de l'épi - due probablement à une diminution de l'avortement de jeunes grains (Coïc, 1950) - et du tallage. Triumph augmente fortement son tallage (+40%) et dans une moindre mesure sa fertilité. Cette variété est plus tardive que les autres, les deux derniers apports sont donc intervenus plus tôt au cours de son développement. Ainsi, contrairement à Karl, des talles tardives d'aspect comparable à celles initiées au tallage ont eu le temps de se développer jusqu'à la récolte et ainsi relève-t-on plusieurs types de réponses du rendement et de ses composants en fonction des variétés vis à vis d'une fertilisation tardive. On a par exemple :

- des variétés qui n'augmentent pas leur rendement, soit sans modifier leurs composantes, soit en les modifiant mais alors en établissant une composition équilibrée entre les puits d'une fertilisation à l'autre.
- des variétés qui accroissent leur rendement en augmentant le tallage épi ou (et) la fertilisation avec la possibilité d'une compensation du PMG comme pour Triumph.

B) Biomasse et accumulation d'azote ; leur répartition à maturité (Tableaux II et III)

Comme pour le rendement, ce sont Plaisant et Triumph qui bénéficient de la fertilisation tardive pour leur biomasse aérienne alors que celle des autres variétés reste stable. Par contre toutes les variétés répondent en augmentant l'azote accumulé par la biomasse et par les grains. Là encore, ce sont Plaisant et Triumph qui bénéficient du mieux de l'apport tardif. La teneur en azote des grains est accrue chez l'ensemble des variétés.

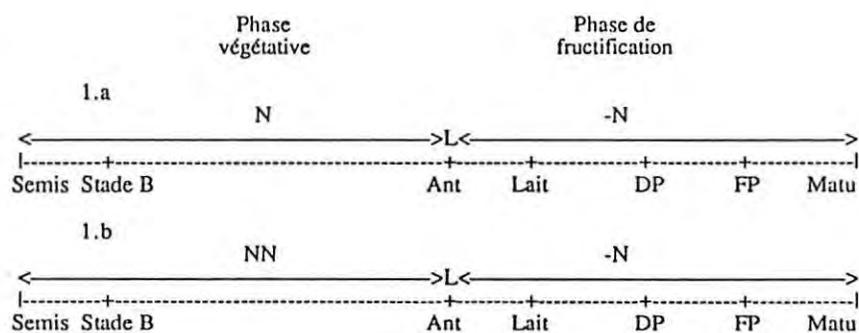
Si l'on compare le classement des variétés pour la quantité d'azote dans le grain à celui de la teneur en azote du grain, on se rend compte que :

- les classements ne sont pas les mêmes à l'intérieur d'un même traitement (cas des couples Karl-Traill avec F1 ou Traill-Plaisant avec F2, etc.).
- les classements peuvent être modifiés d'un traitement à l'autre pour une même variété.

Nous reviendrons dans la discussion sur ces inversions.

Pour les deux traitements Karl et Traill produisent sensiblement les mêmes quantités de biomasse et accumulent autant d'azote. Cependant Karl répartit proportionnellement mieux sa matière sèche vers le grain alors que les indices de récolte azotés ne sont pas différents. En effet, Karl a un rendement en grain supérieur à Traill et une masse des parties végétatives inférieures. La teneur en azote du grain de Karl est inférieure à celle de Traill.

L'apport tardif n'a pas d'effet sur le classement des variétés pour l'indice de récolte mais augmente légèrement celui-ci pour toutes les variétés, c'est à dire améliore la répartition en faveur du grain. Les valeurs de l'indice de récolte de l'azote par variété et leur classement sont les mêmes pour les deux traitements. Seule la variété Triumph améliore sa répartition de l'azote.



Légende: L = lessivage. Stades de prélèvement: stade B, Ant = anthèse, Lait = stade laitieux, DP = stade début-pâteux, FP = stade fin-pâteux, Matu = maturité.

Tableau I. Schéma de l'expérimentation en pot.

TRAIT.	VAR.	EPI	TIGE+ GAINES	2DL	RL	RAC	ABS.
N	K	8,0 (0,6)	3,2 (0,4)	2,2 (0,3)	1,4 (0,4)	2,5 (0,3)	
N	T	11,5 (0,8)	5,2 (0,7)	2,5 (0,4)	1,2 (0,2)	2,5 (0,4)	
NN	K	15,0 (1,2)	5,8 (0,8)	3,2 (0,5)	3,7 (0,5)	2,5 (0,2)	
NN	T	18,5 (1,1)	8,8 (0,6)	2,8 (0,3)	3,3 (0,2)	2,6 (0,4)	
NNN	K	20,8 (1,3)	3,2 (0,7)	2,9 (0,2)	3,4 (0,3)	2,0 (0,1)	9,3 (0,4)
NNN	T	25,0 (1,5)	6,3 (0,5)	2,7 (0,4)	3,1 (0,3)	2,4 (0,3)	10,5 (0,3)

Tableau II. Quantités d'azote (mg) présentes dans l'épi à maturité et perdues entre l'anthèse et la maturité par la tige et les gaines, les deux derniers limbes (2DL), le reste des limbes (RL) et les racines (RAC). La dernière colonne correspond à l'azote absorbé après l'anthèse; elle est obtenue par différence entre l'azote de l'épi à maturité moins le cumul des vidanges des compartiments végétatifs.

	Périodes de marquage			
	A	B	C	D
KARL	1,2 (0,08)	2,6 (0,1)	0,1 (0,07)	3,8 (0,2)
TRAILL	1,6 (0,12)	3,0 (0,11)	0,2 (0,08)	4,9 (0,4)

Tableau III. Quantités d'azote (mg) accumulées dans l'épi en provenance de l'absorption post-anthèse pendant différentes périodes de marquage au 15N: A = "laitieux à début-pâteux", B = "début-pâteux à fin-pâteux", C = "fin-pâteux à maturité", D = "laitieux à maturité".

La variété semi-naine Triumph a un indice de récolte élevé (classique chez ce type d'orge) ce qui lui confère une teneur en azote du grain faible malgré son bon indice de récolte azoté.

En moyenne la matière sèche dans les différents organes de la plante est répartie comme suit : grain 51%, tige et gaines 37%, limbes 7%, rachis et barbes 5%. La répartition de l'azote est de 81% pour le grain, de 9,5% pour la tige et les gaines, de 6,5% pour les limbes et de 3% pour le rachis et les barbes. La variété Bérénice conserve proportionnellement peu d'azote dans la tige et les gaines par rapport aux autres variétés.

C) Efficacité d'utilisation de l'azote

L'analyse de variance montre qu'il existe des différences significatives entre variétés et entre niveaux de fertilisation azotée (NS) pour l'accumulation d'azote totale par la plante (NT) et la quantité d'azote du grain (NG). L'interaction est aussi significative pour ces deux caractères.

Si on compare NT par rapport à NS pour un apport précoce de 5,5 g /m² (=55 U/ha) et en faisant l'hypothèse (sachant qu'elle est abusive) que cet azote est entièrement assimilé par la plante, on constate qu'au moins 50% de la quantité totale d'azote accumulée par les plantes provient de la minéralisation du sol. Les apports tardifs (2*50 U) entraînent une absorption de 50 U supplémentaires dont 40 U se retrouvent dans les grains.

Par la suite, nous avons désigné sous le terme d'efficacité d'utilisation de l'azote -parmi celles que l'on peut imaginer (Jackson *et al.*, 1986)- l'efficacité d'utilisation de l'azote fourni par la fertilisation pour l'accumulation dans le grain. Ne disposant pas d'une mesure des quantités fournies par le sol à la plante, cette efficacité est une efficacité apparente. Un marquage au ¹⁵N eut été nécessaire pour déterminer l'efficacité réelle de nos apports.

A maturité l'efficacité d'utilisation de l'azote fourni par la fertilisation pour son accumulation dans le grain peut être décomposée en un terme de répartition (indice de récolte d'azote) et un terme d'absorption par la plante entière (cf 1.6). L'analyse de cette efficacité selon la méthode de Moll *et al.* (1983) indique que l'apport contrasté d'azote entraîne deux situations différentes.

Dans le cas d'un apport unique de 55 U (F1) au tallage, les variations d'accumulation d'azote dans le grain dépendent uniquement des variations d'absorption de l'azote. L'interprétation que l'on peut en donner est que le facteur limitant de l'accumulation de l'azote dans le grain est essentiellement l'absorption.

Dans le cas d'un apport fractionné de 155 U (F2), la fonction de répartition de l'azote (X₁) dans la plante prend autant d'importance que l'absorption (X₂). En effet, les contributions relatives des variations de X₁ et de X₂ à celle de Y sont de 0,5 et 0,46 respectivement.

Toutes les variétés utilisent moins efficacement l'azote pour son accumulation dans le grain avec F2. En effet, alors que la répartition de l'azote n'est que peu ou pas modifiée, c'est l'absorption par la plante qui est en cause. Des variétés relativement peu efficaces peuvent être au-dessus de la moyenne pour l'une de leurs composantes. Par exemple, Triumph avec F2 a un indice de récolte azoté (NG/NT) supérieur à la moyenne alors qu'elle a la plus faible efficacité. De même, des variétés avec des niveaux comparables d'utilisation se différencient par la façon dont elles atteignent ce niveau : Bérénice et Traill avec F1, ont une bonne efficacité d'utilisation, mais Traill a un indice de récolte azoté moyen alors que celui de Bérénice est le plus fort des cinq.

En ce qui concerne la comparaison entre Karl et Traill, on peut noter un comportement très différent selon la fertilisation azotée. Avec un faible apport, ces variétés ont une efficacité d'utilisation supérieure à la moyenne et proche l'une de l'autre, avec un avantage pour Traill. Dans le deuxième cas, Karl conserve une bonne efficacité mais celle de Traill se retrouve en dernière position. Les indices de récolte azotés n'ayant pas changé d'un traitement à l'autre pour ces variétés, cette situation est le résultat d'une inversion de l'efficacité d'absorption.

D) Évolution de la matière sèche et de l'azote chez Karl et Traill pendant la formation du grain

Dans ce partie du travail, les cinétiques ont été étudiées sur les talles maîtresses ou des talles proches morphologiquement et au même stade de développement. Pour ces raisons nous désignons par la suite ces talles sous le terme de talles maîtresses. Il faut en tenir compte dans les descriptions et discussions à venir.

a) La matière sèche

La courbe d'accroissement de la matière sèche des talles est d'allure sigmoïde sur l'ensemble du cycle de végétation. On distingue trois phases : une première phase de croissance lente jusqu'à la fin du tallage suivie d'une deuxième phase de croissance rapide jusqu'au stade laiteux. Les prélèvements effectués se situent dans la troisième phase où l'augmentation de poids est faible ou nulle. Ceci résulte d'une perte de matière sèche des limbes (-50%) et des tiges (-40%) et d'un accroissement de celle des épis. La chute de matière sèche des tiges débute 20 jours après l'anthèse alors que celle des limbes est déjà commencée 10 jours avant l'anthèse.

Pour chaque fertilisation azotée, Traill accumule dans les talles une plus grande quantité de matière sèche. Ceci est dû à une supériorité des masses des tiges et des limbes dès l'épiaison. Pour les épis des différences apparaissent en fin d'accroissement. On peut s'étonner que la masse d'épi la plus faible soit celle de Karl avec F2 alors que cette variété a le rendement par m² le plus fort.

Si on compare l'effet de la fertilisation azotée, l'apport fractionné de 155U ne modifie pas la matière sèche des talles de Traill alors que celle de Karl est moindre par rapport à une fertilisation unique de 55U au tallage.

La fertilisation 2 entraîne :

- pour les épis, une MS plus importante chez Traill et plus faible chez Karl.
- pour les tiges, une MS plus faible chez les deux variétés à partir du 10^{ème} jour après l'anthèse.
- pour les limbes, une MS plus importante chez les deux variétés. La différence existe dès l'anthèse, elle est accentuée pendant les 40 jours suivant, puis décroît. Pendant ces 40 jours la MS des limbes de Traill répond mieux à F2 que celle de Karl.

b) L'azote réduit

On retrouve pour l'azote, comme pour la matière sèche, l'allure globale des courbes d'accumulation dans les talles et les épis et de perte dans les tiges et les limbes.

A maturité Traill accumule une plus grande quantité d'azote dans les épis et répond mieux à la fertilisation tardive. Ces différences entre variétés et entre traitements se créent entre le 10^{ème} et le 20^{ème} jour après l'anthèse.

Dans les parties végétatives à maturité, les écarts de quantité d'azote résiduel sont faibles à nuls entre traitement et entre variété. Mais les quantités d'azote perdues et leurs cinétiques sont très différentes.

Jusqu'au 40^{ème} jour après l'anthèse les parties végétatives des deux variétés contiennent une plus grande quantité d'azote avec la fertilisation tardive. Et Traill en contient plus que Karl jusqu'au 20^{ème} jour, hormis pour les limbes avec F1 où les quantités accumulées et les cinétiques sont identiques.

La fertilisation 2 entraîne un retard de la perte d'azote des limbes des deux variétés et prolonge son accumulation dans les épis de Traill uniquement.

c) Conséquences sur la teneur en azote

- Pour les épis

A maturité, quel que soit le type de fertilisation azotée Traill a une teneur plus forte que Karl. Et les deux variétés ont une teneur supérieure avec F2. La teneur en azote des épis chute

de l'épiaison jusqu'au 30ème jour après l'anthèse puis se stabilise pour l'ensemble des variétés et des traitements.

- Pour les parties végétatives

L'apport tardif augmente fortement la teneur en azote des parties végétatives. Ceci est surtout la conséquence d'une augmentation de la quantité d'azote.

A maturité les tiges et les limbes ont encore une teneur en azote supérieure avec F2. Elles contiennent donc potentiellement une quantité d'azote qui n'est pas utilisée par les épis.

Pour chaque organe, on observe des modifications du classement des courbes de quantité d'azote accumulée comparé à celui des courbes de teneur. Quel que soit le traitement, les masses de matière sèche plus faible chez Karl en sont à l'origine. Ceci explique par exemple la forte teneur des tiges et des limbes de Karl avec F2, alors que les quantités accumulées sont elles-mêmes équivalentes ou plus faibles que pour Traill.

3. - Conclusion de la première partie

Dans nos conditions pédo-climatiques, Karl et Traill sont des variétés qui présentent un bon potentiel de rendement comparées aux variétés françaises choisies dans notre étude. Mais, au champ, leur taille haute et leur poids d'épi élevé les rendent sensibles à la verse. Elles sont caractérisées par une biomasse importante même en condition de faible alimentation azotée. Traill accumule une plus grande quantité d'azote dans les grains et sa teneur en azote du grain est supérieure à Karl à niveau identique de fertilisation. L'indice de récolte de Karl est supérieur à celui de Traill, alors que leurs indices de récolte azotés sont similaires. L'ensemble de ces résultats sont conformes à ceux obtenus en pot sur sol reconstitué par Rivoire (1990). Karl confirme comme caractéristique génotypique sa faible teneur en azote du grain.

L'étude des cinétiques de remplissage des épis en azote et de perte des parties végétatives permettent de comprendre comment se mettent en place ces différences entre Karl et Traill vis à vis des deux types de fertilisation azotée. En particulier nous avons pu mettre en évidence le rôle des parties végétatives de Traill capables d'accumuler plus d'azote et d'en redistribuer plus vers les grains. Mais ces résultats obtenus sur des talles maîtresses montrent qu'il serait nécessaire de réaliser un travail plus précis sur l'ensemble de la plante, c'est-à-dire qu'il faudrait disposer de données sur la formation des talles tardives et sur leur accumulation d'azote.

Nous avons confirmé le rôle de l'azote tardif sur l'augmentation de la quantité d'azote par les grains sur la plante entière ou par unité de surface. Mais nous n'avons pas réalisé de mesures quantitatives directes de l'absorption après l'anthèse. Nous n'avons pas non plus d'idée de la participation réelle de l'apport tardif à l'alimentation des grains, ni quelle pourrait être l'influence d'une assimilation tardive sur la remobilisation de l'azote déjà présent à l'anthèse.

Deuxième partie (Thèse de Florence BÉNÉTRIX)

Laboratoire de Technologie des Céréales :

**Étude biochimique, ultrastructurale et agronomique de la qualité d'une orge :
Rôle des hordéines**

1. Introduction

La qualité d'une semence peut être appréciée à différents niveaux : génétique (identité et pureté variétale), physique (matières inertes, adventices, calibre, humidité, intégrité des structures...), sanitaire, physiologique (faculté germinative, rapidité d'imbibition, dormance...) et technologique. Bien que l'alimentation animale représente près des trois-quarts des débouchés de l'orge en France, la malterie constitue la toute première utilisation industrielle de l'orge, avec une production de 1,3 million de tonnes de malt (dont 75 % sont exportés). Le malt est essentiellement destiné à la fabrication de la bière.

Le maltage est le processus technologique de transformation de l'orge en malt impliquant la dégradation des parois cellulaires de l'albumen, ainsi que l'hydrolyse des protéines et de l'amidon au cours d'une germination réalisée en conditions contrôlées. Le maltage comprend trois phases : la trempe, la phase de germination contrôlée du grain et le séchage. La transformation de l'orge en malt est régie par les mêmes mécanismes physiologiques qui contrôlent la germination du grain en champ. Il y a donc chez l'orge une certaine concordance entre les problèmes de la semence qui germe et ceux touchant au grain destiné à la malterie, la qualité de la semence s'identifiant en partie à la qualité d'utilisation. De la même façon que la qualité d'une semence peut être définie comme l'aptitude à redémarrer rapidement une vie métabolique active, la qualité maltière correspond à une aptitude à germer rapidement ("désagrégation" rapide des réserves du grain) et de façon homogène.

Les variétés d'orge diffèrent dans leur aptitude au maltage, mais les raisons de cette différence de comportement ne sont pas clairement établies. De nombreux facteurs sont impliqués dans la détermination de la qualité maltière sans que leur importance relative soit bien définie. Un certain nombre de constituants ont été étudiés afin de suivre ou de "mesurer" les modifications touchant l'albumen : constituants majeurs (amidon, protéines, β -glucanes), enzymes (amylases, protéases, β -glucanases, lipases), hormones (acide gibérellique). Le rôle des protéines dans la qualité maltière a fait l'objet de nombreuses études dont certaines remontent au début du siècle. Il ressort de ces études que les protéines jouent un rôle fondamental de par leur nature (protéines de réserves, protéines de structure, enzymes) et leur quantité dans le grain, mais que l'importance des autres constituants ne doit pas pour autant être sous-estimée.

L'étude que nous entreprenons sur les protéines de l'orge répond à l'une des préoccupations prioritaires des malteurs, à savoir les difficultés engendrées par l'excès de protéines au cours des processus de transformation du grain. Ainsi, dans le cadre d'hypothèses fréquemment avancées dans la littérature, les protéines agrégées par des ponts disulfures (B et/ou D-hordéines), qui sont supposées former une matrice autour des grains d'amidon, ont été mises en cause en tant que facteur limitant de l'attaque amylasique de l'amidon. Ces mêmes protéines pourraient d'autre part résister davantage à une dégradation par les protéases. Pour d'autres auteurs, ce seraient au contraire les protéines les plus hydrophobes (C-hordéines) qui retarderaient la germination en s'opposant à la pénétration et la diffusion de l'eau et des substances solubles dans le grain. Notre étude se situe donc dans un domaine controversé et d'autant plus complexe que, jusqu'à présent, aucune preuve totalement convaincante fondée sur les propriétés physico-chimiques des hordéines n'est venue conforter ces différentes hypothèses.

D'une façon générale, l'étude des relations entre la composition protéique et la qualité maltière a souvent été négligée du fait de l'effet majeur des autres constituants tels que l'amidon et les enzymes, ainsi que de la difficulté de préserver les complexes protéiques au cours des opérations d'extraction.

Devant la complexité du problème, et contrairement à d'autres travaux de thèse qui sont développés autour d'une seule méthodologie, une approche pluridisciplinaire (biochimie, amélioration des plantes, agronomie et physiologie, microscopie, technologie) s'est avérée ici indispensable.

Dans le but de déterminer l'influence des facteurs génétiques et agroclimatiques sur la composition protéique de l'orge et sur la qualité du malt, nous avons tout d'abord effectué une étude de la composition en sous-unités protéiques (électrophorèse SDS-PAGE, extraction séquentielle) et en complexes protéiques (HPLC d'exclusion-diffusion) à partir de variétés cultivées en différents lieux et soumises à des conditions variables de fertilisation azotée.

D'autre part, à partir de cultures au champ et en pots (marquage ^{15}N), on a suivi la mise en place et l'évolution des protéines au cours de la maturation du grain, tandis que, grâce à des essais de germination, on a pu préciser les relations entre dégradation des hordéines et vitesse de réhydratation de la graine.

Enfin, la localisation des hordéines dans le grain et leur caractérisation ultrastructurale ont été réalisées par des techniques de microscopie (fluorescence, balayage, transmission) associées à l'outil immunochimique (immunolocalisation).

À partir des nouvelles connaissances ainsi acquises sur les aspects physico-chimiques, physiologiques, agronomiques et structuraux de la composition des protéines du grain d'orge, nous avons alors tenté de proposer un modèle explicatif du rôle des hordéines dans la germination du grain et plus précisément de leur influence sur la qualité maltière.

2. Influence des facteurs génétiques et agroclimatiques sur la composition protéique de l'orge et la qualité du malt

Cette étude a été entreprise dans le but de déterminer l'influence des facteurs génétiques et agroclimatiques sur la composition protéique de l'orge et sur la qualité du malt. Pour cela, on a examiné différentes variétés cultivées en différents lieux et soumises à des conditions variables de fertilisation azotée. On a également mis en oeuvre deux principales techniques d'étude de la composition protéique : l'électrophorèse (SDS-PAGE) et la chromatographie (SE-HPLC).

Contrairement à l'électrophorèse des protéines totales réduites qui renseigne sur les tendances évolutives des fractions protéiques en fonction des traitements azotés mais qui ne donne pas toujours de conclusions très nettes, la SE-HPLC permet d'expliquer certaines différences de qualité reposant sur les propriétés agrégatives des protéines (**Figure 1**).

Les variétés étudiées ont été soumises à différentes conditions agroclimatiques (variations des techniques culturales et des conditions pédoclimatiques). On sait que la nutrition azotée affecte la teneur en protéines du grain ainsi que la composition en protéines et influence directement la qualité technologique du malt. Notre travail apporte des éléments nouveaux sur les relations entre les agrégats protéiques et la qualité maltière. L'outil SE-HPLC met en évidence des différences de distribution entre les fractions protéiques en fonction de la fertilisation azotée. La teneur en fraction F4, riche en C-hordéines (**Figure 2**), augmente en fonction de la teneur en protéines dans le grain, donc en fonction des variations agroclimatiques. Certains "clichés" variétaux sont toutefois conservés malgré l'origine différente des échantillons. Ainsi, la variété d'hiver Plaisant est caractérisée par une teneur en fraction F4 très élevée quelles que soient les conditions de culture, et Triumph présente une proportion moyenne de fraction F4 faible mais sensible aux variations de fertilisation azotée. Enfin, la variété Volga se caractérise par sa capacité à minimiser les variations de fraction F4 (dont la teneur moyenne est faible) et des critères de qualité du malt, alors qu'elle peut subir de fortes dispersions de sa teneur en protéines. La fraction F4 pourrait au moins en partie expliquer l'origine des différences des variétés au regard de la qualité maltière. Cependant, à cause de sa sensibilité aux variations de nutrition azotée, la quantification de la fraction F4 serait plus adaptée à discriminer des lots d'orge sur la base de leur capacité à être facilement maltés, qu'à tester les lignées en sélection variétale (**Figure 3**).

De fortes corrélations sont mises en évidence entre certaines fractions HPLC et les critères de qualité du malt. Ainsi, la fraction F4 est négativement corrélée à l'extrait de malt et à l'indice Kolbach, même en l'absence de corrélation entre la teneur en protéines et les analyses technologiques du malt. De plus, les fractions protéiques les plus agrégées de l'orge et du malt apparaissent négativement à la friabilité.

Ces résultats permettent une meilleure compréhension des bases physico-chimiques de la qualité maltière et renforcent l'hypothèse qu'un excès de C-hordéines, constituants majeurs de la fraction F4, pourrait affecter la qualité maltière en gênant la migration de l'eau au cours du maltage.

3. Protéines et maturation du grain

L'objectif de cette étude était d'apprécier l'importance du facteur "durée" et de différents types d'apport azoté sur la mise en place des protéines du grain chez différentes variétés. On a fait varier les dates d'apport azoté et les quantités apportées. Les protéines sont étudiées selon leurs propriétés de solubilité et d'agrégation. L'originalité du travail réside dans le choix de certaines variétés, telles que Karl et Traill, génétiquement très proches, et dans l'approche méthodologique reposant sur l'utilisation du marquage isotopique au ^{15}N .

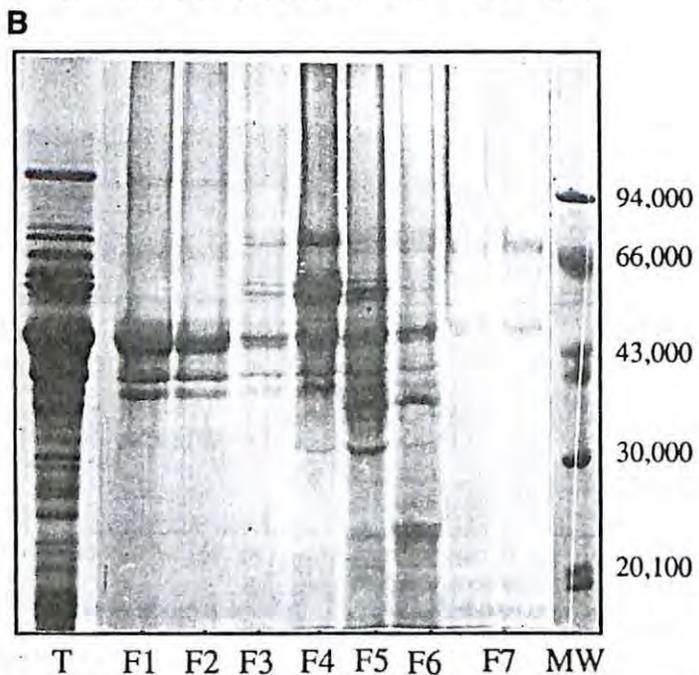
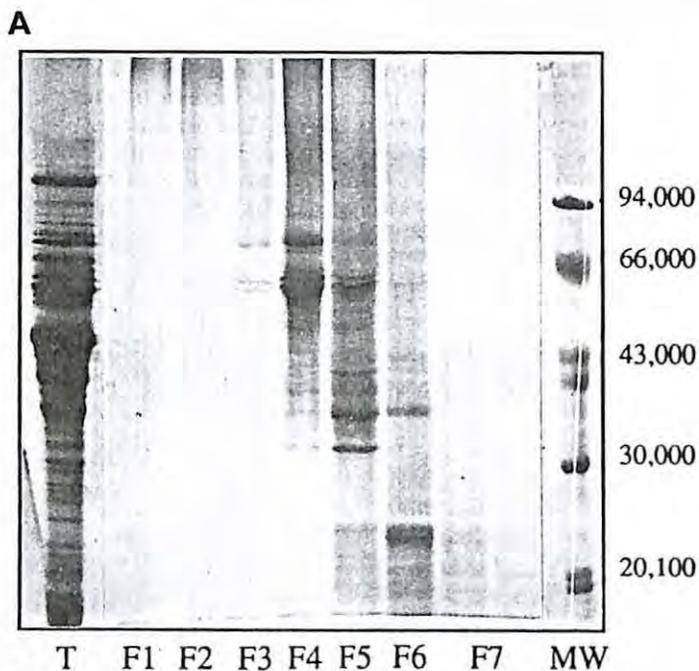


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of unreduced (A) and reduced (B) protein fractions (F1-F7) collected from size-exclusion high-performance liquid chromatography. T = total reduced proteins; MW = molecular weight standards.

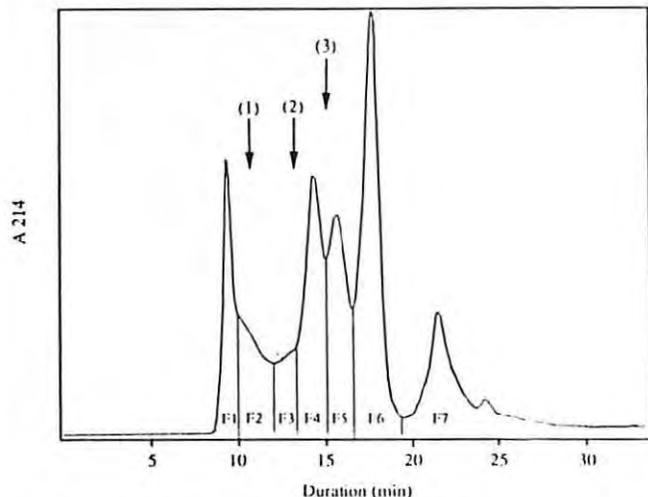


Fig. 1. Typical elution pattern of unreduced barley storage proteins extracted by phosphate-sodium dodecyl sulfate buffer. Arrows indicate the positions of three reference proteins. Seven chromatographic fractions correspond to different sizes of aggregates (F1-F7).

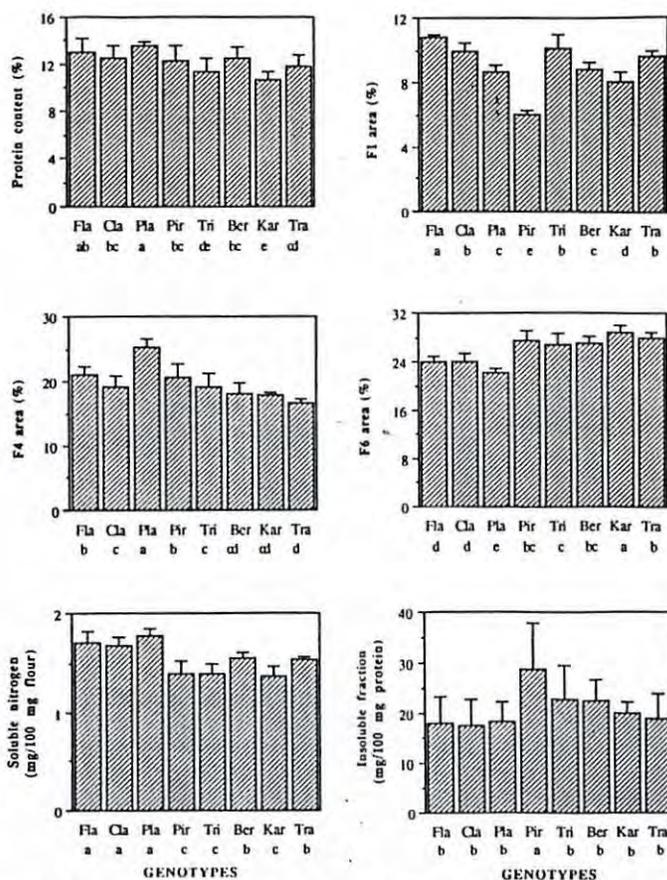


Figure 3. Main effect of genotype as determined by the Newman-Keul homogeneity test for: protein content; percentage of chromatographic fractions F1, F4, and F6; soluble nitrogen; and insoluble residue. Fla = Flamenco, Cla = Clarine, Pla = Plaisant, Pir = Pirate, Tri = Triumph, Ber = Bérénice, Kar = Karl, Tra = Traill. Mean values with the same letter are not significantly different for each characteristic. Vertical bars represent standard deviation from means.

Cette étude contribue à améliorer les connaissances sur la régulation du remplissage en azote du grain, puisque nous avons mis en évidence des différences variétales, ainsi que l'influence du traitement azoté sur la stratégie d'accumulation de l'azote dès les stades précoces de maturation du grain.

Au cours de la maturation du grain d'orge, les protéines de réserve subissent de profondes modifications au niveau de leur solubilité (extractions séquentielles), de leur hydrophobicité de surface (RP-HPLC) et de leurs caractéristiques d'agrégation (SE-HPLC).

Le rapport entre les B et C hordéines, ainsi que le degré d'agrégation des polypeptides, sont fortement dépendants des conditions de culture de la plante, et notamment de la fertilisation azotée. Il existe en effet une variabilité importante au niveau de la synthèse protéique (teneur et qualité protéique) en réponse à des fumures azotées différentielles.

L'accumulation de la fraction F1 est précoce et rapide jusqu'à la phase de dessiccation du grain, tandis que la quantité relative de fraction F4 (C-hordéines) diminue au cours de la maturation. L'accumulation des protéines totales, et plus particulièrement des C-hordéines, est plus importante lorsque le niveau d'apport azoté augmente. La variété Triumph privilégie l'agrégation de ses protéines sur la base de ponts disulfures.

La période d'assimilation d'azote la plus active se situe entre 15 et 30 jours après anthèse. Par rapport à Karl, Traill accumule plus d'azote provenant à la fois de la remobilisation et de l'assimilation directe post-anthèse (marquage ^{15}N). Traill se caractérise par une accumulation tardive d'azote (pendant la phase de dessiccation du grain), tandis que Karl arrête sa synthèse protéique plus tôt. Traill se distingue par une accumulation plus importante d'hordéines dès le début de remplissage du grain et par une capacité d'assimilation directe de l'azote vers les C-hordéines et B-hordéines libres globalement plus élevée que Karl.

4. Essais de germination

Le but de cette recherche était de mettre en évidence des différences de comportement variétal au niveau de la germination en fonction de la disponibilité en eau et de la teneur en protéines du grain. Cet objectif a été recherché par la mise en oeuvre d'essais de germination comprenant différentes analyses physiologiques (vitesse d'imbibition, faculté germinative, analyse quantitative des plantules) et d'essais de maltage qui ont permis de suivre les cinétiques de dégradation des hordéines par densitométrie de gels SDS-PAGE, ainsi que les modifications du caractère agrégatif des protéines par SE-HPLC.

L'excès de protéines gênant la bonne transformation de l'orge en malterie-brasserie, nous avons retenu le modèle variété à faible et forte teneur en protéines afin d'essayer de visualiser des différences au niveau des vitesses d'imbibition du grain et de la dégradation des hordéines au cours de la germination.

Nos résultats permettent de confirmer clairement que les protéines du grain d'orge, de par leur teneur et leur composition, jouent un rôle dans la germination. En particulier, une forte teneur en protéines paraît entraîner une vitesse d'hydrolyse plus lente des substrats.

Si l'on écarte les facteurs tels que le vieillissement naturel, l'importance des enveloppes du grain, on peut supposer que le retard de la dégradation des hordéines de grains riches en protéines par rapport aux grains pauvres en protéines de la même variété, de même que le retard observé pour le mutant Risø 56, est dû à une forte teneur en C-hordéines. D'une façon générale, celles-ci paraissent donc bien constituer une barrière à l'hydrolyse des substrats ou à la migration de l'eau, tandis que dans le cas particulier de Risø 56, le phénomène pourrait être encore accentué du fait de la quasi inexistence des B-hordéines chez Risø 56, qui ne jouent plus leur rôle de pores hydrophiles permettant une bonne diffusion de l'eau définis par Millet (1991).

La présence des protéines de réserve, et plus particulièrement des protéines à caractère hydrophobe, pourrait donc influencer, directement ou indirectement, la vitesse d'imbibition de l'eau, la migration de l'eau à travers les couches histologiques du grain ou, de manière plus générale, la disponibilité en eau des graines.

5. La microscopie : outil de caractérisation des protéines de réserve de l'orge

L'objet de cette recherche était de distinguer des différences de comportement inter- et intra-variétal (grains à teneurs contrastées en azote) dans la structure de la matrice protéique de l'albumen du grain d'orge, en nous intéressant aux relations que peuvent avoir les protéines de réserve avec les grains d'amidon. Pour répondre à cet objectif, trois grands types d'approches microscopiques ont été utilisées : la microscopie électronique à balayage, la microscopie photonique à fluorescence et la microscopie électronique à transmission associée à l'outil immunochimique.

Cette étude a été réalisée sur trois variétés : Triumph (qui nous sert de référence) et Volga (à deux niveaux d'azote) sont des orges à orientation brassicole, Risø 56 est une orge mutante quasi déficiente en B-hordéines. Le mutant Risø 56 nous a été fourni par H. Doll (Risø National Laboratory). Les grains sont étudiés à maturité et en cours de germination.

Nous avons mis en évidence l'existence, dans certaines régions du grain, d'une structure plutôt aérée du grain d'orge en observant en MEB un "décollement" de la matrice protéique à l'interface avec les grains d'amidon (**Figure 4**). Cette observation, qui résulte de la structure principalement farineuse de l'albumen de l'orge, est renforcée en MET par la présence d'espace au contact des grains d'amidon ainsi que dans la matrice intergranulaire.

Nous avons également vérifié la concentration des protéines de l'albumen dans la couche sous-aleuronique. Cette concentration apparaît plus importante, voire exclusive chez Risø 56.

En ce qui concerne les relations protéines de réserve - amidon, notre étude se situait dans un domaine très controversé. En effet, selon Baxter (1980), les protéines agrégées formeraient une matrice adhérente essentiellement autour des petits grains d'amidon. Ces protéines, insuffisamment dégradées, constitueraient une barrière à l'hydrolyse de l'amidon. Selon Martel (1988), le taux d'adhérence du matériel intergranulaire et/ou adhérent (MIA), majoritairement constitué des protéines de réserve, est fonction de certaines protéines, et notamment des C-hordéines fortement hydrophobes qui seraient préférentiellement associées aux grains d'amidon ; cet auteur suggère que dans le grain mature, les grains d'amidon partiellement masqués par le MIA seraient moins accessibles aux enzymes au cours du brassage. En utilisant la microanalyse par rayons X en MEB, Burgess *et al.* (1982) n'ont pas mis en évidence la présence de soufre clairement associée aux petits grains d'amidon. Les B-hordéines riches en soufre n'apparaîtraient alors pas intimement liées aux grains d'amidon. Il ressort de notre travail que ni la MEB, ni la microscopie photonique, telles que nous les avons utilisées, ne sont des outils parfaitement appropriés pour déterminer si les protéines sont éventuellement associées aux grains d'amidon, et quel est ce degré d'association. Au contraire, l'ICC montre que dans le cas des variétés normales étudiées, les protéines marquées sont localisées dans la matrice intergranulaire sous forme de plages, et peuvent être ponctuellement associées aux grains d'amidon, tandis que dans le cas du mutant Risø 56, ces protéines sont préférentiellement localisées dans des corps protéiques. Dans les deux cas, aucun marquage continu des hordéines B et/ou C autour des grains d'amidon n'a été observé. D'après nos résultats, les grains d'amidon n'apparaissent donc pas entourés d'une véritable gangue protéique, la présence de plages marquées au contact des grains d'amidon pouvant seulement suggérer des associations partielles entre protéines et amidon. Il reste cependant difficile de déterminer, d'après notre étude, quel est le degré d'association et lesquelles, des B-hordéines agrégées par des ponts disulfures, ou des C-hordéines impliquées dans des interactions hydrophobes, sont intimement liées aux grains d'amidon.

Nous pensons enfin que la localisation des hordéines au sein de la matrice protéique est liée à leur synthèse et à leur accumulation différentielles au cours de la maturation et qu'il existe un réarrangement spatial des hordéines en fin de maturation, probablement influencé par la présence des polypeptides de type B. De ce point de vue, le mutant Risø 56, déficient en B-hordéines, s'est présenté comme un modèle original d'approche des mécanismes d'accumulation des protéines de réserve dans l'albumen. Il semblerait que le réticulum endoplasmique ne soit pas le lieu d'agrégation et d'accumulation final des prolamines, au moins dans les phases tardives de la maturation, mais permet le transit des protéines via des vacuoles, sans que l'appareil de Golgi soit impliqué. Cette étude nous amène donc à écarter l'hypothèse d'une origine strictement réticulaire des corps protéiques. D'autre part, de la même façon qu'il

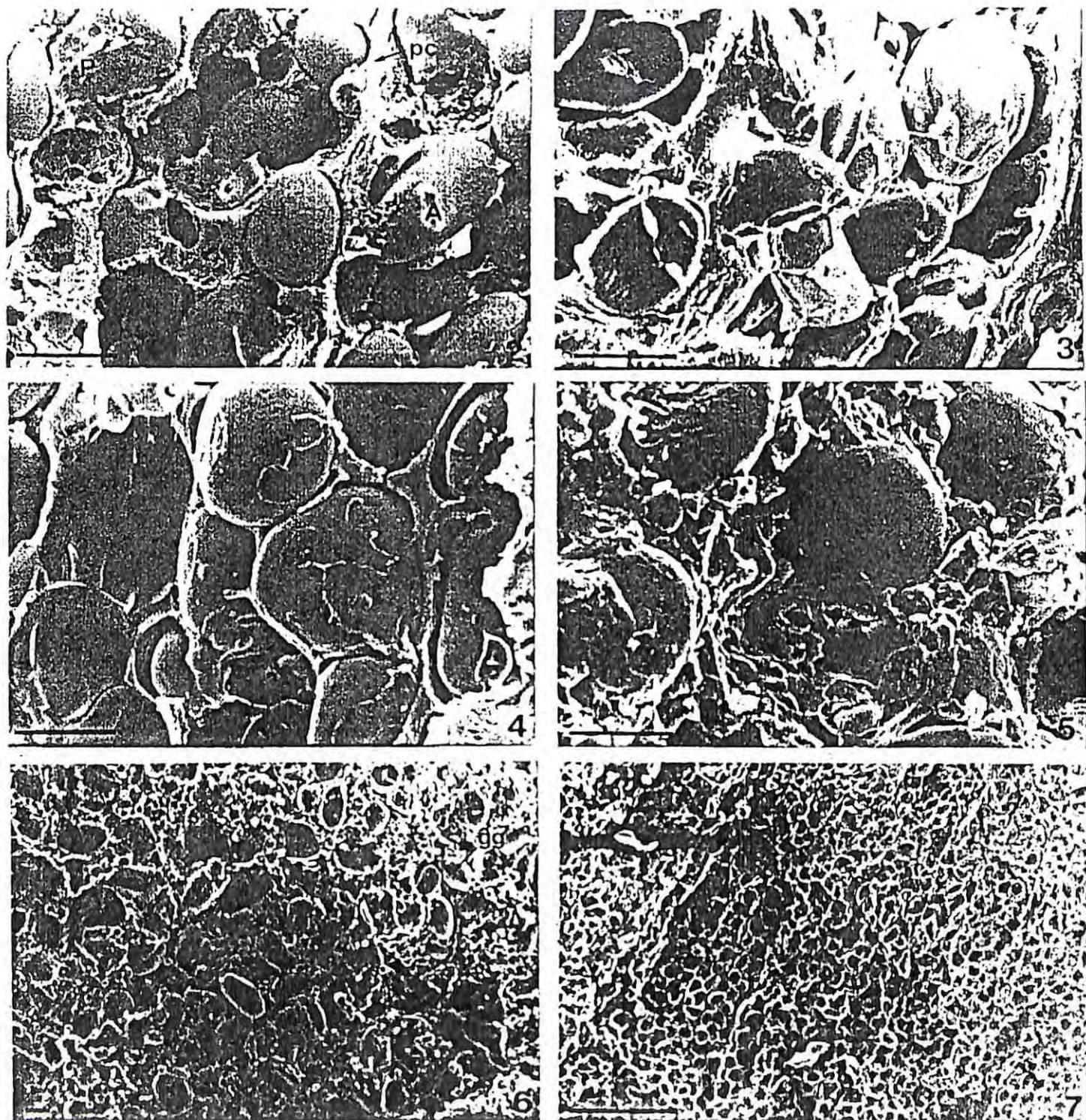


Figure 4. Observation en microscopie électronique à balayage d'albumen de grains d'orge non germés.

existe une cinétique de formation des cellules de l'albumen du centre à la périphérie, il semble exister une évolution différentielle de la maturation à l'intérieur du grain, de l'albumen central à la couche sous-aleuronique.

6. Conclusion de la deuxième partie

Les protéines de réserve de l'orge possèdent plusieurs caractéristiques remarquables au niveau de leur composition en acides aminés, de leur structure, de leur solubilité, de leur hydrophobicité et de leurs propriétés agrégatives. Certaines de ces propriétés sont naturellement liées à la variété d'orge considérée, notamment le profil électrophorétique des polypeptides hordéines qui constitue une véritable "empreinte digitale" de la variété, mais aussi aux variations agroclimatiques. Il existe ainsi une influence considérable des facteurs agronomiques et climatiques sur la teneur en protéines totales, mais également sur la proportion relative des différentes familles protéiques et sur leur niveau d'agrégation.

En examinant tout d'abord l'influence de la nutrition azotée, notre travail apporte des éléments nouveaux sur les relations entre le profil d'agrégation des protéines révélé en SE-HPLC et la qualité maltière. Tout en observant des spécificités dans le comportement des diverses variétés étudiées, nous montrons ainsi un accroissement de la teneur en fraction F4, riche en C-hordéines, en fonction de la teneur en protéines du grain. La corrélation négative observée avec plusieurs critères de la qualité du malt (extrait, indice Kolbach) indique que la fraction F4 est celle qui pourrait le mieux expliquer l'origine des différences de qualité maltière. Cependant, du fait de sa sensibilité aux variations de nutrition azotée, le test de quantification de la fraction F4 nous paraît être plus adapté à la discrimination de lots d'orge pour leur aptitude au maltage qu'au criblage de lignées en sélection variétale. Nous n'écartons pas pour autant le rôle des fractions hordéines les plus agrégées (B- et D-hordéines) dans la qualité, ces dernières contribuant pour leur part à diminuer la friabilité de l'albumen.

L'analyse de ces mêmes fractions protéiques au cours de la maturation a permis d'améliorer nos connaissances en matière de régulation du remplissage en azote du grain d'orge et notamment de l'influence du traitement azoté sur la stratégie d'accumulation de l'azote dès les stades précoces de la maturation du grain. D'une façon générale, la cinétique d'accumulation relative des B- et des C-hordéines, ainsi que le degré d'agrégation des polypeptides, sont dépendants de la fertilisation azotée, mais avec de grandes différences variétales. Ainsi, en mettant à profit la technique de marquage au ^{15}N , nous montrons qu'environ 80 % de l'azote des différentes familles protéiques du grain d'orge proviennent de la remobilisation de l'azote accumulé avant anthèse. Toutefois, une variété comme Karl arrête sa synthèse protéique plus tôt qu'une variété comme Traill, laquelle se distingue en outre par une accumulation tardive d'azote, y compris pendant la dessiccation du grain, et par une plus grande proportion de fractions C-hordéines et B-hordéines "libres" provenant d'une assimilation directe post-anthèse.

L'importance de la teneur et de la composition en protéines du grain d'orge, a été également mise en évidence au cours de la germination. L'étude particulière du mutant Risø 56, déficient en B-hordéines, a permis de conforter le modèle selon lequel une teneur excessive en protéines de réserve, mais particulièrement en protéines à caractère hydrophobe, réduit la vitesse d'imbibition du grain. Les C-hordéines paraissent donc bien constituer une "barrière" à la migration de l'eau et des substances solubles au travers des couches histologiques du grain, entraînant un retard dans la dégradation des réserves du grain et donc dans la germination de celui-ci.

L'approche biochimique et physiologique des protéines du grain d'orge a été complétée par différents types d'examen microscopiques qui visaient initialement à localiser les hordéines et à préciser leur degré d'association avec les grains d'amidon. Malgré la mise en œuvre de techniques originales, permettant l'examen de coupes de grains d'orge matures, cet objectif n'a pu être atteint ni par la microscopie photonique, ni par la microscopie électronique à balayage. L'introduction de l'outil immunocytochimique a toutefois permis de montrer que, chez les variétés normales, les hordéines pouvaient être ponctuellement associées aux grains d'amidon, tandis que chez le mutant Risø 56, elles étaient préférentiellement localisées dans des corps protéiques demeurés intacts à maturité. Dans les deux cas, aucun marquage continu des hordéines B ou C autour des granules d'amidon n'a été découvert, ce qui tend à infirmer

l'hypothèse selon laquelle les hordéines formeraient une barrière physique à l'hydrolyse de l'amidon. L'examen de l'albumen du mutant Risø 56 a permis enfin d'effectuer de nouvelles observations sur les mécanismes d'accumulation des protéines de réserve du grain d'orge, nous amenant à écarter l'hypothèse d'une origine strictement réticulaire des corps protéiques.

Dans l'ensemble, ce travail a donc permis d'obtenir une meilleure compréhension de certaines des bases physico-chimiques de la qualité maltière des orges en relation avec les phénomènes qui ont lieu au cours de la germination du grain d'orge et du maltage industriel. Sans qu'il faille négliger la part des constituants non protéiques du grain, non étudiés dans le cadre de cette thèse, ni écarter le rôle des protéines très agrégées (B- ou D-hordéines), les observations effectuées grâce aux approches biochimique, agronomique, physiologique et microscopique, vont toutes dans le sens d'un rôle négatif des fractions de type C-hordéines dans la germination du grain d'orge et dans l'expression de la qualité du malt. Le caractère particulièrement hydrophobe de ces C-hordéines, leur présence dans la matrice intergranulaire de l'albumen, ainsi que leur plus forte proportion dans les grains riches en protéines, contribuent à retarder la germination du grain tout en affectant l'homogénéité de cette germination et s'opposent donc à l'obtention d'un malt de bonne qualité.

L'identification d'un rôle négatif de cette famille de constituants protéiques ouvre, à notre avis, la voie à une meilleure maîtrise de la qualité en malterie :

- soit par l'optimisation du processus de maltage,
- soit par la maîtrise de certaines pratiques culturales,
- soit enfin par la sélection de lots d'orge sur la base de la composition des protéines en SE-HPLC, d'autant que cette analyse rapide peut être réalisée sur le grain sans qu'il soit besoin de recourir à un micromaltage.

Conclusions

Grâce à un dispositif expérimental intégrant différents types variétaux (notamment des variétés (Karl et Traill) qui n'ont pas la même stratégie d'accumulation de l'azote), différents niveaux de fertilisation et dates d'application, le marquage isotopique au ^{15}N , et grâce à la mise en oeuvre de techniques physico-chimiques de pointe permettant de déterminer la capacité agrégative des protéines (SE-HPLC), et leur localisation histologique (microscopie électronique, immunocytochimie), des conclusions originales ont pu être dégagées. On retiendra notamment les points suivants :

- compréhension des différences dans le mécanisme d'accumulation de l'azote entre les variétés Karl et Traill, et notamment mise en évidence du rôle des parties végétatives de Traill, capables d'accumuler plus d'azote et d'en redistribuer davantage vers les grains, ainsi que d'un équilibre entre l'absorption post-anthèse et la remobilisation de l'azote de la tige.
- confirmation du rôle de l'azote tardif sur l'augmentation de la quantité d'azote par les grains sur la plante entière ou par unité de surface.
- mise en évidence de relations entre le profil d'agrégation des protéines révélé en SE-HPLC et la qualité maltière, avec identification d'une fraction riche en C-hordéines jouant un rôle négatif dans la germination du grain d'orge et dans l'expression de la qualité du malt.
- nouvelles données sur la localisation histologique des C-hordéines permettant d'écarter pour ces dernières toute responsabilité dans la limitation de l'accès des amylases aux granules d'amidon et de suggérer plutôt un rôle de barrière hydrophobe à la migration de l'eau et des substances solubles au cours de la germination.

Des conclusions plus générales peuvent être tirées, soit au niveau de la *qualité de la semence*, soit au niveau de la *qualité des lots d'orge en malterie-brasserie*. En effet, les degrés d'agrégation et d'hydrophobicité étant globalement plus élevés pour les variétés d'hiver, il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie le modèle orge d'hiver/orge de printemps afin de tenter d'expliquer quelles peuvent être les propriétés des protéines impliquées dans les différences de comportement observées dans les essais de germination. D'autre part, cette étude

pourrait répondre à plus long terme à l'une des préoccupations des malteurs qui est l'appréciation de la qualité de répartition de l'eau dans le grain, une répartition homogène étant nécessaire à la réussite de la phase de trempage.

LISTE DES PUBLICATIONS

- BÉNÉTRIX F. - 1993. Étude biochimique, ultrastructurale et agronomique de la qualité de l'orge : rôle des hordéines. Thèse de Doctorat, École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 125p.
- BÉNÉTRIX F., BOUCHET B., GALLANT D.J. and LAURIÈRE M. - 1994. Immunolocalization of storage proteins in mature normal and B-hordein deficient barley (*Hordeum vulgare* L.) lines. *J. Cereal Sci.* (submitted)
- BÉNÉTRIX F., KAAAN F. and AUTRAN J.C. - 1994. Changes in protein complexes of durum wheat in the developing seed. *Crop Science*, 462-468.
- BÉNÉTRIX F., SARRAFI A. and AUTRAN J.C. - 1994. Effects of genotype and nitrogen nutrition on protein aggregates in barley. *Cereal Chem.*, 70 (1), 75-82.
- CALMÉ J.C. - 1993. Contribution de l'assimilation tardive et de la remobilisation de l'azote à son accumulation dans l'épi chez deux variétés d'orge distinctes par leur teneur en protéines du grain. Thèse de Doctorat, École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- SCHEROMM P., MARTIN G., BERGOIN A. and AUTRAN J.C. - 1992. Influence of nitrogen fertilization on the potential bread-baking quality of two cultivars differing in their responses to increasing nitrogen supplies. *Cereal Chem.*, 69 (6), 664-670.