

Application de la SPIR en sélection : les composés mineurs du soja et du tournesol

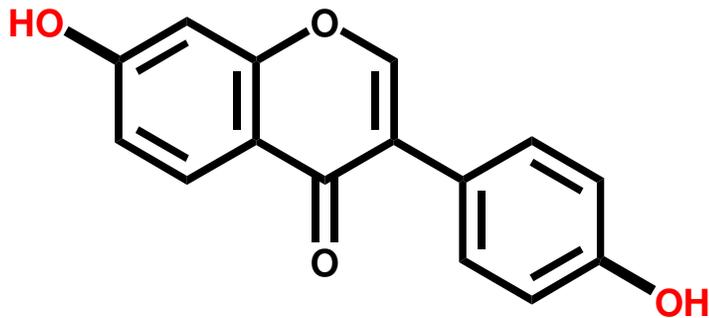
Olivier SUREL, Anne CALMON, Monique BERGER

Enjeux

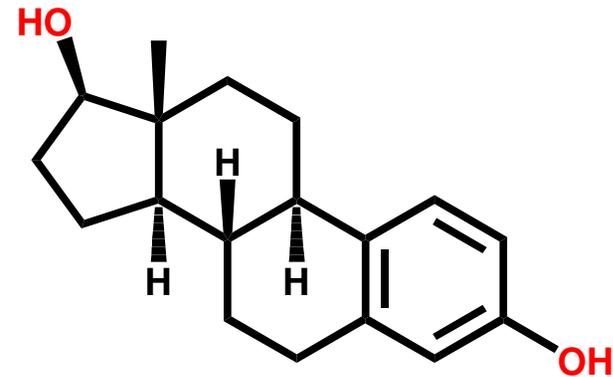
- Aliments fonctionnels => intérêt pour les propriétés santé des composés mineurs
- Deux sujets développés ici :
 - Isoflavones du soja (Projet UMR 1054 El Purpan/INRA, PA3S, ONIDOL, Région Midi Pyrénées)
 - Tocophérols et phytostérols du tournesol (Projet El Purpan Sélectionneurs (ASEDIS-SO), ONIDOL, ENSAT)

Les isoflavones du soja

- Structure reconnue par les récepteurs oestrogéniques



Isoflavones



17-β-estradiol

Les isoflavones du soja

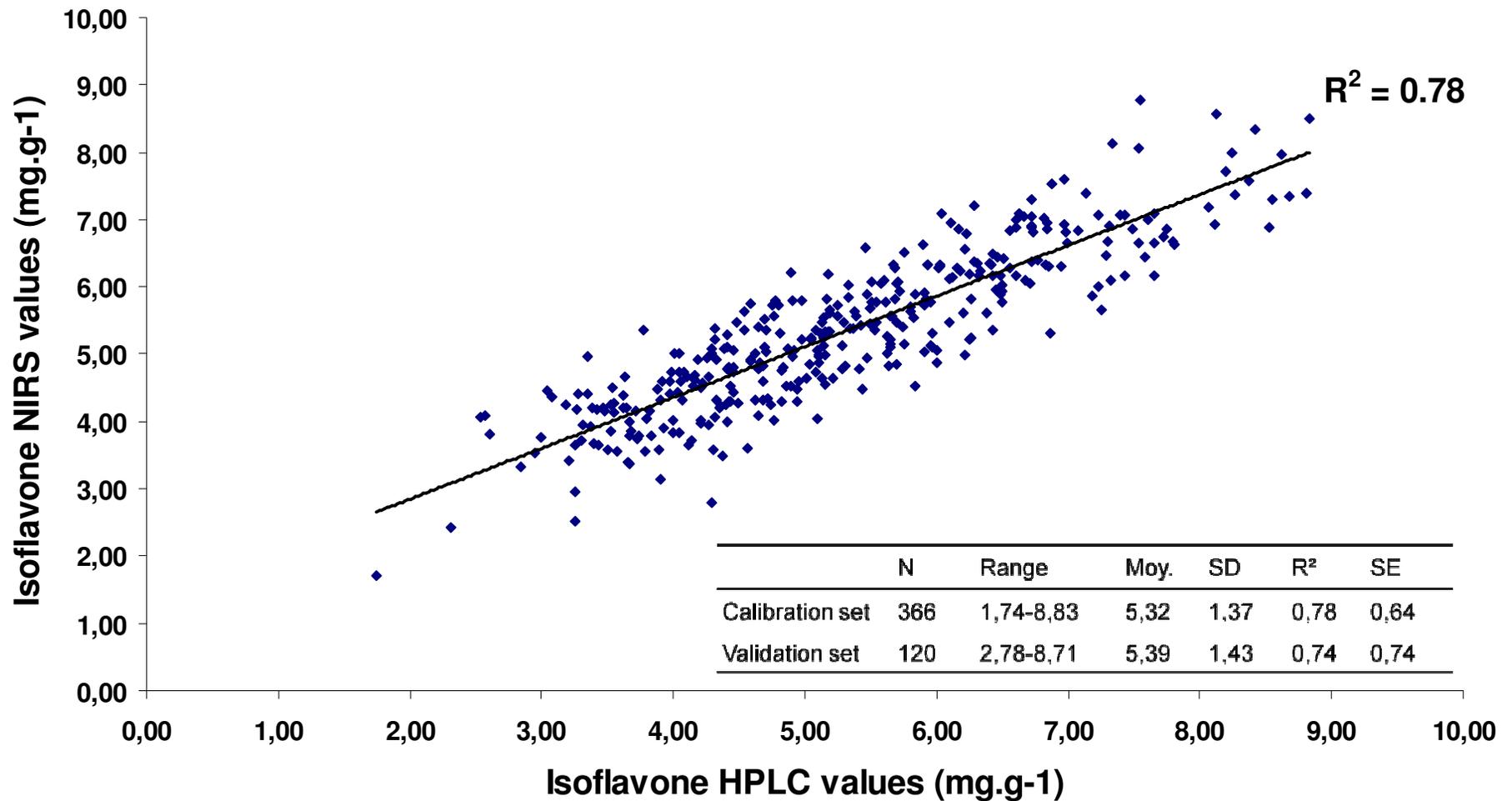
- Effets santé (études épidémiologiques, essais cliniques, étude des mécanismes d'action)
 - Prévention de cancers hormono-dépendants (sein, prostate)
 - Atténuation des troubles de la ménopause
 - Effet sur le syndrome métabolique

- Calibration sur graines entières
 - Collection 162 lignées (2 lots/lignée) dont 35 ont été cultivées sur 2 lieux , deux années consécutives (4 lots/lignée)et 2 cultivées sur 9 lieux avec 3 répétitions par lieu (27 lot/lignée)
 - = 518 échantillons de graines entières (200g env. par échantillon)
- Analyses HPLC (méthode de référence)
 - Teneurs de 1,74 – 10,35 mg.g-1
 - Moyenne : 5,33 ; écart-type : 1,41 mg.g-1

- Spectres
 - FOSS NIR System 6500, de 400 à 2500 nm (tous les 2nm)
- Traitement des spectres
 - Utilisation des dérivées premières, SNV et detrend
 - Les extrêmes (> 3 , distance de Mahalanobis) ont été supprimés (N final = 486 spectres)
 - Calcul par réseaux de Neurones (WinISI)
 - Les modèles ont été calculés en tirant au sort 2 sets (375 pour l'apprentissage et 125 pour la validation)

Les isoflavones du soja

Représentation du set de calibration (meilleur modèle)





- La calibration ne permet pas une véritable prédiction (erreur de prédiction trop élevée, $R^2 = 0,74$)
- Utilisation pour sélectionner des lignées selon leur teneur en isoflavones. Héritabilité des teneurs élevées ($h^2 > 0,6$)

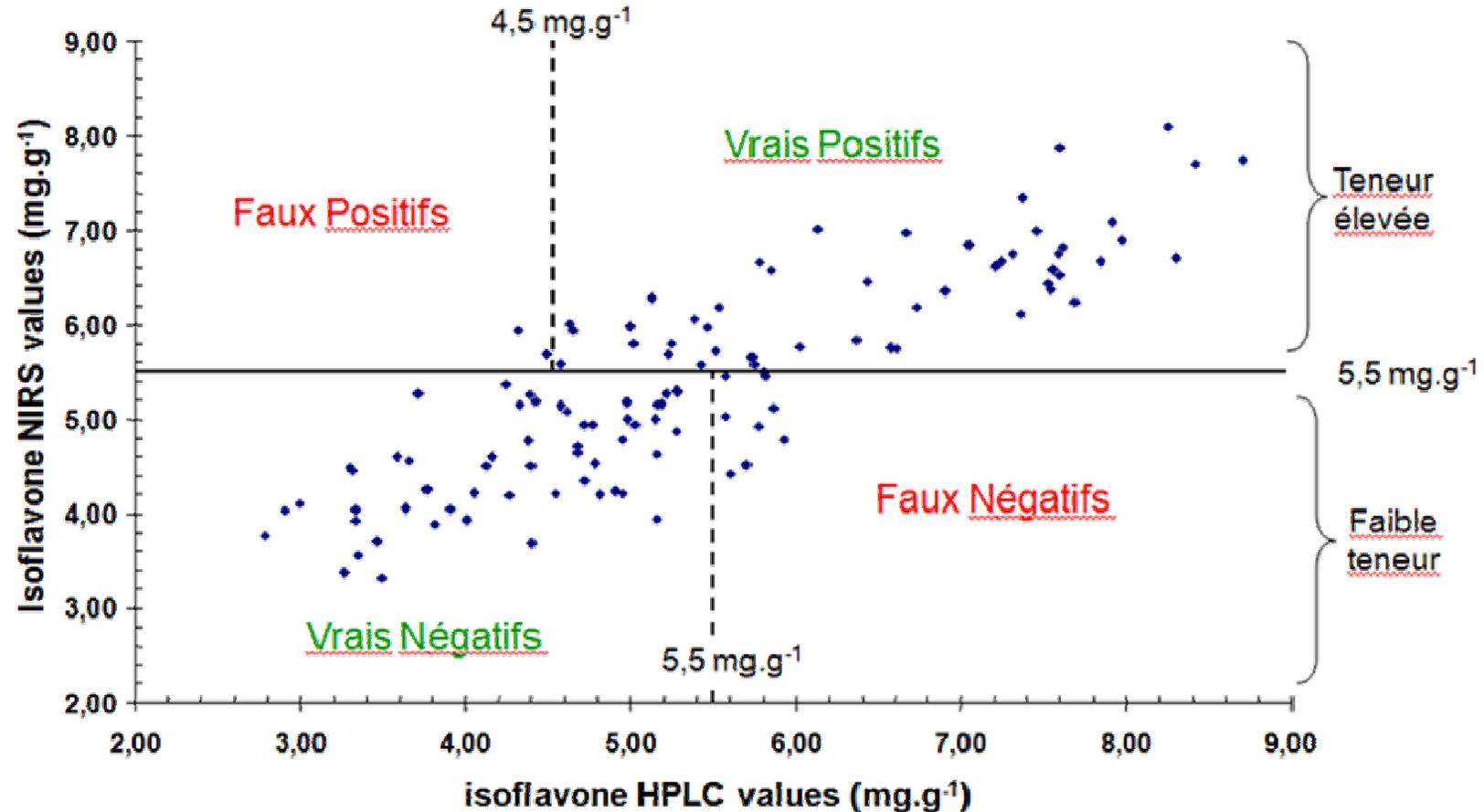
Utilisation de SPIR : non destructive, utilisable sur un grand nombre d'échantillons

Les isoflavones du soja

- Objectif :
 - ne pas sélectionner de lignées de teneur $\leq 4,5 \text{ mg.g}^{-1}$
 - ne pas éliminer de lignées de teneur $> 5,5 \text{ mg.g}^{-1}$
- Classification selon la valeur prédite
 - Positif = teneur prédite $> 5,5 \text{ mg.g}^{-1}$ (critère de sélection)
 - VP : Vrai positif = teneur référence $> 4,5 \text{ mg.g}^{-1}$
 - FP : Faux positif = teneur référence $\leq 4,5 \text{ mg.g}^{-1}$
 - Négatif = teneur prédite $\leq 5,5 \text{ mg.g}^{-1}$
 - VN : Vrai Négatif = teneur référence $\leq 5,5 \text{ mg.g}^{-1}$
 - FN : Faux Négatif = teneur référence $> 5,5 \text{ mg.g}^{-1}$

Les isoflavones du soja

- Méthode qualitative



Résultats

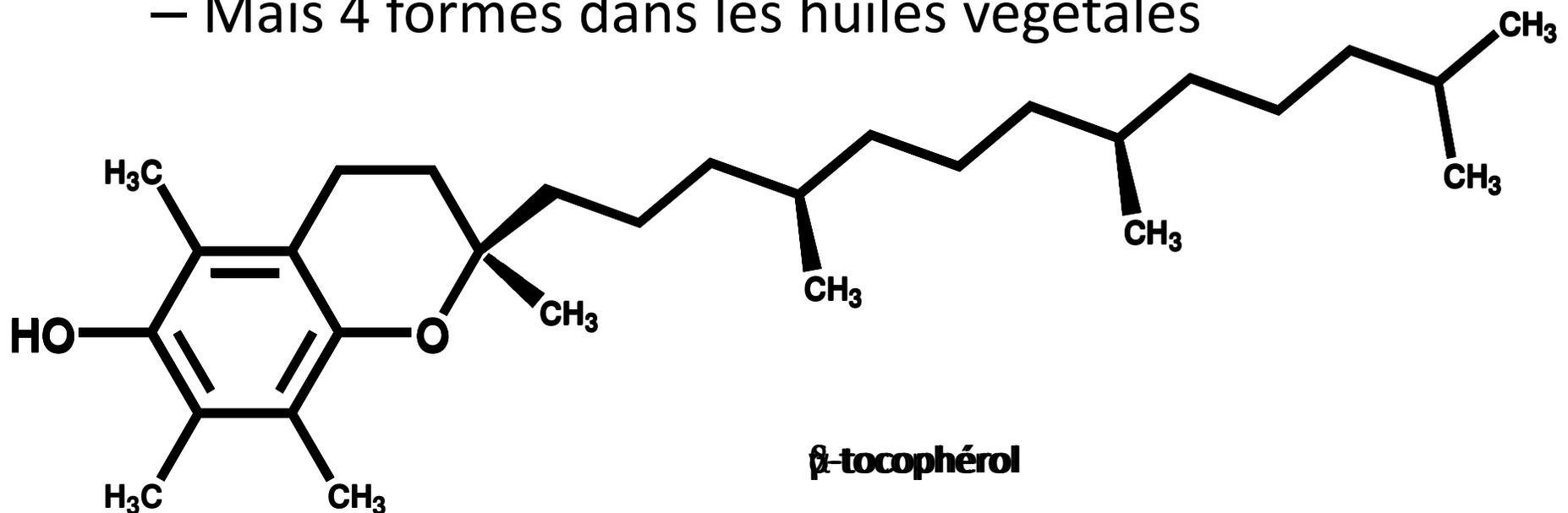
FP 2	VP 52	Total Positifs Préd. 54
VN 58	FN 8	Total Négatifs Pred. 66
Total Négatifs Réf. 57	Total Positifs Réf. 57	Total 120

Les isoflavones du soja

- Qualité de la prédiction (set de validation)
 - % de positifs détectés: 96,3%
 - % de négatifs détectés : 87,9%
 - Sensibilité : Vrais Positifs/ (Vrais Positifs + Faux Négatifs) = 86,7%
 - Spécificité : vrais négatifs/(Vrais négatifs + faux positifs) = 96,7%
 - Efficience : (vrais positifs + vrais négatifs)/total = 91,7%

Les tocophérols du tournesol

- Tocophérol = Vitamine E
 - Seul l' α -Tocophérol est reconnu par les transporteur membranaire (activité vitaminique)
 - Mais 4 formes dans les huiles végétales



Les tocophérols du tournesol

- Le tournesol est le seul oléagineux riche en tocophérols (de 440 à 1200 mg.kg⁻¹ d'huile) dont 96% d'α-tocophérol
(colza = même quantité totale de tocophérol, mais seulement 25% d' α-tocophérol)
- 2 programmes développés au laboratoire
 - Étude de la variabilité des teneurs en tocophérol, déterminisme génétique (thèse A. Ayerdi, 2008)
 - Recherche de QTL liés à la teneur en tocophérol

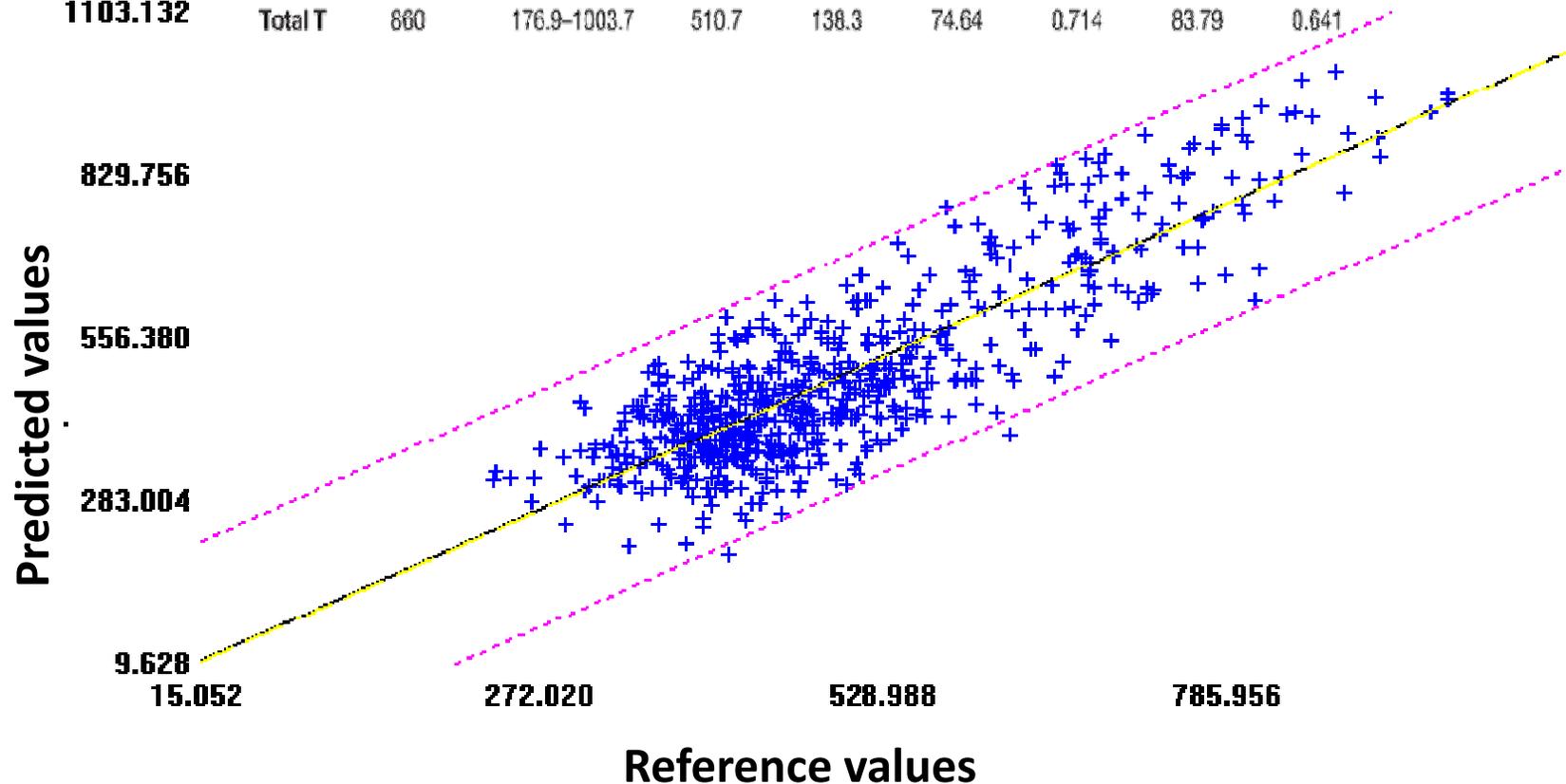
Les tocophérols du tournesol

- Étude de la variabilité des teneurs en tocophérol, déterminisme génétique
- Résultats principaux :
 - Héritabilité suffisante pour envisager un programme de sélection
 - Préparation d'une calibration SPIR

- Calibration sur graines broyées (pb. absorption de l'IR par les akènes noires)
 - 1060 échantillons (30g) issus de 3 années de récolte sur 50 lieux en France (hybrides + lignées)
- Analyses HPLC (méthode de référence) après extraction d'huile (Soxhlet)
 - Teneurs tocophérol totaux de 190 – 1180 mg.kg⁻¹ huile (mini 95% α -tocophérol)
- Spectres
 - FOSS NIR System 6500, de 400 à 2500 nm (tous les 2nm)
- Prédiction par PLS Modifiée (WinISI) sur dérivées primaires (SNV et détrend)

Les tocophérols du tournesol

	Calibration sets				Calibration		Cross-validation		
	NS ⁶	Range	Mean	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR	
	Tocopherols								
1103.132	α -T	855	153.1–957.7	488.7	136.2	70.33	0.742	82.28	0.653
	Total T	860	176.9–1003.7	510.7	138.3	74.64	0.714	83.79	0.641



- Recherche de QTL liés à la teneur en tocophérol dans la graine (collaboration avec l'ENSAT (A. Sarrafi), Thèses Asa Ebrahimi et Param Haddadi)
 - Utilisation d'une ségrégation de lignées recombinantes fixées (RILs)
 - 97 lignées + leurs parents (PAC2 et RHA266) dans 2 essais (Split plots champ, Irrigué, sec, sur deux années avec 3 rep/année) = 600 échantillons
 - 495 marqueurs (304 AFLP et 191 SSR) : densité moyenne = un locus/3,7 centiMorgan
 - Détermination des tocophérols individuels et totaux par SPIR
 - Analyses de références sur 10% des échantillons (60 analyses)
 - Reprise de ces résultats dans la calibration

Conclusion

- Difficultés particulières liées à l'analyse par SPIR des composés mineurs
 - Faibles teneurs
 - Présences de multiples formes et conjugaison
 - Erreurs analytique des mesures de références de l'ordre de 10% => erreur de prédiction trop élevée pour avoir une prédiction quantitative utilisable directement
- Cependant :
 - possibilité de sélection en utilisant un seuil décalé (sélection précoce du soja pour la teneur en isoflavones)
 - Amélioration de la qualité de prédiction en analysant 10% des échantillons par la méthode de référence => précision suffisante pour détecter des QTL

MERCI DE VOTRE ATTENTION

