
**CARACTÈRES BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES IMPLIQUÉS DANS LES
VARIATIONS DE DIGESTIBILITÉ DE PAROI : DE L'ÉTUDE DE LEUR
VARIABILITÉ À CELLE DE LEUR DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE
MISE À JOUR DES CIBLES MAJEURES D'AMÉLIORATION DE LA
DIGESTIBILITÉ DANS UN CONTEXTE DE FORT RENDEMENT CHEZ LES
HYBRIDES MODERNES DE MAÏS FOURRAGE**

Thèse de Paul-Louis **LOPEZ-MARNET**¹

Analysée par André **GALLAIS**²

Directeur de thèse : Valérie **MECHIN**, Directrice de Recherche INRAE, Versailles

Co-encadrants : Matthieu **REYMOND**, Directeur de Recherche INRAE, Versailles

Cadre de l'étude

En France, le maïs utilisé en ensilage de la plante entière est la première plante fourragère cultivée : avec environ 1 500 000 ha, il représente la moitié des surfaces en maïs. Cette importance de la culture est due à plusieurs qualités de la plante : culture bien maîtrisée, standardisée, ensilage facile à réaliser et de forte concentration énergétique. Il est essentiellement destiné aux bovins (vaches laitières et taurillons). Au stade réalisé de l'ensilage (environ 30 % de matière sèche), c'est en fait un aliment qui est composé d'un mélange de grains et d'une partie végétative non grain, en proportion pratiquement égales. Sa valeur alimentaire (produit de la quantité consommée par la digestibilité) dépend donc de la proportion de grains, qui est à forte concentration énergétique, mais aussi de la qualité de la partie non grain. Jusqu'à une époque assez récente, les variétés utilisées pour la production d'ensilage étaient les mêmes que celles utilisées pour la production de grain. Depuis 1985, les variétés de maïs mieux adaptées à l'ensilage peuvent être inscrites au Catalogue officiel des variétés, avec la mention « maïs fourrage ». En effet, il est apparu des différences assez importantes entre variétés du point de vue de la valeur alimentaire. De plus, avec la sélection pour la résistance à la verse, augmentant la teneur en lignine des tiges, il y avait le risque d'avoir des variétés grains avec une mauvaise qualité de la partie non grain. Depuis les années 1985-90, une véritable sélection pour des variétés de maïs mieux adaptées à l'ensilage s'est développée.

Pour sélectionner en fonction de la valeur alimentaire de la plante entière au stade ensilage, on peut étudier la digestibilité *in vitro* de la matière sèche, d'où il sera possible de déduire la valeur alimentaire de la plante entière, mais il est aussi possible de s'intéresser à la qualité de la partie non grain de la plante entière. Pour les deux approches, il faut que le sélectionneur dispose d'outils permettant une étude assez facile et rapide d'un grand nombre de génotypes : on peut parler de phénotypage « haut débit » pour la valeur alimentaire. Pour que la sélection soit efficace, une variabilité génétique des caractères étudiés est aussi nécessaire. Pierre-Louis Lopez-Marnet a donc réalisé un travail en trois grandes étapes : 1) mise au point d'outils de mesure des paramètres de la valeur alimentaire, d'abord en modifiant la méthode classique de mesure de la digestibilité *in vitro* de la plante entière pour qu'elle soit plus facile à mettre en œuvre et plus rapide que les méthodes existantes, puis en recherchant des

¹ Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Saclay, Ecole Doctorale ABIES N° 581, préparée à l'Institut Jean-Pierre Bourgin, CNRA, Route de Saint-Cyr, 78000 Versailles, soutenue le 10/12/2021

² Membre de l'Académie d'agriculture de France, Section 1 « Productions végétales »

paramètres biochimiques et histologiques de la digestibilité de la paroi cellulaire faciles à mesurer ; 2) étude de la variabilité génétique des caractères considérés et 3) étude des bases génétiques de ces caractères.

Amélioration de la méthode de digestibilité in vitro de la matière sèche de la plante entière.

La digestibilité de la plante entière est utilisée comme critère de sélection de la valeur alimentaire. La méthode de référence est la méthode « Aufrère » (1983). Les modifications apportées à cette méthode par Paul-Louis Lopez-Marnet aboutissent à une version améliorée, fidèle, fiable, à haut débit et facile à mettre en œuvre dans tous les laboratoires d'analyses. Le protocole mis au point permet de diminuer les volumes de matière sèche à analyser, facilite son déploiement au laboratoire et augmente le débit d'analyse. Le travail réalisé montre le rôle clé de l'étape de gélatinisation dans le protocole d'estimation de cette digestibilité. La gélatinisation est en effet une étape essentielle puisqu'elle permet une meilleure accessibilité aux molécules d'amidon pour leur hydrolyse ultérieure. Ce travail a été valorisé par une publication dans la revue « Plant Methods ».

Recherche de paramètres histologiques de la digestibilité de la paroi cellulaire

Le second développement analytique réalisé par Paul-Louis Lopez-Marnet concerne la mise au point d'une méthode automatique d'analyse d'images de coupes transversales d'entrenœuds colorés au FASGA³ ; cette méthode est basée sur l'analyse d'images par la tomographie. Elle permet une segmentation des tissus histologiques et reflète les différences dans les propriétés de la paroi cellulaire de chaque tissu. Elle ne nécessite pas de paramétrisation pour chaque image, ce qui augmente le débit d'analyse ; de plus, elle permet une très bonne reproductibilité pour chaque image ainsi qu'une comparaison directe de la segmentation entre plusieurs images. La finesse et l'automatisation de la caractérisation et de la quantification des tissus conduisent à une méthode très puissante : ainsi, elle met en évidence automatiquement 44 tissus distincts : 29 tissus dans l'écorce, 10 tissus dans la moëlle et 5 tissus dans les faisceaux libéro-ligneux. Ce travail a été soumis pour publication dans la revue « Plant Methods ».

Etude de la variabilité génétique de critères de la digestibilité de la matière sèche

Avec les deux méthodes d'analyses haut débit mises au point, 80 hybrides modernes de maïs fourrage précoces ont été étudiés pour leur rendement en matière sèche, leurs digestibilités, leur composition biochimique et la répartition tissulaire de leur lignification. Ce dispositif a permis de mettre en évidence la variation génétique des caractères analysés, nécessaire pour toute sélection. Les liaisons entre les différents caractères considérés ont ainsi pu être étudiées.

Les digestibilités de la matière sèche et de la paroi cellulaire ne sont pas apparues liées négativement au rendement en matière sèche (elles y sont même faiblement liées positivement). L'augmentation du rendement par la sélection ne se fait donc pas nécessairement au détriment de la digestibilité de la matière sèche. Le rendement tend néanmoins à être corrélé positivement avec la teneur en lignine. Cette corrélation reste assez faible mais il faudra veiller à ce que la sélection pour une faible teneur en lignine n'impacte pas négativement le rendement.

Les variations de la digestibilité de la matière sèche sont principalement expliquées par les variations de la teneur en paroi cellulaire couplées aux variations de la digestibilité de cette paroi. La paroi cellulaire étant principalement constituée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine, c'est la teneur en lignine qui est le facteur principal limitant la digestibilité. Néanmoins la lignine est essentielle aux propriétés agronomiques de la plante tant dans sa résistance à la verse que dans sa résistance aux stress biotiques ou abiotiques. L'étude d'autres paramètres biochimiques ou histologiques permettant d'améliorer la digestibilité est nécessaire. La répartition des tissus lignifiés au sein d'une coupe transversale d'entrenœuds des tiges semble être une voie intéressante pour l'amélioration de la digestibilité. En effet, il apparaît que trois types de paramètres, des paramètres biochimiques comme la

³ Fucsina, Alcian Bleu, Safranina, Glycerina, Aqua

teneur en lignine dans la paroi, la structure des lignines, et certains paramètres histologiques ont un rôle important dans l'explication des variations de digestibilité de la paroi cellulaire.

Suite à ces études, l'idéotype d'un maïs ensilage avec une bonne digestibilité de la tige apparaît comme un maïs avec une teneur assez faible de lignine dans la paroi, et une proportion élevée de tissus non lignifiés très digestibles dans sa moëlle. Avec l'outil utilisé, un hybride avec des parois cellulaires digestibles doit avoir dans la moëlle des tissus colorés en bleu au FASGA et facilement digestibles. Ainsi, la sélection de plantes avec une grande surface de tissus colorés en bleu au sein du parenchyme médullaire aurait pour effet d'augmenter la digestibilité des parois mais pourrait aussi favoriser le rendement.

Recherche des bases génétiques (QTL) des caractères étudiés

Cette étude a été réalisée au sein d'une population de lignées recombinantes (RIL) issue du croisement de deux lignées contrastées pour leur profil histologique : la lignée F4 (lignée française cornée de bonne digestibilité à la moëlle colorée en bleu par la méthode FASGA) et la célèbre lignée F7 (lignée cornée de bonne digestibilité à la moëlle colorée en rose-rouge). Elle a porté sur des caractères liés à la digestibilité de la matière sèche, la composition des parois et la répartition tissulaire de la lignification.

De nombreux QTL (Quantitative Trait Loci ou locus à effet quantitatif) ont été détectés avec des colocalisations de nombreux QTL de caractères liés à la digestibilité. Trois QTL de la coloration bleu vs rouge de la moëlle ont été mis en évidence. Les plus « gros » QTL trouvés pour la digestibilité de la paroi ou de la matière sèche colocalisent avec des QTL de la teneur en paroi non digestible, de la teneur en paroi digestible, de la teneur en lignine et de la teneur en acide p-coumarique. Certaines de ces colocalisations se situent dans des régions déjà identifiées dans d'autres analyses QTL. Malgré les faibles corrélations entre les caractères histologiques et biochimiques dans la population de RIL, des co-localisations existent pour les différentes digestibilités et pour les pourcentages de tissus de la moëlle. De plus, sur le chromosome 10, il apparaît une colocalisation des QTL des surfaces de tissus rouges ou bleus de la moëlle avec la teneur en acide p-coumarique. Cette position serait intéressante à considérer pour la recherche d'un gène candidat modulant la répartition de la teneur en acide p-coumarique à l'échelle tissulaire.

Parmi les gènes candidats possibles, le mutant Eskimo est discuté. En effet, avec la méthode FASGA, ce mutant entraîne la coloration complètement bleue du parenchyme médullaire, comme celle présentée par la lignée F4 ; il code pour une xylane O-acétyltransférase. Malheureusement, la position de ce gène ne correspond pas à l'un des QTL détectés. Il faudrait considérer toute la famille de gènes Eskimo pour savoir si l'un d'eux colocalise avec l'un des QTL détectés. Au-delà du maïs, comme cette variation génétique de lignification du parenchyme est également observée chez le sorgho, on peut se poser la question de savoir si des mécanismes communs à différentes espèces de graminées sont impliqués dans la lignification du parenchyme médullaire.

Conclusion

Les différentes études réalisées par Paul-Louis Lopez-Marnet montrent qu'en considérant le rendement et les paramètres de digestibilité de la paroi, il est tout à fait possible de combiner, au stade ensilage, un bon rendement en matière sèche avec une bonne valeur alimentaire. Pour atteindre cet objectif, la teneur en lignine est un critère insuffisant de la digestibilité de la paroi : une trop faible teneur en lignine entraîne une perte des performances agronomiques (rendement plus faible et verse plus importante) et une trop forte teneur en lignine des parois peut avoir un effet négatif sur la valeur alimentaire. Pour associer rendement en matière sèche de la plante entière et valeur alimentaire au stade ensilage, il faut considérer la distribution des lignines au sein des tissus de la tige, distribution qui est révélée par l'analyse histologique mise au point.

Grâce au travail de Paul-Louis Lopez-Marnet, le sélectionneur de maïs ensilage dispose donc d'outils, assez faciles à mettre en œuvre dans le processus de sélection, pour combiner rendement en matière sèche de la plante entière et valeur alimentaire au stade ensilage. Au-delà des aspects appliqués pour

la sélection du maïs ensilage, ce travail ouvre aussi des pistes de recherches sur les bases génétiques du processus de lignification.

La qualité et l'importance du travail expérimental présenté dans cette thèse, qui a fait appel à la biochimie, à l'histologie, à la génétique, avec le suivi d'expérimentations sur le terrain, complété par le traitement statistique de nombreuses données, méritent que cette étude figure sur le site de l'Académie, à titre de valorisation.

Mots clés : maïs ensilage, digestibilité, paroi cellulaire, histologie, biochimie, génétique sélection

Publications à Comité de lecture

P-L Lopez-Marnet, S. Guillaume, M.P. Guillemot, M. Reymond, V. Méchin, 2021. – High throughput accurate method for estimating in vitro dry matter digestibility of maize silage. *Plant Methods*. DOI : 10.1186/s13007-021-00788-5.

P-L. Lopez-Marnet, S. Guillaume, V. Méchin, M. Reymond, 2022. – A robust and efficient automatic method to segment maize FASGA stained stem cross section images to accurately identify histological variation. *Plant Methods* (soumis).