

## DE LA POLLINISATION À LA FORMATION DES GRAINES : LE CAS DU CHATAIGNIER

Thèse de Clément **LARUE**<sup>1</sup>

Analysée par Yves **LESPINASSE**<sup>2</sup>

Directeur de thèse : Rémy **PETIT**, directeur de recherches, INRAE

Cette thèse CIFRE, gérée et subventionnée par l'ANRT, a débuté en mai 2018. Elle s'intègre aux recherches menées par le pôle arboriculture d'Invenio, la station d'expérimentation de la filière Fruits et Légumes en Nouvelle Aquitaine, qui visent à améliorer la production de fruits des vergers. Les expérimentations se sont déroulées dans les vergers expérimentaux d'Invenio à Douville (Dordogne) et dans la collection INRAE de ressources génétiques du châtaignier de la Grande Ferrade à Villenave d'Ornon (Gironde). Les travaux présentés ont été réalisés au sein de l'UMR Biogeco, dans l'équipe Ecogère, sous la direction de Rémy Petit. Après une introduction générale, cinq chapitres sous forme d'articles ou projets d'articles en anglais, complétés par des résultats plus récents rédigés en français, sont présentés, suivis d'une discussion générale et d'une conclusion.

En introduction, Clément Larue présente le châtaignier occidental *Castanea sativa*, un arbre de premier plan à la fois forestier et fruitier. Face aux deux principales maladies, l'encre et le chancre de l'écorce venues d'Asie, les châtaigniers japonais (*Castanea crenata*) et chinois (*Castanea mollissima*) ont été utilisés par hybridation, car ils sont plus résistants. Deux porte-greffes ont été sélectionnés, 'Marsoi' et 'Maraval', et plusieurs variétés fruitières comme 'Marigoule' et 'Bouche de Bétizac', qui représentent désormais la majorité des vergers du sud-ouest de la France.

Le châtaignier est monoïque : les fleurs mâles et femelles se trouvent sur le même arbre mais nettement séparées ; les chatons mâles sont soit unisexués, soit androgynes avec dans leur partie supérieure, une succession de fleurs mâles et à la base du chaton, les fleurs femelles groupées généralement par trois. Les bogues du châtaignier contiennent presque toujours trois fruits. Le châtaignier étant largement auto-stérile, la pollinisation croisée est quasiment obligatoire. Les mécanismes identifiés sont tout d'abord une auto-incompatibilité de type prézygotique ; ensuite, en cas de fécondation par l'auto-pollen, une dépression de consanguinité précoce aboutit fréquemment à l'avortement de l'embryon. Il existe deux types différents : des individus mâle-stérile reconnus grâce à leurs étamines plus courtes et des anthères souvent avortées, et des individus bisexués, aux étamines plus longues et aux anthères bien développées.

**Le Chapitre 1** présente une boîte à outils pour l'étude de la pollinisation.

---

<sup>1</sup> Thèse préparée au sein de l'École Doctorale Sciences et Environnements, Spécialité Écologie évolutive, fonctionnelle et des communautés, Université de Bordeaux, dans le cadre d'une bourse CIFRE, gérée et subventionnée par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), soutenue le 8 décembre 2021.

<sup>2</sup> Membre de l'Académie d'agriculture de France, section 1 « Productions végétales »

- une échelle spécifique au châtaignier, répondant aux normes internationales de standardisation, en attribuant trois notes aux fleurs de l'arbre. Les résultats sont présentés dans le premier article de ce chapitre, intitulé « **Efficient monitoring of phenology in chestnuts** » publié dans la revue *Scientia Horticulturae* (Larue *et al.* 2021a).

- un protocole d'extraction d'ADN original pour extraire simultanément l'ADN d'un grand nombre d'échantillons ayant permis la mise au point de deux jeux de 40 marqueurs SNP chacun, pour différencier les espèces et hybrides de châtaignier. Le travail correspondant constitue le second article de ce chapitre. Il est publié dans la revue *Conservation Genetic Resources* et s'intitule « **Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species** » (Larue *et al.* 2021c).

- la collection INRAE de châtaignier et les principales données de phénotypage et de génotypage sont présentées sous forme d'un *data paper* publié dans *Annals of Forest Sciences*, intitulé « **An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction** » (Larue *et al.* 2021b).

## **Le Chapitre 2 : La pollinisation du châtaignier par les insectes.**

Ce chapitre porte sur les vecteurs du pollen de châtaignier et aux mécanismes de sa pollinisation. Il débute par un article intitulé « **Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea spp.*) : an integrated approach** », publié dans *Botany Letters* (Larue *et al.* 2021). Suite à plusieurs expériences d'exclusion des insectes, le rôle crucial des insectes dans la pollinisation du châtaignier est confirmé. Ces résultats sont complétés par des mémoires de stagiaires M1 et M2, l'un portant sur « **Évaluation du rôle des téléphores fauves mâles et femelles dans la pollinisation du châtaignier** » et l'autre « **Quels sont les principaux pollinisateurs du châtaignier ?** ». Il est remarquable de conclure que sans insectes pollinisateurs, la production de fruits s'effondre – la pollinisation est entomophile et non anémophile ! Cette découverte contredit la croyance véhiculée par producteurs et vulgarisateurs. En France, le châtaignier peut être désormais considéré comme la première espèce forestière entomophile.

Parmi les coléoptères présents, l'insecte le plus abondant lors de la floraison du châtaignier était le téléphore fauve (*Rhagonycha fulva*), un cantharidé (une famille de coléoptères floricoles ; Larue *et al.* 2021). L'abeille domestique joue un rôle négligeable, car elle ne visite pratiquement pas les fleurs femelles. Dans le seul site forestier étudié, les insectes lors de la floraison, essentiellement des diptères, sont peu nombreux mais la pollinisation est efficace ! Les diptères pourraient être des pollinisateurs plus efficaces que les téléphores fauves – hypothèse à confirmer.

## **Le chapitre 3 : Stérilité mâle et succès de la pollinisation.**

Si certains châtaigniers sont naturellement mâle-stériles, c'est-à-dire fonctionnellement femelles, on serait dans le cas d'une espèce gynodioïque. Les études de descendance montrent que l'on ne trouve des descendants mâle-stériles que lorsque la mère est un *C. sativa* mâle-stérile ; en revanche, il n'y a pas d'hybrides mâle-stériles lorsque le père est un *C. sativa*. Comme l'hérédité du génome mitochondrial est très vraisemblablement maternelle et que cette stérilité mâle ne se transmet qu'à certains des descendants des croisements dont la mère est un *C. sativa*, C. Larue en déduit que cette stérilité mâle est d'origine cytoplasmique. Cette stérilité mâle est présente seulement chez les *C. sativa* ou chez les hybrides issus d'un croisement où la mère est un *C. sativa* ; les deux espèces asiatiques, *C. crenata* et *C. mollissima* ne présentent pas d'arbres mâle-stériles, du moins lors de cette étude.

**Pour mesurer le succès de la pollinisation du châtaignier**, on peut considérer le pourcentage d'inflorescences femelles formant une bogue, puis au sein de chaque bogue le pourcentage de fleurs formant un fruit, ou taux de remplissage des bogues, sur un total de trois fruits possibles. Les taux d'inflorescences donnant des bogues et le taux de remplissage des bogues ne sont pas corrélés ; finalement le taux de remplissage des bogues est la mesure plus directe pour apprécier le succès de la pollinisation.

Ce chapitre se conclut par un projet d'article intitulé « **Self-interference and female advantage in chestnut** » dans lequel il est démontré que les arbres mâle-stériles ont un bien meilleur taux de remplissage que les arbres mâle-fertiles et que ce fort avantage à être femelle n'est sans doute pas lié à une ré-allocation des ressources de la fonction mâle vers la fonction femelle, ni à une meilleure allogamie permettant d'éviter la consanguinité, mais essentiellement à l'absence d'auto-interférence entre les fonctions mâles et femelles chez ces arbres ne produisant pas ou peu de pollen. Ce fort avantage explique aussi la présence appréciée en verger des châtaigniers mâle-stériles.

#### **Le Chapitre 4 - Système d'appariement et succès de la pollinisation en verger**

Les variétés plantées dans les nouveaux vergers du sud-ouest de la France sont souvent des variétés hybrides *C. sativa* × *C. crenata*. Combiner l'étude de la fécondité mâle des plantes et celle du succès de la pollinisation est l'enjeu central de cette thèse, à l'interface entre écologie de la pollinisation et étude du système d'appariement.

« **Le trop faible nombre de donneurs de pollen limite la production dans les vergers** » - article en français. En pratique, seules deux variétés hybrides ont été massivement plantées pour la production de fruits : Marigoule, un hybride *C. crenata* × *C. sativa*, et Bouche de Bétizac, un hybride *C. sativa* × *C. crenata*. Le taux de remplissage des bogues est meilleur chez 'Bouche de Bétizac', variété mâle-stérile, que chez 'Marigoule', variété mâle-fertile, confirmant les résultats du chapitre 3.

Sans un nombre suffisant de donneurs de pollen, la pollinisation croisée ne sera pas assurée et la production de fruits sera réduite.

« **Coupling pollen pool and fruit set models reveals sexual interference in chestnut** » - article en anglais

L'autopollinisation réduit la production de fruits du fait de la perte des ovules autofécondées, réduisant ainsi le nombre d'ovules aptes à la fécondation croisée (ovule discounting). Les tubes auto-polliniques atteignent l'ovaire et dans la plupart des cas pénètrent l'ovule - c'est le phénomène d'auto-incompatibilité tardive – qui entraîne l'avortement de l'ovule ou de la graine. La différence de succès de pollinisation des arbres mâle-stériles et des arbres mâle-fertiles, due à l'auto-interférence, pourrait être accrue par une probabilité de visite plus élevée des fleurs femelles des arbres mâle-stériles par les insectes. Les châtaigniers mâle-stériles évitent l'effet négatif de l'auto-interférence lié à l'autopollinisation, et produisent nettement plus de fruits pleins que les châtaigniers mâle-fertiles.

Ces résultats ont été confirmés par modélisation : les recherches de paternité et les mesures du succès de la pollinisation sont bien expliquées par un mécanisme d'auto-interférence provoquant l'avortement des graines auto-pollinisées. Ceci représente une avancée décisive à la fois sur le plan fondamental et appliqué, avec des propositions concrètes pour la conception et la gestion des vergers de châtaigniers.

#### **Le Chapitre 5 – La pollinisation expliquée : transfert et communication**

Outre les résultats remarquables et novateurs obtenus au cours de cette thèse, Clément Larue a eu la possibilité d'écouter, discuter et présenter à de nombreuses reprises ses travaux au grand public, aux castanéiculteurs et aux autres professionnels du monde de la châtaigne ; il a pratiqué les sciences participatives. Ceci montre ses qualités de communicant et son souci de convaincre malgré le poids des habitudes et la difficulté pour les producteurs de remettre en cause leurs certitudes concernant la pollinisation anémophile et ses conséquences : par exemple la conception très récente d'un grand verger prioritairement exposé au vent dominant avec les arbres donneurs de pollen en avant mais assez loin des arbres producteurs... « *Les châtaignes sont issues d'autofécondation* » ...

Le premier article de ce chapitre, intitulé « **Ce que la vie amoureuse du châtaignier nous enseigne de l'agroécologie** », a été publié dans *The Conversation*, à l'occasion de la fête de la Science 2020.

Le second article, intitulé « **Diversifier pour mieux polliniser** », a été réalisé à la suite d'une interview pour la revue *Réussir Fruits & Légumes*, une revue destinée aux producteurs de fruits et légumes.

Clément Larue est post-doctorant à l'UMR Biogeco ; il est mis à disposition à l'entreprise 'Invenio solutions' et se propose de poursuivre son œuvre sur le châtaignier en explorant les pistes de recherche évoquées à la fin de sa thèse, mais aussi en répondant aux sollicitations actuelles d'écriture d'ouvrages techniques rapportant les résultats novateurs de son travail de thèse. L'étude entreprise a nécessité beaucoup de travail et de persévérance pour démonter les croyances établies, mais jamais démontrées. L'ouvrage est conséquent, presque 300 pages illustrées par des photographies remarquables qui pourraient être rassemblées dans un document de vulgarisation. Cette œuvre de très grande ampleur, fondamentale, suivie de prolongements et d'applications, justifie que l'analyse de ces travaux impressionnants figure sur le site de l'Académie d'agriculture de France, à titre de valorisation.

#### Publications dans des revues à comité de lecture :

##### **Inclus dans la thèse :**

- 1) Marais, A., Murolo, S., Faure, C., Brans, Y., Larue, C., Maclot, F., Massart, S., Chiumenti, M., Minafra, A., Romanazzi, G., Lefebvre, M., Barreneche, T., Robin, C., Petit, R.J., Candresse, T., 2020. Sixty years from the first disease description, a novel badnavirus associated with chestnut mosaic disease. *Phytopathology* PHYTO-09-20-0420-R. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0420-R>
- 2) Laurent, B., Larue, C., Chancerel, E., Guichoux, E., Petit, R.J., Barreneche, T., Robin, C., Lepais, O., 2020. Microhaplotype genotyping-by-sequencing of 98 highly polymorphic markers in three chestnut tree species. *Conservation Genet Resour.* <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01157-5>
- 3) Larue, C., Barreneche, T., Petit, R.J., 2021. Efficient monitoring of phenology in chestnuts. *Scientia Horticulturae* 281, 109958. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109958>
- 4) Larue, C., Guichoux, E., Laurent, B., Barreneche, T., Robin, C., Massot, M., Delcamp, A., Petit, R.J., 2021. Development of highly validated SNP markers for genetic analyses of chestnut species. *Conservation Genet Resour.* <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01220-9>
- 5) Larue, C., Barreneche, T., Petit, R.J., 2021. An intensive study plot to investigate chestnut tree reproduction. *Annals of Forest Science.* <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01104-w>
- 6) Larue, C., Austruy, E., Basset, G., Petit, R.J., 2021. Revisiting pollination mode in chestnut (*Castanea* spp.): an integrated approach. *Botany Letters* 0, 1–25. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1872041>

**Suite à la thèse :**

- 7) Petit, R.J., Larue, C., 2022. Confirmation that chestnuts are insect-pollinated. *Botany Letters* 0, 1–5. <https://doi.org/10.1080/23818107.2022.2088612>
- 8) Larue, C., Klein, E.K., Petit, R.J., 2022. Sexual interference revealed by joint study of male and female pollination success in chestnut. *Molecular Ecology*, 2023. <https://doi.org/10.1111/mec.16820>
- 9) Larue, C., Petit, R.J., 2023. Strong pollen limitation in hybrid chestnuts (*Castanea* sp.) orchards: Forest trees cannot compensate for the lack of pollen donors? *Annals of Forest Sciences*. *Accepté*
- 10) Larue, C., Petit, R.J., 2022. Self-interference and female advantage in chestnut. *bioRxiv* (*Pré-print disponible en ligne*). <https://doi.org/10.1101/2022.08.01.502348>.