



**HAL**  
open science

**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**

Paul-Louis Lopez-Marnet

► **To cite this version:**

Paul-Louis Lopez-Marnet. 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. Amélioration des plantes. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB069 . tel-03544723

**HAL Id: tel-03544723**

**<https://pastel.hal.science/tel-03544723>**

Submitted on 26 Jan 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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 doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 581 : agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Sciences végétales  
Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech,  
Institut Jean-Pierre Bourgin, 78000, Versailles, France.  
Réfèrent : AgroParisTech

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,  
le 10/12/2021, par**

**Paul-Louis LOPEZ-MARNET**

**Composition du Jury**

<b>Gabriel PAES</b> Directeur de Recherche, INRAE centre Grand-Est-Nancy	Président
<b>Bernadette JULIER</b> Directrice de Recherche, INRAE centre Nouvelle-Aquitaine-Poitiers	Rapporteur & examinatrice
<b>Luc SAULNIER</b> Directeur de Recherche, INRAE centre Pays de la Loire	Rapporteur & examinateur
<b>Marie-Françoise DEVAUX</b> Ingénieur de Recherche, INRAE centre Pays de la Loire	Examinatrice
<b>Julie FIEVET</b> Maître de Conférences, AgroParisTech Université Paris-Saclay	Examinatrice
<b>Alain MURIGNEUX</b> Chercheur, Limagrain	Examinateur
<b>Direction de la thèse</b>	
<b>Valérie MECHIN</b> Directrice de Recherche, INRAE centre IdF-Versailles-Grignon	Directrice de these
<b>Matthieu REYMOND</b> Chargé de Recherche, INRAE centre IdF-Versailles-Grignon	Co-encadrant & examinateur





C'est une bonne situation ça « Docteur » ?

« Mais, vous savez, moi je ne crois pas qu'il y ait de bonne ou de mauvaise situation. Moi, si je devais résumer ma vie aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres, des gens qui m'ont tendu la main, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où j'étais seul chez moi. Et c'est assez curieux de se dire que les hasards, les rencontres forgent une destinée... Parce que quand on a le goût de la chose, quand on a le goût de la chose bien faite, le beau geste, parfois on ne trouve pas l'interlocuteur en face, je dirais, le miroir qui vous aide à avancer. Alors ce n'est pas mon cas, comme je le disais là, puisque moi au contraire, j'ai pu ; et je dis merci à la vie, » (Edouard Baer (Otis), Astérix mission Cléopâtre)

Je dis un GRAND MERCI à Valérie et Matthieu ! Il y a 3 ans maintenant d'avoir fait le pari de me prendre en thèse. Merci de m'avoir encadré, formé, écouté mais surtout, d'avoir tout fait pour essayer de comprendre avec patience et bienveillance ma façon de penser, de parler et écrire ! La confiance et les libertés que vous m'avez accordées mon profondément touché. Il est sans nul doute certain que sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. J'espère avoir pu vous apporter le meilleur voir plus que ce que vous souhaitiez au sein de l'équipe. Je suis content d'avoir fait ma thèse sous votre direction. Merci d'avoir relu mon manuscrit !

Je dis merci à l'ensemble des partenaires privés Limagrain, RAGT, Maisadour, Lidea (anciennement Euralis et Caussade), Bayer (anciennement Monsanto) (membre de Promaïs) ainsi que leurs représentants d'avoir soutenu et financé le projet de recherche DECLIC en collaborant avec l'IJPB. Je vous remercie d'avoir semé, cultivé et récolté les essais hybrides en champs. Merci à Limagrain d'avoir effectué le génotypage. Je dis plus particulièrement, merci à Alain Lacombe puis Laurie Guard d'avoir été mes encadrants d'entreprise.

Je dis merci à l'école doctorale d'ABIES, pour leurs accueils, la confiance qu'ils ont accordée à mon projet de thèse et ma personne. Je remercie plus particulièrement Alexandre Pery pour la bienveillance et la confiance qu'il a placée en moi lors de notre entretien pour la thèse et Pierre Larraufie pour l'encadrement lors du projet « Docavenir », j'ai apprécié collaborer avec vous et les membres du groupe, cela m'a beaucoup appris.

Je dis merci, à l'INRAe, l'IJPB ainsi qu'à BEAM et leurs équipes de directions. Elles ne nous facilitent pas la vie mais nous ont autorisés malgré toutes les interdictions COVID de pouvoir semer l'essai de RILs à Versailles. Pour cela je vous dis MERCI !



Je dis merci à l'ensemble de l'équipe Qualibiosec présent Matthieu, Valérie, Marie Pierre (alias Marpie), Sophie, Sylvie, Christine, Yves, Julien, Oscar, et ceux qui sont parti Fadi, Laëtitia, Raphaël, Elodie, Romaric, Claire, Albert, Emilie et Ostiane. Merci à tous pour les discussions scientifiques ou pas, toujours dans la bienveillance. J'ai grandi scientifiquement et personnellement dans votre équipe, je vous en remercie.

Je dis merci pour les expérimentations quotidiennes faite par l'équipe, je remercie particulièrement : Marpie, Valérie et Sophie pour leurs aides, soutient et collaboration dans l'acquisition des données biochimiques ; Sophie pour l'aide apportée lors des coupes histologiques et du traitement des images ; Valérie, Matthieu et Sophie pour les longues heures de lutages pour lesquelles je leur demandais beaucoup de minutie ; Yves pour les discussions NIRS et la formation aux multiples outils de la NIRS ; Fadi pour l'ensemble des formations, discussions et conseils en début de thèse !



Je dis merci pour la mise en place, les suivies et la multiplication des graines lors de la pépinière au Moulon merci à l'équipe GQMS et particulièrement à Cyril Bauland et Sophie Pin. Merci aux membres de l'équipe Qualibiosec venu en renfort pour les autofécondations.



J'ai le dos bloqué !

Moi aussi !



Je dis merci pour tout, de la mise en place à la récolte de l'essai de l'année 2020 ! Tout le monde sait que cette année-là ne fut pas simple ; Merci à Matthieu et Valérie pour vous être donnés corps et âme pour défendre et maintenir l'essai de la population de RILs à Versailles en 2020. Le stress et le confinement n'ont pas eu raison de vous et malgré vos dos bloqués vous êtes venue semer à la canne ! Puis à peine 2 semaines plus tard pour casser la couche de battance ! pas de chance ! Cette essaie nous en a fait baver ; Merci à l'unité expérimentale de Versailles et particulièrement à Christophe Montagnier pour la préparation impeccable et carrée du champ (Merci pour 2021 les résultats promettent d'être beau) ; Merci à Marpie pour avoir préparé SEUL l'ensemble des sachets de grains de l'essai en télétravail

pendant le confinement de mars 2020 ! BRAVO ! ; Merci à Christine Dillmann, tu as sauvé notre essai d'une mort certaine ! Merci de nous avoir prêté le système d'irrigation du Moulon ; Merci à Cyril d'être venu pour assurer la fécondation de nos backcross ! J'ai bien fait attention à ce qu'il n'y a pas d'écriture en patte de mouche dans le manuscrit ! ; Merci à Valérie, Matthieu, Marpie, Sophie et Laëticia pour avoir récolté la population RILs ; Merci à Cyril et Sophie d'être venue récupérer le système d'irrigation, à eux et Matthieu et Christophe pour l'avoir démonté et rangé ! ça n'a pas été évident !

Pourquoi avons-nous mis les fils ?



Oh ça vas toi ne rigole pas !



Whouaaah!!



Es-tu sûr que ça va rentrer ?

Mais oui ne te pose pas de question !

Je dis merci à Philippe Andrey, pour son cours express de codage en ImageJ ; Tu m'as grandement aidé à comprendre la logique, c'est quelques minutes de ton temps a clairement facilité la rédaction de la version 2 du code !

Okay, Houston, we've had a problem here. Now it's resolved! Irrigation save us!

c'est quelques minutes de ton temps a clairement facilité la rédaction de la version 2 du code !

Je dis merci à la plateforme Observatoire de Végétal pour leur efficacité et leurs temps de réaction extrêmement rapide dans les réparations du passeur de lame ! Je remercie plus particulièrement Cyril Gaertner, Bertrand Dubreucq et Lionel Gissot.



Je dis merci aux membres de mon comité de thèses, même si certain on finit par s'endormir ! Vous avez été de très bons conseils !

Je dis merci à Rozenn Le Hir d'avoir été ma référente de thèse à l'IJPB.

Je dis merci aux membres de mon jury, qui courageusement ont décidé de relire ma thèse.



Je dis merci au Green Band, la musique le lundi midi à toujours était un moment drôle ! Dommage que le Covid soit passé par là.



Je dis merci à tous mes ami'e's !

Je dis merci, Valentin tu es celui qui à le plus été présent au cours de ces trois dernières années ! Toujours partant pour l'aventure entre l'escalade, la natation, la course à pied, le vélo, le trail, le ski ! Toujours motivé à repousser les limites ! Triathlon un M et un S dans la même journée ? finisher ! Triathlon un L dure ? Finisher ! trifecta sarptan ? Finisher ! IRON MAN ? Finisher ! j'ai hâte de la suite !



Je dis merci à l'équipe de supportrices présentes sur l'IRON MAN ! Merci à Fabienne, Gérard, Coline, Ninon, Danaïelle, Jacques et ma mamounette !! Merci à Fabienne et Gérard de m'avoir accueilli chez eux à plusieurs reprises avant des courses ! Spéciale dédicace à mon sponsor Jacques, encore Merci pour Ironman !

Je dis merci à Mathieu, Florentin, Valentin et Alizée pour le week end Trifecta spartan ! 2 jours 3 courses ! Finisher Trifecta ! Hâte de se retrouver à Sparte pour les championnats du monde !

Je dis merci à Camille d'avoir toujours présente ! Tu es pour moi une personne importante, tu as toujours su trouver les mots pour motiver et encourager ! Ne t'inquiète pas tu as roulé sur une planche de skate !



Je dis merci à Benjamin ton imagination n'a aucune limite, malgré la distance et le peu de temps que nous laisse nos thèses nous en trouvons toujours pour discuter !

Je dis merci à Adrien et Nicolas, mes amis d'enfance j'ai toujours l'immense plaisir de vous voir ! de se retrouver pour des soirées jeu de société ! de partir en vacances ! Ne changez rien vous êtes parfaits !

Je dis merci à Mylène t'avoir eu en coloc fut grave cool et ton en ménage sur Paris tellement drôle !

Je dis merci à Aurélien, depuis notre rencontre mythique à Londres tu me vends du rêve !! MERCI mille fois pour le vélo bambou, le covid a bousculé nos plans et ma thèse encore plus ! J'ai hâte de reprendre la route à vélo !

Je dis merci à Thibaut, Camille, Quentin, Paul, Alix, Ludivine, Emilie, Axelle, Edouard, Lara, Alexis toujours de merveilleux moments passés en votre compagnie !! Les mariages se sont officialisés et même l'annonce d'un future Bébé ! Nous vieillissons beaucoup trop vite !

Je dis merci à Val, Pierre, Jérémy et Simons les séances d'escalades sont bien plus animées lorsque l'un de vous et là !

Je dis merci à ma famille, mon papa et Monique ! Toutes les semaines à m'encourager et me soutenir !

Je dis merci à ma mamounette et Jacques ! « A ça elle est fière de son fiston » que Jacques me dit.

Je dis merci à Grand-père et Manou, vous m'avez encouragé et donné le gout de l'effort ! Merci d'avoir cultivé ma curiosité depuis tout petit, merci de m'avoir appris à chercher, réfléchir et comprendre ! Merci pour tous les moments, les discussions, les conseils que vous m'avez donnés.

Je dis merci à tous ceux que j'aurais oubliés par m'égard et pris de m'excuser ! Vous n'êtes pas sur le papier mais vous êtes dans mon cœur !

Je dis merci à tous ceux qui de près ou de loin mon aidé, motivé, encouragé et fais de moi ce que je suis aujourd'hui !



Je finis par les meilleurs ! Cette thèse elle est pour vous !

Je dis merci à mes petits frères, Armand et Emilien, je suis fière de vous. Vous m'inspirez tous les jours ! Continuez de me surprendre par vos aventures ! Je rêve de vous suivre !





# Table des matières

<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. Présentation de la production du maïs</b>	<b>1</b>
<b>II. Les principales caractéristiques du maïs</b>	<b>4</b>
A. Anatomie générale du maïs	4
B. Le maïs ensilage	5
C. Digestibilité et valeur énergétique	6
Les origines de la digestibilité	6
<b>III. Modalités d'inscription des variétés de maïs fourrage au catalogue français de maïs ensilage</b>	<b>8</b>
A. Caractères pris en compte à l'inscription des variétés au catalogue maïs ensilage français	9
<b>IV. L'UFL principale unité de mesure pour la caractérisation de la valeur énergétique</b>	<b>10</b>
A. Définition	10
B. Calcul de la valeur UFL	11
<b>V. De la digestibilité à l'UFL</b>	<b>13</b>
A. Mesures de la digestibilité <i>in vivo</i>	14
B. Transfert de la digestibilité <i>in vivo</i> à l' <i>in vitro</i>	14
C. Prédiction de l'UFL à partir de la digestibilité <i>in vitro</i> de MS	19
<b>VI. La technologie de spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR ou NIRS en anglais)</b>	<b>21</b>
Principe	22
<b>VII. Composition de la matière sèche de maïs</b>	<b>23</b>
A. Composition et relations entre les teneurs en constituants de la MS et sa digestibilité	23
1. Amidon	23
2. Les solubles	25
3. La paroi	26
<b>VIII. Composition de la paroi cellulaire du maïs</b>	<b>30</b>
A. La cellulose : composition, structure et relations avec la digestibilité	31
B. Les hémicelluloses : composition, structure et relations avec la digestibilité	33
C. Les lignines : composition, structure et relations avec la digestibilité	35
D. Acides hydroxycinnamiques et relation avec la digestibilité	40
E. Liaisons intermoléculaires dans la paroi	40
<b>IX. Histologie de la tige maïs</b>	<b>41</b>
A. Anatomie de la coupe transversale de la tige de maïs	42
1. Ecorce	42
2. Moelle	44

3.	Les faisceaux vasculaires	44
B.	Colorations et Quantifications des images	45
1.	Diversité des types de caractérisation histologique	45
	La coloration FASGA	48
2.	Caractérisation et automatisation	49
C.	Distribution des tissus lignifiés	51
1.	Diversité des profils histologiques	51
2.	Liens entre biochimie et histologie	52
i.	Biochimie sur tissus physiquement séparés	52
ii.	Corrélations et modèles histologiques expliquant la digestibilité de la paroi cellulaire de maïs	54
<b>X.</b>	<b>Héritabilité et déterminismes génétiques</b>	<b>55</b>
<b>XI.</b>	<b>Hypothèses de travail et objectifs de la thèse</b>	<b>56</b>
	<b>RÉFÉRENCES INTRODUCTION</b>	<b>59</b>
	<b>CHAPITRE 1 :</b>	<b>71</b>
	<b>HIGH THROUGHPUT ACCURATE METHOD FOR ESTIMATING IN VITRO DRY MATTER DIGESTIBILITY OF MAIZE SILAGE</b>	<b>71</b>
	ABSTRACT	72
	BACKGROUND	72
	Results	77
	Reference values of IVDMD	77
	Gelatinization step is crucial to obtain high similarity of IVDMD with the reference protocol	77
	Interactions between gelatinization and rinsing/neutralization and between gelatinization and incubation temperature also impacted IVDMD	78
	DISCUSSION	79
	CONCLUSIONS	82
	METHODS	82
	Plant materials	82
	Reference values for IVDMD estimation	82
	Estimation of IVDM using modified Aufrère protocol	82
	Protocols establishment to estimate the impact of different parameters on IVDMD estimation	83
	Statistical analyses	83
	REFERENCES	84
	<b>CHAPITRE 2 :</b>	<b>87</b>
	<b>A ROBUST AND EFFICIENT AUTOMATIC METHOD TO SEGMENT MAIZE FASGA STAINED STEM CROSS SECTION IMAGES TO ACCURATELY IDENTIFY HISTOLOGICAL VARIATION</b>	<b>87</b>
	ABSTRACT	89
	BACKGROUND	90
	RESULTS	92

Description of the workflow that automatically segment maize internode cross section images into 44 tissue types	92
Cross section digestion and segmented tissue types	93
The workflow is able to highlight significant and subtle histological genotypic variations between maize internodes	95
Tissues segmentation and variation of biochemicals properties	96
DISCUSSION	98
A faithful and automatic workflow	98
An exhaustive segmentation which faithfully reflects variations in tissue type	99
The workflow is able to pinpoint tissues in link with variation of biochemical properties	100
CONCLUSIONS	101
METHODS	102
Plant materials	102
Cross section staining and image acquisition	102
Image segmentation	102
Enzymatic digestion of internode cross sections	103
Biochemical analyses	104
Statistical analyses	104
REFERENCES	106

## **CHAPITRE 3 : 121**

### **IDENTIFICATION DES CARACTÈRES BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES IMPLIQUÉS DANS LA VARIATION DE DIGESTIBILITÉ OBSERVÉE DANS UNE SÉRIE D'HYBRIDES DE MAÏS ENSILAGE MODERNES. 121**

<b>I. Matériels et méthodes</b>	<b>122</b>
A. Présentation du matériel végétal, des échantillons récoltés et des mesures réalisées.	122
B. Présentation des analyses biochimiques	123
1. Obtention et détermination de la teneur en paroi	123
2. Estimation de la digestibilité de la matière sèche	124
3. Estimation de la digestibilité de la paroi	124
4. Estimation de la teneur en lignine dans la paroi	125
5. Détermination de la composition monomérique et de la structure de la lignine par thioacidolyse	126
6. Estimation des teneurs en cellulose et en hémicelluloses par le protocole Van Soest	127
7. Estimation des teneurs en acides <i>p</i> -hydroxycinnamiques par hydrolyses alcalines douces et fortes	128
8. La teneur en amidon	129
C. Présentation de l'analyse histologique	130
1. Obtention des coupes transversales des entrenœuds et coloration des coupes	130
2. Acquisition des images, analyse des images et extraction des caractères	131
D. Présentation des analyses statistiques	131
<b>II. Résultats et discussion</b>	<b>133</b>
A. Variabilité des caractères agronomiques principaux et des digestibilités– Relations entre ces caractères	133
1. Gamme de variation et effets du génotype et de l'environnement	133
2. Relations entre les caractères agronomiques et les digestibilités	137



3.	Modèles d'explication des variations de digestibilité	138
B.	Variabilité et impact des caractères biochimiques et histologiques sur les variations de digestibilité de paroi – De la variabilité à la conception d'idéotypes	140
1.	Variabilité de la digestibilité de paroi, de la composition biochimique des parois et des paramètres histologiques	140
C.	Relations entre les paramètres biochimiques et la digestibilité de paroi	146
2.	Corrélations	146
3.	Meilleurs modèles explicatifs des variations de digestibilités de paroi obtenus par régression multiple à partir des données biochimiques	149
D.	Relations entre les paramètres histologiques et la digestibilité de paroi	152
1.	Corrélations	152
2.	Meilleurs modèles explicatifs des variations de digestibilité de paroi obtenus par régression multiple à partir des données histologiques	154
E.	Apport de la combinaison de variables biochimiques et histologiques dans la compréhension des variations de digestibilité de paroi	157
3.	Relations entre caractères biochimiques et histologiques	157
4.	Combinaison de variables biochimiques et histologiques pour expliquer les variations de digestibilité de paroi	161
5.	Conception d'idéotypes	163
 <b>RÉFÉRENCES CHAPITRE 3</b>		 <b>166</b>
 <b>CHAPITRE 4 :</b>		 <b>169</b>
 <b>DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DES PRINCIPALES CIBLES PERMETTANT DE MODULER LES DIGESTIBILITÉS AU SEIN D'UNE POPULATION DE LIGNÉES RECOMBINANTES DÉDIÉE.</b>		 <b>169</b>
<b>I.</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>170</b>
A.	Obtention et caractérisation des lignées recombinantes issues du croisement entre F4 et F7	170
1.	Obtention des lignées recombinantes	170
2.	Culture et phénotypage des 177 RILs obtenues	171
B.	Génotypage des lignées recombinantes et établissement de la carte génétique.	173
C.	Statistique	174
D.	Détection de QTL	175
<b>II.</b>	<b>Résultats et discussion</b>	<b>176</b>
A.	Variations des caractéristiques agronomiques et des digestibilités	176
1.	Différences entre les parents de la population de RILs	176
2.	Variations au sein de la population de RILs	177
B.	Variations des caractères biochimiques pariétaux	179
1.	Différences entre les parents de la population de RILs	179
2.	Variations au sein de la population de RILs	180
C.	Variations des caractères histologiques	181
1.	Différences entre les parents de la population de RILs	181
2.	Variations au sein de la population de RILs	183
D.	Variables explicatives des variations de digestibilités au sein de la population de RILs	185
1.	Explication des variations de digestibilité de la matière sèche	185
2.	Explications des variations de digestibilité de la paroi	186
i.	Corrélations avec les variables biochimiques et histologiques	186

ii. Identification de 3 histotypes au sein de la population de RILs et identification des cibles histologiques et biochimiques impliquées dans les variations de digestibilité au sein de chaque groupe d'histotype.	191
a. Séparation des RILs en 3 histotypes	191
b. Présentation des différences histologiques entre les groupes	195
c. Présentation de différences biochimiques entre les groupes	196
d. Variables biochimiques et histologiques explicatives des variations de digestibilité de paroi dans l'ensemble de la population et au sein des 3 groupes d'histotypes	197
E. Identification du déterminisme génétique des caractères agronomiques, biochimiques et histologiques au sein de la population de lignées recombinantes F4xF7	199
1. Construction de la carte génétique	199
2. Identification des régions génomiques distordues et des régions monomorphiques dans la population F4xF7	201
F. Déterminismes génétiques des principales cibles permettant de moduler la digestibilité	203
1. Analyses de QTLs	203
i. QTLs agronomiques	203
ii. QTLs de digestibilité	203
iii. QTLs des caractères biochimiques pariétaux	204
iv. QTLs de caractères histologiques	204
v. Colocalisations des QTLs de digestibilités, des caractères biochimiques de la paroi et de l'histologie.	206
2. Mise en évidence du déterminisme génétique responsable des différences d'histotypes entre F4 et F7	209
<b>RÉFÉRENCES CHAPITRE 4</b>	<b>213</b>
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE</b>	<b>215</b>
<b>I. Développement d'outils de phénotypage de très haut débit.</b>	<b>215</b>
A. Augmenter le débit des analyses biochimiques sans compromettre la qualité des résultats.	215
B. Augmenter le débit des analyses histologiques en augmentant la qualité des résultats.	218
<b>II. Les différentes estimations de la digestibilité et les variations de composition entre les types tissulaires.</b>	<b>219</b>
<b>III. Les cibles histologiques et biochimiques impliquées dans la variation de la digestibilité chez les hybrides et les lignées recombinantes étudiés.</b>	<b>221</b>
<b>IV. Déterminisme génétique des cibles d'amélioration de la digestibilité</b>	<b>224</b>
<b>RÉFÉRENCES CHAPITRE 5</b>	<b>226</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>230</b>

# Liste des abréviations

%	pourcent	DHS	Distinction, Homogénéité et de Stabilité
°C	degrés Celsius	DINAG	Digestibilité non amidon non glucides solubles
µL	microlitre	dMO	Digestibilité apparente de la Matière Organique
µm	micromètre	Dms	Digestibilité de la matière Sèche
µm	micromètre	DO	Densité optique / absorbance
µmol	micromole	E	Epiderme
0/00	pourmille	EB	énergie brute
A	Absorbance	ECH4	Emission de méthane
ADF	Acid Detergent Fiber (Chaine Van Soest)	ED	énergie digestive
ADL	Acid Detergent Lignin (Chaine Van Soest)	EM	énergie Métabolisable
AGPM	Maiz'Europ Association Générale des Producteurs de Maïs cœur politique de Maiz'Europ	ENe	entrenoed
AIC	Akaike Information Criterion	ENL	énergie Nette de Lactation
Ami	teneur en Amidon	EU	perte énergétique dans les Urines
B	Bundle / Faisceaux	EU%EB	perte d'énergie dans les urines
B	Bleu	FA	Acide férulique
BIC	Bayesian Information Criterion	FAO	Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) des Nations Unies
BioGEVES	Laboratoire de Biologie moléculaire et de biochimie du GEVES	FASGA	Fucsina, Alcian bleu, Safranina, Glicerina et Aqua
BrAc	Lignine dosée par Bromure d'Acétyl	Feest	Acide férulique estérifié
CB	cellulose brute	Feeth	Acide Férulique éthérifié
cf	confer	g	gramme
CH4/MOD	production de méthane par kg de matière organique digérée	G	Green = Vert
chr	chromosome	GAX	Glucurono-Arabinoxylan
cm	centimètre	GC-MS	Chromatographie Gaseuse couplée à un Spectromètre de Masse
cM	centiMorgan	GEVES	Groupe d'Etudes et de contrôle des Variétés Et Semences
CTPS	Comité Technique Permanent de la Sélection des plantes cultivées	GIP	Groupement d'Intérêt Public
CWR	Cell Wall Residu	GNIS	Groupement national interprofessionnel des semences et plants
CWRD	in vivo Cell Wall Residu Digestibility	h	heures
CWRd	teneur en paroi digestible	H	Hue
CWRnd	teneur en paroi non digestible	h <sup>2</sup>	héritabilité
DCS	Digestibilité de le Matière Sèche in vitro estimé par la méthode Aufrère	H2SO4	Acide Sulfurique
dE	digestibilité de l'énergie	ha	Hectare
		HCl	Acide Chlorhydrique

HPLC-UV	Chromatographie Liquide Haute Pression détection Ultra Violet	NA	Not Available
INRAE	institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement	NDF	Neutral Detergent Fiber (chaîne Van Soest)
ISCWRD1	In Silico Cell Wall Residu Degradability protocol 1	nm	nanomètre
ISCWRD2	In Silico Cell Wall Residu Degradability protocol 2	OECD	Organisation de coopération et de développement économiques
IVCWRD	In Vitro Cell Wall Residu Digestibility	OGM	organisme génétiquement modifié
IVCWRDm	In Vitro Cell Wall Residu Digestibility	P	metaphloème
IVCWRNd	In Vitro Cell Wall Residu non digestible	Pa	Parenchyme cortical
IVDMD	In Vitro Dry Matter Digestibility	ParD	Parenchyme Digestible
Kcal	kilo calorie	ParND	Parenchyme peu Digestible
kg	kilogramme	pb	paire de base
kg.J-1	kilogramme par Joules	Pc	Protophloème compressé
kls	l'efficacité à utiliser cette EM pour la production laitière et l'entretien	PCA	acide para-coumarique
l	litre	Pcest	Acide para coumarique estérifié
l/ha	litre par hectare	pCWR	pourcentage de Cell Wall Residu
LK	Lignin Klason	pH	potentiel hydrogène
LOD	logarithm of odds = logarithme des probabilités	pMS	pourcentage de Matière Sèche
M	Moelle / Pith	pNDF	pourcentage de NDF
M	Mésophylle	psi	unité de pression
M	solution Molaire	Px	protoxylème
m	mètre	QTL	Quantitative Trait Loci
m <sup>2</sup>	mètre carré	R	Reflectance
MAT	matière Azotée totale	R	Rind / Ecorce
mg	milligramme	R	Rouge
Mha	million d'hectare	r	coefficient de corrélation
min	minute	R <sup>2</sup>	coefficient de détermination
ml	millilitre	RDT	Rendement
mm	millimètre	rdt total	Rendement de thioacidolyse
MO	Matière Organique	RILs	Recombinant Inbred Lines
MOD	Matière Organique Digérée	RMSE	Root Mean Square Error
Mpb	Mille paire de Bases	RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration
MS	Matière Sèche	RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
MSVI	Matière Sèche Volontairement Ingérée	RMSEV	Root Mean Square Error of Validation
Mt	million de tonnes	rpm	rotation par minute
Mx	metaxylème des Faisceaux	S	Saturation
n	nombre	S_G	rapport lignine S sur lignine G
N	solution Normale	Se	Sclérenchyme sous épidermique
		SEV	Secteur d'Études des Variétés
		SNES	Station Nationale d'Essais de Semences
		SNP	Single Nucleotide Polymorphisme
		SPIR	Spectroscopie dans le Proche InfraRouge

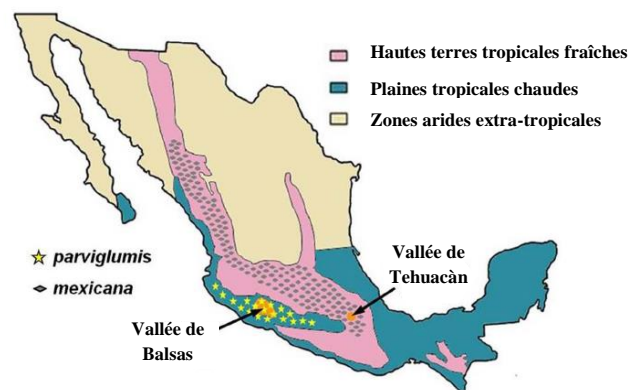
SSD Single Seed Descent  
Sv Sclérenchyme des Faisceaux  
t tonnes  
T lacume de protoxylème  
TB Tissue Bundle  
TM Tissue Moelle  
TE Tissue épiderme  
TRD Tissue Rind Dense  
TRL Tissue Rind Light  
UE Union Européenne  
UFL unité fourrage lait  
UFV unité fourragère viande  
UGB Unite Gros Bétail  
USA United stat of America  
V Vert  
V Value  
VATE Valeur Agronomique,  
Technologique et  
Environnementale  
vs versus



# Introduction

## I. Présentation de la production du maïs

Le maïs (*Zea mays* L) est une céréale annuelle qui a progressivement été sélectionnée depuis 8700 ans (Matsuoka et al., 2002). Le centre d'origine géographique de domestication du maïs est la vallée de Balsas au sud de Mexico (Piperno et al., 2009; Tenaillon and Charcosset, 2011). Le maïs serait issu de ce seul centre de domestication et aurait pour ancêtre la téosinte (*Zea mays ssp. parviglumis* et *Zea mays ssp. mexicana*, provenant respectivement de la vallée de Balsas et de la vallée de Tehuacàn (Figure 1) (Sawers and Sanchez-Leon, 2011).



**Figure 1 : Distributions géographique des téosintes *parviglumis* et *mexicana*** (Sawers and Sanchez-Leon, 2011).

Le maïs a été introduit pour la première fois sur le territoire européen via l'Espagne en 1493 par Christophe Colomb (Tenaillon and Charcosset, 2011). Aujourd'hui la culture du maïs est répandue sur l'ensemble des continents du globe (Leff et al., 2004). Sa répartition géographique, son mode de conservation et ses utilisations sont très variés en fonction de la localisation et des besoins. Il représente un intérêt économique majeur.

A l'échelle mondiale puis européenne, principalement deux types de culture de maïs se distinguent, un maïs dit « grain » et un maïs dit « fourrage ». Cette segmentation est basée sur le produit de la récolte. Pour le maïs grain, les épis de maïs sont récoltés séparément du reste de la plante et la valorisation principale est issue du grain alors que dans le cas du maïs fourrage la plante entière (tige, feuilles et épis) est récoltée et broyée.





En 2018 au niveau mondial, la culture du maïs grain est présente dans plus d'une centaine de pays pour près de 190 Mha (AGPM Maiz'Europ', 2018; "FAOSTAT," 2019). En moyenne, de 2016 à 2018 l'ensemble de la culture de maïs (grain et fourrage) représente 26 % des surfaces céréalières cultivées dans le monde, ce qui en fait la deuxième culture la plus répandue après le blé et devant le riz pour 210 et 165 Mha respectivement ("FAOSTAT," 2019; OECD/FAO, 2019). En terme de production, le maïs se positionne comme première culture avec 1128 Mt, ce qui représente près de 42 % de la production de céréale mondiale, avant le blé et le riz pour 28 et 20 % respectivement. Ces trois céréales composent à elles seules près de 90 % de la production de céréales mondiales. L'Europe se positionne au quatrième rang des producteurs de maïs grain avec 6% de la production mondiale après les USA, la Chine et le Brésil, qui respectivement réalisent 35, 21 et 9 % de la production de maïs (AGPM Maiz'Europ', 2018). La production de maïs dans le monde est essentiellement utilisée pour l'alimentation animale. En effet, c'est 61 % de la production du maïs qui y est destinée devant la production de biofuel et l'utilisation pour l'alimentation humaine qui représente 17 et 13 % respectivement (OECD/FAO, 2019).

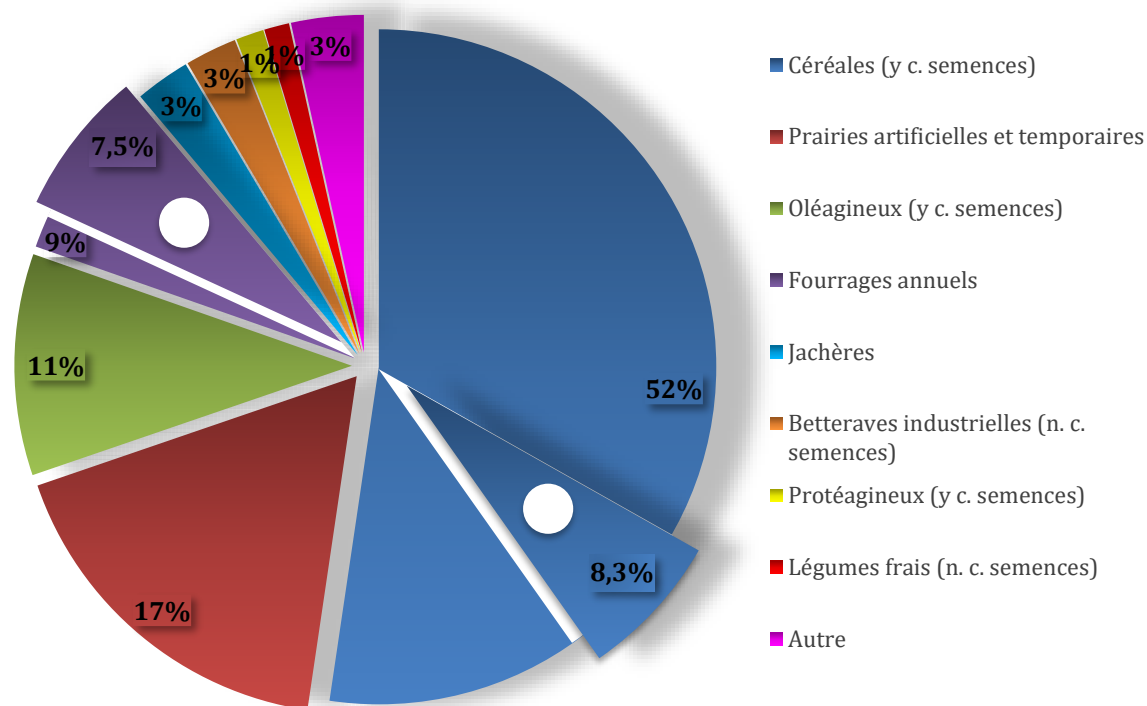
Contrairement au maïs grain, le maïs fourrage est moins répandu, avec 16.5 Mha en 2018 dans le monde. Il est principalement cultivé et utilisé dans l'hémisphère nord. L'UE est le premier producteur mondial avec plus d'un tiers des surfaces soit 6.1 Mha, suivi des USA et du Brésil avec 2.5 Mha et 2.3 Mha respectivement.

En 2018 à l'échelle de l'Europe, le maïs fourrage représente 40 % des surfaces de maïs. Une surface de 8,3 Mha est allouée au maïs grain, dont les premiers pays producteurs sont la Roumanie, la France et la Hongrie pour 14.4, 11.8 et 7.5 Mt sur une surface de 2.4, 1.3 et 1 Mha, respectivement. Pour le maïs fourrage, la France est à nouveau le second pays producteur Européen avec 1.4 Mha après l'Allemagne 2.23 Mha et avant la Pologne avec 0.55 Mha. La surface de maïs dédiée au fourrage en Europe a augmenté de 4.5 à 6.1Mha de 2000 à 2019 (AGPM Maiz'Europ', 2018).

En France, Agreste est un organisme gouvernemental qui fournit un ensemble de données et d'analyses statistiques sur l'utilisation et la valorisation des sols français au niveau agricole. Dans son rapport d'avril 2020 « Statistique agricole annuelle 2018-2019 » Agreste publie de façon exhaustive la répartition des cultures sur le sol français (Figure 2). Les cultures de maïs sont divisées et réparties dans différentes catégories telles que les céréales, les fourrages, légumières ou en jachères (Figure 2). Le maïs compté comme céréale est récolté en



grains ou en épis (il comprend le maïs grain ensilé et le maïs semence) mais il exclut le maïs doux qui est classé comme légume.



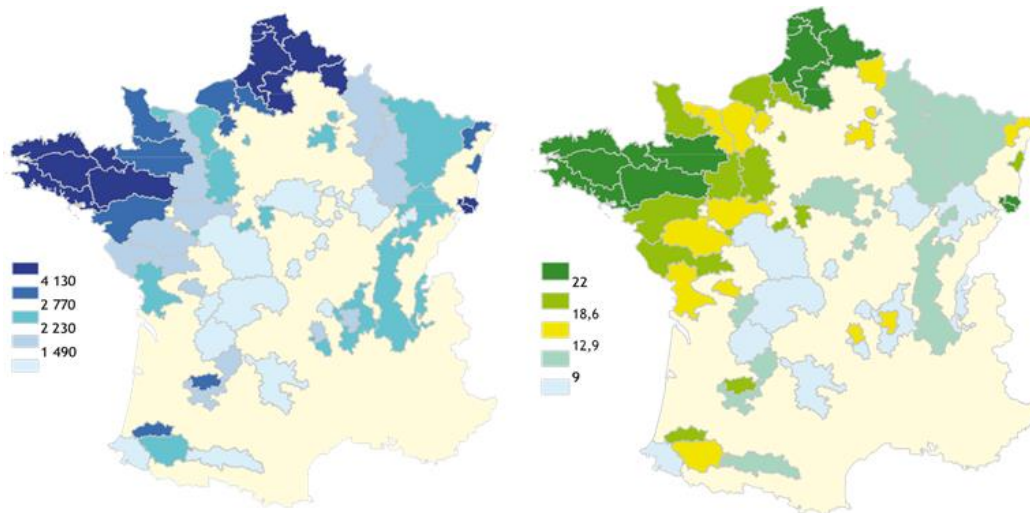
**Figure 2 : Répartition des terres arables en France 2019.** Les cultures de maïs sont réparties dans 4 catégories : les céréales, les fourrages, légumières ou en jachères. Cumulées les cultures de maïs sont présentes sur environ 16 % (soit 7.5 % en fourrage annuels et 8.3 % en céréales) des terres arables en 2019. Les portions de camemberts marquées d'un point blanc représentent la part de maïs au sein de sa catégorie et le pourcentage est celui de la surface en terre arable, yc = y compris, nc = non compté (Adapté agreste, 2020).

La surface de maïs céréale (= grain) en France est de 1.5 Mha en 2019 ce qui représente 16 % de la surface totale des céréales en France après le blé et l'orge pour 53 et 20 %. La production de maïs céréale est divisée en deux groupes, le maïs grain et le maïs semences. En superficie le maïs semence en France représente 5 % de la superficie de maïs céréale soit 68 500 ha et place la France au premier rang mondial des pays exportateurs de semences de maïs avec 142 000 tonnes en 2019.

Le maïs fourrage représente 83 % des surfaces de fourrages annuels en France, avec 1,4 Mha en 2019. De plus ces surfaces coïncident géographiquement dans les régions où les exploitations laitières se concentrent (Figure 2 & 3 ; ARVALIS, 2011). Le reste des surfaces



fourragères est composé de trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum L.*), de ray-grass (*Lolium perenne L.* et *Lolium multiflorum Lam.*), de céréales fourragères en vert (orge, sorgho, seigle), de céréales-légumineuses (vesce-avoine), d'oléagineux fourragers (tournesol, soja) et de protéagineux fourragers (lupin, féveroles, pois).



**Figure 3 : Cartes de la production laitière (bleu) et de la part de maïs fourrage (vert).** La production laitière est estimée en litres de lait par hectare de surface fourragère (l/ha). La part de maïs fourrage cultivé est estimée en pourcentage de surface fourragère (%). (Adapté de ARVALIS, 2011).

Le maïs fourrage est un pilier de l'alimentation animale laitière, car il est facile à produire et à stocker pour une alimentation hivernale. C'est un aliment de qualité à haute valeur alimentaire (Demarquilly, 1994; Carpentier and Cabon, 2011; ARVALIS, 2011). Il représente 20 % de la consommation UGB (unité gros bétail) tout système confondu (AGPM Maiz'Europ', 2018) et peut représenter 80 % de l'apport énergétique (Carpentier and Cabon, 2011). Dans la suite de cette introduction, nous allons nous intéresser aux principales caractéristiques du maïs ensilage ainsi qu'à son histoire comme source alimentaire.

## II. Les principales caractéristiques du maïs

### A. Anatomie générale du maïs

Le maïs hybride fourrage moderne est une plante atteignant régulièrement plus de 3 mètres de haut. La partie aérienne se caractérise par une tige simple composée d'en moyenne 13 entrenœuds (variable en fonction du génotype) séparés par des nœuds. Cette tige porte 1 à



3 épis en milieu / bas de tiges d'environ 250 à 450 g et à chaque nœud une feuille (composée d'une gaine, d'une ligule et d'un limbe). A la cime se trouve la panicule contenant les étamines (organe de reproduction mâle) portant le pollen. En bas des tiges généralement des racines coronaires se développent sur les deux premiers nœuds visibles hors sol. Il est rare de voir du tallage chez les hybrides de maïs fourrage.

A la récolte, le maïs fourrage est broyé grossièrement à 1 cm. Ce broyat est composé d'environ 40 % de grain et 60 % du reste de la plante, dont approximativement 40 % de tiges et 20 % de feuilles (Masoero et al., 2006; Arrigo and Stoll, 2012; Servais, 2019). La récolte du maïs fourrage s'effectue fin août/mi-septembre lorsque la teneur en matière sèche atteint 32-35 % ce qui représente une teneur d'environ 47 % de MS dans l'épi et de 25 % pour les tiges et feuilles (Servais, 2019).

## B. Le maïs ensilage

Le maïs ensilage est le maïs fourrage ayant subi la technique de transformation/conservation d'« ensilage ». Cette technique se résume par le stockage du maïs fourrage broyé et tassé dans un silo, c'est-à-dire par la mise en place rapide de conditions de fermentation anaérobie permettant le développement de bactéries lactiques. Celles-ci produisent de l'acide lactique par consommation de sucres solubles induisant une baisse du pH permettant la conservation du fourrage (Demarquilly, 1994; Buxton et al., 2003).

Les premières traces de mises en silo et d'utilisation de l'ensilage remontent à 3000 ans en Égypte (Buxton et al., 2003; Carpentier and Cabon, 2011) mais son utilisation telle que nous la connaissons aujourd'hui repose sur la publication du "Manuel de la culture et de l'ensilage des maïs et autres fourrages verts" rédigé par Auguste Goffart en 1877 (Goffart, 1877). Depuis lors, il faudra attendre plus d'un siècle pour voir son essor en France, avec une faible évolution entre 1957 (220 000 ha dédiés) et 1970 (350 000 ha dédiés) puis plus d'1 Mha à la fin des années 1970 pour se stabiliser à partir des années 1990 entre 1.4 et 1.5 Mha. Ce n'est qu'à partir des années 1970 que débute la sélection par l'INRAe et les sélectionneurs d'hybrides de maïs dédiés à la culture du maïs fourrage (Carpentier and Cabon, 2011).

La stabilité des surfaces de maïs fourrage depuis 30 ans peut être expliquée par l'effort de sélection pour augmenter le rendement en biomasse produite par hectare notamment en améliorant la résistance à la verse et aux maladies des hybrides proposés sur le marché. Le



progrès génétique a permis d'augmenter le rendement d'environ 0.1 t.MS.an<sup>-1</sup> (Baldy et al., 2017). Il a été reporté que cette augmentation des rendements s'accompagne d'une diminution de la valeur énergétique quantifiée par la diminution moyenne de 0.05 UFL/kg (unité fourrage lait, définie dans le paragraphe IV-A de l'introduction) de la biomasse récoltée entre les années 1989 et 2000 (Barrière and Emile, 2000). Pour une ration journalière de 16 kg une telle diminution a des conséquences au niveau de la production laitière avec une diminution de 1,8 kg de lait par jour et par vache (Barrière and Emile, 2000). C'est la raison pour laquelle, depuis 1998, une valeur UFL seuil est exigée pour l'inscription des variétés de maïs au catalogue maïs fourrage français. Ce seuil avait pour objectif de stopper la chute des valeurs UFL des maïs fourrages. Dans une étude récente menée par Baldy et al., en 2017, les auteurs ont évalué l'évolution de la digestibilité et de la valeur UFL pour 47 hybrides inscrits au catalogue maïs français des années 1960 à 2015 et tous cultivés en 2016. Ils ont montré une augmentation du rendement moyen de 11 à 22 t.MS.ha<sup>-1</sup> sur cette période, une tendance à la diminution de l'UFL chez les hybrides inscrits avant 2007 puis une stagnation de l'UFL et enfin la possibilité chez les hybrides inscrits après 2012 d'atteindre des valeurs UFL comparables à celle de l'hybride Royal inscrit en 1960. Il semblerait donc que le critère UFL à l'inscription des variétés de maïs fourrage au catalogue français ait permis de ralentir la chute de leur valeur énergétique dans un contexte d'augmentation des rendements.

### C. Digestibilité et valeur énergétique

La valeur énergétique d'un aliment est l'énergie, exprimée en kilocalories ou en joules, que fournit cet aliment lors de sa digestion. Plus un aliment est digestible, plus il est valorisé au cours de la digestion et plus sa valeur énergétique augmente. La digestibilité et la valeur énergétique de l'aliment sont donc intrinsèquement corrélées (INRA, 2018).

#### Les origines de la digestibilité

En 1877 en France, la question se contextualise pour l'amélioration de la ration alimentaire hivernale des vaches dans l'objectif d'améliorer la qualité et le rendement du lait. Dans l'ouvrage d'Auguste Goffart (1877), l'auteur nous fait part de la problématique d'un lait et d'un beurre de mauvaise qualité lorsque les vaches sont nourries avec du foin en hiver. Il évoque la méthode de conservation de l'allemand Klappmayer antérieur d'un siècle qu'il n'a pas réussi à maîtriser et dont les procédés de conservation ne sont pas simples à mettre en place. Goffart, après ces échecs, se tourne vers le maïs et ce sont « des milliers d'expériences » tout



au long des 25 années d'expérimentations qui lui permettent de conclure sur la méthode d'ensilage du maïs. Il arrive ainsi à définir une bonne ration pour les vaches laitières : hachage grossier des plantes de maïs, milieu anaérobie quelques semaines, légère fermentation alcoolique en sortie de silo et complémentation de la ration par d'autres aliments plus riches en protéines (ex : tourteaux, soja). Cette méthode d'ensilage du maïs lui permettra d'obtenir un lait de bonne qualité tout en maintenant le poids des vaches.

Ce n'est qu'au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle que Tilley and Terry (1963) proposent le premier protocole d'estimation de la digestibilité *in vitro* à partir de jus de rumen en deux étapes. Deinum et Van Soest sont les précurseurs du concept de digestibilité moderne, ils mettent en regard digestibilité *in vivo* et digestibilité *in vitro* de la MS ou de la paroi cellulaire, avec différents sous compartiments de la MS ou de la paroi cellulaire issus de foin, d'herbe verte ou ensilée ou des légumineuses (Deinum and Van Soest, 1969). Enfin Jones et Hayward (1975) proposent un protocole presque inchangé aujourd'hui de mesure de la digestibilité *in vitro* à deux étapes sans jus de rumen (prétraitement HCl 0.1N + 2 g.L<sup>-1</sup> de pepsine 24 h à 40 °C puis une hydrolyse cellulasique 48 h à 40 °C).

Ce n'est qu'à partir des années 1980 avec l'essor que connaît le maïs ensilé comme source d'alimentation des troupeaux en Europe et en Amérique du Nord que l'application et le développement des outils proposés par Van Soest s'effectuent. L'étude de la digestibilité du maïs ensilage entre dans une nouvelle dynamique d'application à court terme qui est la conséquence d'une sélection intensive dans l'objectif d'augmenter les rendements fourragers afin de répondre aux besoins. Cette dynamique implique l'étude de la digestibilité du fourrage qui s'est retrouvée diminuée lors de la sélection pour l'augmentation des rendements. La diminution de la digestibilité du fourrage s'est traduite par une baisse de la digestibilité de l'ensilage et une diminution de la production de lait (ou de viande) (Barrière and Emile, 2000).

Aujourd'hui l'UFL est une unité de référence permettant de rendre compte de la valeur énergétique du maïs fourrage. Elle est la résultante d'un cheminement scientifique. Dans le paragraphe suivant nous allons voir ce qui permet l'inscription des nouvelles variétés de maïs fourrage et quels sont les caractères étudiés et quantifiés lors de l'évaluation pour l'inscription.



### III. Modalités d'inscription des variétés de maïs fourrage au catalogue français de maïs ensilage

A l'échelle de l'Europe, les nouvelles variétés inscrites sont regroupées dans un catalogue commun qui regroupe l'ensemble des catalogues nationaux. Ainsi l'inscription d'une variété à l'un des catalogues nationaux d'un pays membre de l'UE entraîne son inscription sur le catalogue commun et permet sa commercialisation sur l'ensemble du marché européen ([agriculture.gouv.fr](http://agriculture.gouv.fr)).

En France, le Comité Technique Permanent de la Sélection des plantes cultivées (CTPS) est rattaché au Ministère chargé de l'Agriculture. Le CTPS est responsable de la gestion du catalogue officiel français des nouvelles semences. De plus par la recherche, l'élaboration, la proposition, l'application, la certification et le contrôle des règlements d'inscriptions, le CTPS assure une mission de conseils et d'appuis techniques dans l'orientation et l'exécution des décisions politiques dans le cadre de la sélection variétale.

Les étapes techniques officielles pour l'inscription d'une nouvelle variété au catalogue officiel des semences sont déléguées par le CTPS au Groupe d'Etudes et de contrôle des Variétés Et Semences (GEVES). Le GEVES est un Groupement d'Intérêt Public (GIP) qui assure sa neutralité et son indépendance et ainsi associe l'Etat, la recherche et les représentants privés. De ce fait, son conseil d'administration regroupe des représentants d'INRAE, du ministère de l'Agriculture, du GEVES et du GNIS. Le GNIS étant le Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants permettant les échanges, les dialogues et la prise de décisions afin de promouvoir les acteurs de la filière des semences et plants français en France et à l'étranger.

Le GEVES s'articule autour de 3 secteurs :

Une Station Nationale d'Essais de Semences (SNES) responsable de l'analyse qualité des semences commerciales dédiées à l'importation et l'exportation afin de faciliter les échanges de semences.





Le laboratoire de Biologie moléculaire et de biochimie du GEVES (BioGEVES) responsable de la caractérisation variétale. Il contrôle l'identité des semences, la présence d'OGM (et gènes de résistance) et la présence de pathogènes.

Le Secteur d'Études des Variétés (SEV) étudie au champ les variétés demandant l'inscription aux catalogues officiels ou la délivrance du certificat d'Obtention Végétale. Dans ce cadre, 3 études conformes à la législation européenne sont menées : les études de contrôle variétal, les études de Distinction, Homogénéité et de Stabilité (DHS) ainsi que les études de Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale (VATE). C'est au cours de cette dernière étude que sont quantifiés le rendement et la qualité du maïs fourrage.

Le CTPS prendra la décision d'inscrire ou non une variété sur la base des rapports de ces différentes études.

### **A. Caractères pris en compte à l'inscription des variétés au catalogue maïs ensilage français**

Dans le cadre des études VATE du Maïs fourrage les caractères étudiés sont classés en 3 catégories : les caractères informatifs, les caractères qualitatifs et les caractères décisionnels. Seuls les caractères décisionnels sont utilisés pour les propositions de refus ou d'acceptation à l'inscription des nouvelles variétés. Ces caractères décisionnels sont au nombre de 4 :

La teneur en matière sèche plante entière (en %) ;

Le rendement, subdivisé en deux types : un rendement net de matière sèche en tonne par hectare et un rendement relatif exprimé en pourcentage de la moyenne des deux meilleurs témoins ;

La verse à la récolte : exprimée en pourcentage de nombre de plantes ayant un angle d'inclinaison supérieur à 30° au stade de maturité juste avant la récolte ;

L'unité fourrage lait (UFL) : prédite par l'utilisation de la technologie SPIR (spectroscopie proche infrarouge) et de l'équation de prédiction modèle M4.2 mise à jour par Peyrat et al., (2016). La valeur UFL est ramenée ensuite en pourcentage de la moyenne des deux meilleurs témoins de l'essai.



« Source CTPS / GEVES » (“Evaluation de la Valeur Agronomique Technologique et Environnementale (VATE) des nouvelles variétés à l’inscription au Catalogue Français,” 2018).

L’UFL en tant que référence est estimée par le modèle M4.2 de Peyrat et al., (2016). Pour bien appréhender cette valeur UFL, nous allons d’abord détailler la façon dont les valeurs de référence ont été calculées à partir de valeurs mesurées. Dans le paragraphe IV nous allons définir l’UFL à partir des données de la littérature puis décortiquer le calcul de l’UFL (INRA, 2018) à partir des travaux effectués au cours du projet Systali (2010 – 2018) publiés dans le livre rouge « Alimentation des ruminants ». Ce travail nous permettra d’extraire les variables centrales mesurées pour le calcul de l’UFL.

## IV. L’UFL principale unité de mesure pour la caractérisation de la valeur énergétique en France

Depuis 1998, pour l’inscription d’une nouvelle variété de maïs fourrage l’UFL est estimée via le modèle M4 mis à jour en modèle M4.2 par Peyrat et al., (2016) sur la base de valeurs elles-mêmes prédites à partir de la technologie / méthode de spectroscopie proche infrarouge (en anglais : near infrared spectroscopy NIRS). La mise en place de ce modèle ne fut possible qu’après avoir mesuré puis calculé l’UFL. Je propose de définir l’UFL et d’exposer brièvement les calculs permettant d’obtenir cette valeur. Puis dans un second temps, la prédiction de la valeur UFL sera abordée.

### A. Définition

L’UFL est définie comme étant la « Valeur énergétique nette d’un kg d’orge de référence pour la production laitière bovine. » (Meyer, 2019). L’orge de référence a été proposé par Vermorel et al. en 1987 lors de la révision du système fourragé fixant l’UFL à 1700 kcal (Vermorel et al., 1987). En 2018, dans le livre rouge « Alimentation des ruminants » la valeur énergétique de l’UFL est recalculée à partir des données de l’orge de référence afin d’être réévaluée et d’aligner les modèles UFL et UFV (unité fourragère viande) fixant l’UFL à l’UFV soit 1760 kcal (INRA, 2018). L’orge de référence a pour caractéristiques 87% de matière sèche, 121 g/kg MS de MAT (matière azotée totale), 50 g/kg MS de CB (cellulose

brute), 4 425 kcal/kg MS de EB (énergie brute), 3 583 kcal/kg M de ED (énergie digestive) et 3 038 kcal/kg MS d'EM (énergie métabolisable) (INRA, 2018).

Donc l'UFL est une unité de référence permettant de comparer tous les aliments entre eux sur la base de l'Énergie Nette de Lactation (ENL) via la référence de l'orge cela se traduit par :

$$\text{UFL} = \text{ENL} / 1760$$

## B. Calcul de la valeur UFL

Le calcul des références UFL et sa modélisation ont été améliorés au cours du projet Systali (2010 – 2018), qui s'est conclu par la parution du livre rouge « Alimentation des ruminants », je me permets ici de me concentrer sur les démarches mises en place dans le calcul de l'UFL, par INRA en 2018.

La valeur de UFL est issue d'un calcul séquentiel à partir d'autres unités que sont l'EB, l'EM, l'ED et ENL. L'ensemble des calculs utilise pour base au moins un ou plusieurs de ces paramètres mesurés :

EB en Kcal de MS

MSVI (matière sèche volontairement ingérée) en g MS/ kg PV<sup>0,75</sup>

MO (matière organique) en g/Kg MS

dMO (digestibilité apparente de la matière organique) en %

MAT (matière azotée totale par le calcul  $\text{MAT} = \text{N}(\text{azote}) * 6.25$ ) en g/kg MS

Ami (teneur en amidon) g/kg MS

CH4/MOD (production de méthane par kg de matière organique digérée)

EU%EB (perte d'énergie dans les urines) en kcal/100 kcal EB

L'ENL sera fonction de l'EM et de l'efficacité à utiliser cette EM pour la production laitière et l'entretien (kls) :

## Introduction

$$ENL = EM * kls$$

$$\text{Pour } kls = 0,65 + 0,247 * q - 0,63$$

q étant le rapport de l'énergie métabolisable sur l'énergie brute:

$$q = EM / EB$$

EM renvoie à l'ED moins les pertes énergétiques liées aux émissions de méthane (ECH<sub>4</sub>) et aux pertes énergétiques par les urines (EU) :

$$EM = ED - ECH_4 - EU$$

ECH<sub>4</sub> et EU sont mesurées en chambres calorimétriques.

L'ED est fonction l'EB et de la digestibilité de l'énergie (dE).

$$ED = EB * dE * 0,01$$

L'EB est mesurée dans une bombonne calorimétrique par combustion totale puis est modélisée par une équation de prédiction en fonction des teneurs en amidon et en matière azotée.

$$EB = 4722 - 0458 * \text{Amidon}_{\text{vert}} + 1,74 * \text{MAT}_{\text{vert}}$$

La digestibilité de l'énergie est liée à celle de la matière organique et sera donc directement fonction de cette dernière.

$$dE = -2,35 * 0,0997 * dMO$$

Les teneurs en amidon et en matière azotée totales sont mesurées *in vitro* et la digestibilité de la matière organique est mesurée *in vivo* et découle sur la digestibilité de l'énergie.

La perte d'EU est une proportion d'énergie brute perdue par les urines

$$EU = EU\%EB * EB * 0,01$$

La perte d'énergie sous forme CH<sub>4</sub> est déterminée à partir de caractères mesurés tels que la production de méthane par la matière organique digérée (CH<sub>4</sub>/MOD) et calculée, la

Matière Organique Digérée (MOD) déterminée par la mesure du tonnage de matière organique (MO) ainsi que sa digestibilité (dMO).

$ECH_4 = CH_4/MOD * 12,5 * 10^{-3} * MOD$  ou  $12,5 =$  pouvoir calorifique du méthane (Kcal/g  $CH_4$ )

La MOD est la digestibilité réelle de la MO

$$MOD = dMO * MO * 0,01$$

Le calcul de l'UFL pourrait être résumé par cette formule :

$$UFL = \frac{(0,65 + 0,247 * \frac{(EB * (-2,35 * 0,0997 * dMO) * 0,01) - (\frac{CH_4}{MOD} * 12,5 * 10^{-3} * (dMO * MO * 0,01)) - EU\%EB * EB * 0,01}{EB} - 0,63)}{1760} * \left( (EB * (-2,35 * 0,0997 * dMO) * 0,01) - \left( \frac{CH_4}{MOD} * 12,5 * 10^{-3} * (dMO * MO * 0,01) \right) - EU\%EB * EB * 0,01 \right) *$$

La digestibilité de la matière organique *in vivo* est utilisée régulièrement afin d'estimer les paramètres de digestibilité de l'énergie, de digestibilité d'énergie métabolisable et de digestibilité réelle. Finalement l'UFL est un calcul séquentiel à partir de 5 variables EB, dMO,  $CH_4/MOD$ , EU%EB, MO. La digestibilité de la matière organique *in vivo* occupe une place importante dans le calcul des références UFL. Nous allons donc dans le paragraphe V retracer l'histoire de la digestibilité *in vivo* à la prédiction de l'UFL via le model M4.2 (Peyrat et al., 2016).

## V. De la digestibilité à l'UFL

La digestibilité de la matière organique est ainsi très liée à la valeur énergétique du fourrage. D'ailleurs, dans la formule de calcul de la valeur UFL mentionnée ci-dessus, le terme "digestibilité de la matière organique" (dMO) intervient à 4 reprises. Il est donc essentiel de bien évaluer cette dernière pour bien estimer la valeur énergétique du fourrage. Néanmoins, l'estimation de la dMO *in vivo* reste difficile à mettre en place (Marten and Barnes, 1979; cf ci-dessous). En effet, son estimation *in vivo* nécessite des animaux et les infrastructures adaptées. Cela reste possible pour estimer la valeur de dMO pour quelques échantillons d'ensilage mais totalement inconcevable lorsque le nombre d'échantillons avoisine une centaine et plus. Pour pallier à ces contraintes expérimentales, la communauté scientifique a proposé des protocoles pour estimer la dMO *in vitro*. À partir des valeurs de digestibilité *in vivo* ont été développés dans un premier temps des protocoles *in vitro* afin d'estimer au mieux

la digestibilité *in vivo*. Puis à partir des estimations de digestibilité *in vitro* ont été élaborées des équations de prédiction NIRS afin de prédire la valeur la digestibilité *in vivo*. Cette valeur prédite sera utilisée pour calculer des valeurs de digestibilité *in vivo* et de l'UFL.

### A. Mesures de la digestibilité *in vivo*

La mesure de la digestibilité de la MS *in vivo* est le plus couramment effectuée chez le mouton ou la vache. La mesure de la digestibilité consiste en l'observation de la différence de masse entre la matière ingérée et celle déféquée par l'animal ramenée au pourcentage de la matière ingérée (Deinum and Van Soest, 1969; Peyrat, 2014). La digestibilité suit généralement le protocole en deux étapes quel que soit l'animal d'étude ou la matière ingérée : une première période dite « d'adaptation de l'animal » d'une dizaine de jours avec le régime étudié, suivie d'une période de prises de mesures d'environ 1 semaine. Ces cycles sont répétés plusieurs fois, entre 4 à 7 périodes pour la même source d'alimentation et ce pour chaque source d'alimentation (Andrieu et al., 1993; Iantcheva et al., 1999). La méthode de référence décrite par Demarquilly et al. en 1995 se fait sur 6 moutons d'environ 60kg (poids vif) âgés de 2 à 4 ans et montrant un écart type de digestibilité d'environ deux points.

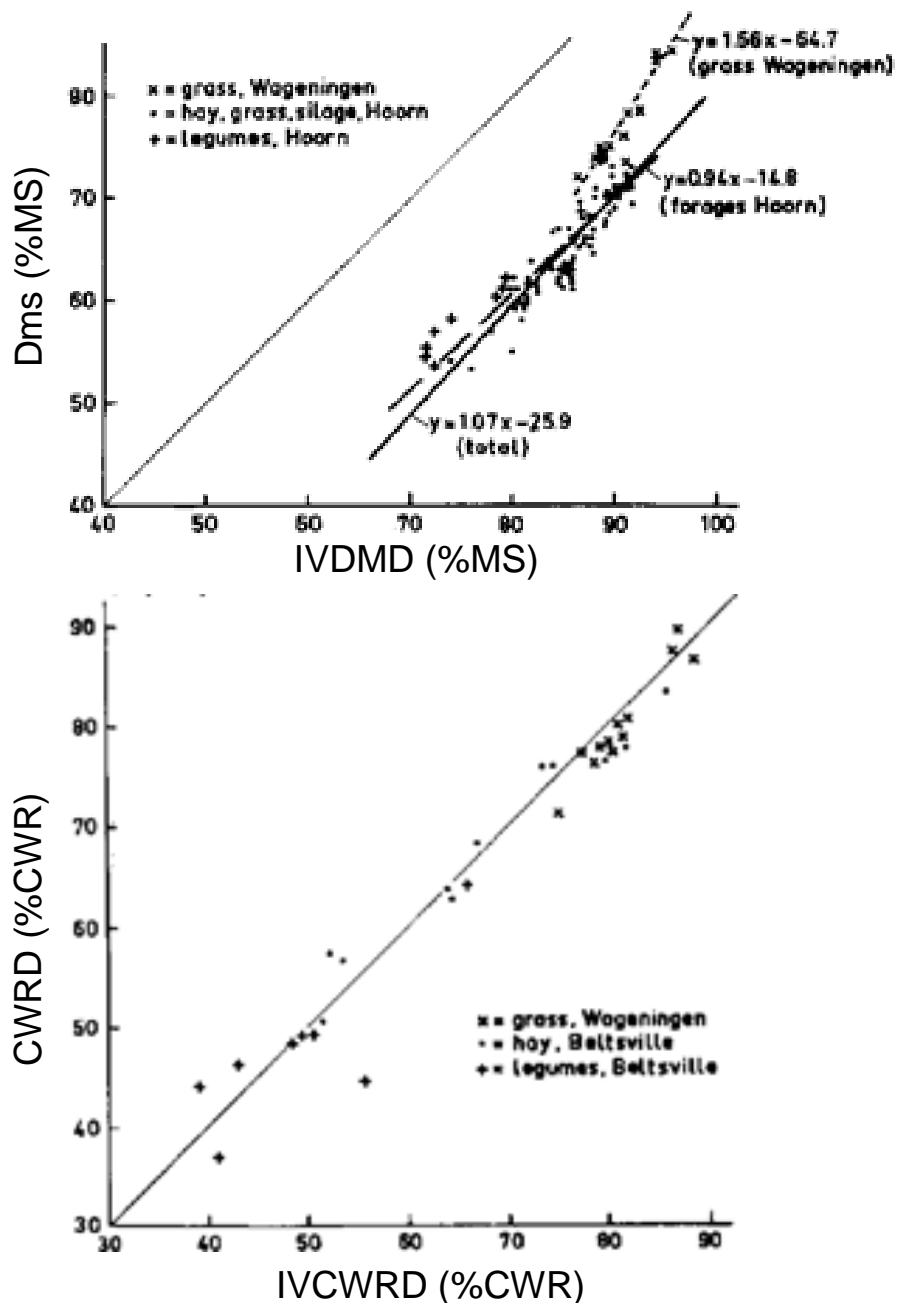
La mesure de la digestibilité *in vivo* nécessite donc un protocole lourd à mettre en place impliquant des animaux et les infrastructures adaptées (entretien d'animaux, équilibre alimentaire) (Lila et al., 1986). De plus, ces protocoles sont très chronophages et ne permettent d'analyser qu'un faible nombre d'aliments à la fois. Ces contraintes ont poussé la recherche depuis le début de l'étude de la digestibilité *in vivo* à estimer la digestibilité à partir d'autres méthodes *in vitro* dans un premier temps puis à prédire les valeurs estimées par modélisation via des équations de prédictions basées sur la technologie NIRS.

### B. Transfert de la digestibilité *in vivo* à l'*in vitro*

C'est dans les années 1960 que Tilley and Terry (1963), Deinum and Van Soest (1969) à partir des travaux de Clark (1958) proposent des protocoles de digestibilité *in vitro* à partir de jus de rumen (Marten and Barnes, 1979). Très rapidement se mettent en place 2 étapes dans le protocole d'estimation de la digestibilité *in vitro*, permettant la standardisation des protocoles (Marten and Barnes, 1979). La première étape est généralement identique et implique l'application du jus de rumen alors que la deuxième étape a plusieurs variantes : utilisation

d'une solution acide avec de la pepsine (Tilley and Terry, 1963) ou solution de détergent neutre (Deinum and Van Soest, 1969).

De plus, Deinum and Van Soest (1969) appliquent leurs protocoles *in vitro* sur de la MS ou de la paroi (cell wall residu = CWR) de différents matériels végétaux tels que de l'herbe, du foin, de l'ensilage ou des légumineuses (Figure 4). La digestibilité *in vitro* de la MS (in vitro dry matter digestibility = IVDMD) surestime sa digestibilité *in vivo* (Dms) (Figure 4), néanmoins il y a une très bonne corrélation des données qui semblent dépendantes de l'espèce végétale. La digestibilité *in vitro* de la paroi (in vitro cell wall digestibility = IVCWRD) est très bien corrélée à sa digestibilité *in vivo* (cell wall residue digestibility = CWRD) (Figure 4).



**Figure 4 : Relations entre les digestibilités *in vivo* et les digestibilités *in vitro*.** Pour la matière sèche de 106 fourrages (gauche) et du résidu pariétal de 31 fourrages (droite) (Adapté de Deinum and Van Soest, 1969). Dms = Digestibilité de la matière sèche *in vivo*, IVDMD = digestibilité de la matière sèche *in vitro*, CWRD = digestibilité de la paroi *in vivo*, IVCWRD = digestibilité de la paroi *in vitro*.



L'intervention du jus de rumen implique toujours des problématiques autour de l'utilisation animale notamment la stabilité et la normalisation des caractéristiques de jus de rumen. De plus ces manipulations sont trop longues et trop complexes à mettre en place dans la plupart des laboratoires et trop coûteuses. L'application de cette méthode était donc limitée à quelques équipes (Marten and Barnes, 1979). Ainsi, dans les années 70, commencent à apparaître en Amérique du nord des protocoles de mesure de la digestibilité *in vitro* reposant sur l'utilisation d'enzymes fongiques.

C'est en 1975 que Jones and Hayward proposent un protocole de digestibilité à deux étapes successives comprenant un premier prétraitement de 24 heures avec une solution de pepsine dans de l'acide chlorydrique 0,1N suivi d'un traitement de 48 heures avec une solution cellulasique. Leur étude met en avant l'intérêt de l'utilisation d'un prétraitement justifié par une amélioration du coefficient de corrélation et une diminution de l'erreur standard de déviation pour un protocole à deux étapes, comparé à un protocole à une seule étape de solubilisation avec une solution de cellulase (Tableau 1 & 2) (Jones and Hayward, 1975).

**Tableau 1 : Corrélation entre la digestibilité *in vivo* et différents protocole d'estimation *in vitro* de la digestibilité de la MS (IVDMD) (Adapté Jones and Hayward, 1975).**

Correlation with <i>in vivo</i> digestibility	Ryegrass (1972 cuts)		Cocksfoot (1973 cuts)	
	<i>r</i>	r.s.d.	<i>r</i>	r.s.d.
<i>In vitro</i> digestibility	0.90	3.41	0.95	2.69
Cellulase solubility ( <i>T. viride</i> )	0.91	3.23	0.97	2.22
Cellulase solubility (Basidiomycetes)	0.87	3.72	0.96	2.35
Pepsin + cellulase sol. ( <i>T. viride</i> )	0.96	2.15	0.97	1.88
Pepsin + cellulase sol. (Basidiomycetes)	0.93	2.78	0.97	2.03

En comparant le protocole de Jones and Hayward (1975) (solution pepsique puis solution cellulasique) avec le protocole de digestibilité *in vitro* utilisant le rumen de vache (Tilley and Terry, 1963) nous observons que les deux étapes ont été inversées. En considérant que le jus de rumen possède les mêmes propriétés que la cellulase d'origine fongique, dans le protocole de Jones and Hayward (1975) l'attaque acide est réalisée avant l'attaque enzymatique (Tableau 1).

L'inversion des deux étapes s'explique par une meilleure corrélation et une erreur standard de déviation diminuée entre les estimations *in vivo* et *in vitro* lorsque ce traitement acide précède l'attaque enzymatique avec un coefficient de corrélation de 0,91 au lieu de 0,84

et une erreur standard de déviation de 3,17 au lieu de 4,09 (Tableau 2) (Jones and Hayward, 1975).

**Tableau 2 : Comparaison des corrélations entre la digestibilité *in vivo* et la digestibilité *in vitro* des protocoles avec l'étape enzymatique puis l'étape acide et inversement (Adapté de Jones and Hayward, 1975).**

Correlation with <i>in vivo</i> DM digestibility	<i>r</i>	r.s.d.
Cellulase solubility	0.81	4.56
Cellulase followed by pepsin	0.84	4.09
Pepsin followed by cellulase	0.91	3.17
0.1 N HCl followed by cellulase (using Basidiomycete cellulase)	0.82	4.36

De plus, au cours de leurs travaux, Jones et Hayward (1975) déterminent que la cellulase la plus adaptée est *Trichoderma viride* d'origine fongique, qui solubilise plus de matière d'herbe que celle de Basidiomycete, *Rhizopus*, *Aspergillus niger* pour 57, 48, 35 et 45% de DM respectivement (Tableau 3) (Jones and Hayward, 1975).

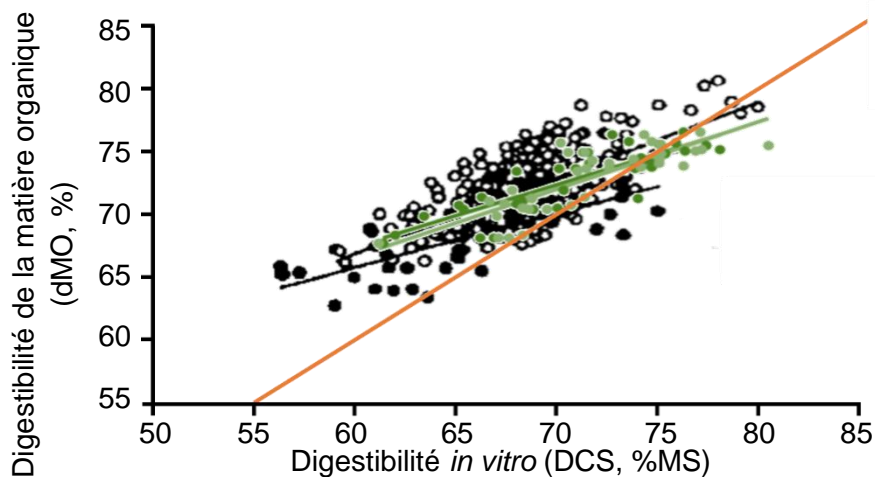
**Tableau 3 : Pourcentage de solubilisation d'herbe ou de cellulose par différentes cellulases fongiques (Adapté de Jones and Hayward, 1975).**

Enzyme source	% Solubilised	
	Herbage	Cellulose paper
<i>Trichoderma viride</i>	57	69
Basidiomycete	48	20
<i>Rhizopus</i>	35	7
<i>Aspergillus niger</i>	45	10
Buffer only	37	5

A partir de ces travaux, Aufrère publie en 1982 la meilleure modalité du protocole en faisant varier 4 paramètres importants du protocole : la concentration d'acide dans la solution de prétraitement, la concentration en cellulase, la température et la durée d'incubation durant l'hydrolyse enzymatique. Aufrère propose ainsi d'utiliser sur 500mg de MS une solution d'HCL 1N avec 2% de pepsine à 40°C pendant 24h comme première étape puis après filtration et lavage de réaliser toujours à 40°C une hydrolyse enzymatique avec une solution de cellulase Onozuka R10 à 1mg/ml pendant 24h comme deuxième étape.

Par la suite Aufrère et Michalet-Doreau en 1983 ajoutent une nouvelle étape de gélatinisation (80°C pendant 30min) entre l'étape pepsine-acide et l'attaque enzymatique (Andrieu et al., 1993; Dardenne et al., 1993) lorsqu'il y a présence d'amidon. De plus la concentration d'acide est diminuée à 0,1N contrairement à ce qui est proposé en 1982 afin d'avoir des valeurs de digestibilité avoisinant celles obtenues *in vivo* sans pour autant détériorer leurs corrélations (Aufrère, 1982; Andrieu et al., 1993; Dardenne et al., 1993).

Le protocole de digestibilité *in vitro* de la MS méthode Aufrère (1983) fut largement réutilisé et adapté, il est validé pour estimer de façon fiable la digestibilité *in vivo* de la matière organique (dMO) (Figure 5) (Andrieu and Baumont, 2000; Peyrat, 2014). Les estimations de corrélations observées entre la dMO et la digestibilité de la MS par Andrieu and Baumont (2000) et Peyrat (2014) sont effectuées sur une large gamme de teneur en MS des échantillons, incluant des stades de maturités différents, elles intègrent des données de 7 lieux sur deux années et un lieu sur deux années respectivement. Cette large gamme de variation des maturités entraîne un biais important dans les valeurs de digestibilités observées. La DCS (digestibilité de la matière sèche *in vitro* estimé par la méthode Aufrère) sous-estime légèrement la dMO (Figure 5).



**Figure 5 : Relation entre la digestibilité de la matière organique *in vivo* (dMO) et la digestibilité de la matière sèche *in vitro* d'Aufrère (1983) (DCS).** : ○ maïs en quantité limitée ( $R^2=0,47$ ), ● : maïs à volonté ( $R^2=0,52$ ), ● : DCS mesurée sur l'ensilage ( $R^2=0,74$ ), ● : DCS mesurée sur le maïs en vert ( $R^2=0,68$ ), Droite orange :  $y = x$  (Adapté de Andrieu and Baumont, 2000; Peyrat, 2014).

Ce protocole a pour avantage d'être reproductible et adapté à l'ensilage de maïs (Aufrère, 1982). Mais il utilise néanmoins d'importants volumes de matière sèche et de solutions et ne permet pas d'atteindre un haut débit analytique. Depuis 1983 il n'existe pas dans la littérature d'évolution de ce dernier protocole permettant de réduire les volumes expérimentaux et ainsi augmenter les rendements. Il existe néanmoins de multiples paramètres étudiés afin d'essayer d'améliorer l'estimation des valeurs de digestibilité *in vivo*. De plus à partir des valeurs de digestibilité *in vitro* sont mises en place des équations de prédiction de la digestibilité *in vivo* et de l'UFL. L'estimation de la valeur de digestibilité *in vitro* est aussi estimable par d'autres technologies telles que la prédiction NIRS. Une technique moins coûteuse, plus rapide et avec un très haut débit analytique, ne demandant aucun traitement de la matière une fois conditionnée pour l'acquisition spectrale. Dans le paragraphe suivant nous allons voir la mise en place de la prédiction des valeurs de digestibilité *in vivo* et de l'UFL à partir de la digestibilité *in vitro* et d'autres paramètres biochimiques.

### **C. Prédiction de l'UFL à partir de la digestibilité *in vitro* de MS**

Le protocole d'Aufrère sera largement repris pour estimer la DMO de plusieurs espèces fourragères, tel qu'il est préconisé (Aufrère, 1982) et notamment sur du maïs au cours des travaux de Barrière et al., (1991), d'Andrieu et al., (1993) et de Dardenne et al., (1993). Au cours de leurs travaux, ils ont prélevé sur deux ans (1987 et 1988) 234 échantillons (provenant de 15 hybrides couvrant la gamme de précocité et d'un mutant *bm3*) récoltés sur 7 lieux ayant entre 18,3 et 53% de MS (Barrière et al., 1991; Dardenne et al., 1993; Andrieu et al., 1993). De plus ils ont comparé 3 protocoles distincts d'estimation de la DMO *in vitro* (Aufrère and Michalet-Doreau, 1983; Lila et al., 1986) avec des données de digestibilité *in vivo* sur mouton. Pour chacun des protocoles, ils obtiennent à chaque fois des corrélations (*in vivo* vs *in vitro*) significatives avec des coefficients de corrélation compris entre 0,45 et 0,61 (Barrière et al., 1991; Andrieu et al., 1993; Dardenne et al., 1993).

Au cours de ces mêmes travaux ils recueillent également de nombreuses valeurs pour des paramètres physiologiques (%MS, % de grain, % d'épis) et biochimiques (cf ci-dessous) (Barrière et al., 1991; Andrieu et al., 1993; Dardenne et al., 1993). Ces paramètres vont permettre la mise en place d'un grand nombre d'équations de prédiction de la DMO (Barrière et al., 1991; Andrieu et al., 1993; Dardenne et al., 1993).

De plus à partir de ces données, Andrieu (1995) publie 4 modèles de prédictions pour la digestibilité *in vivo*, l'UFL et l'UFV (Tableau 4) à partir de différents paramètres estimés par analyse *in vitro*. Les principaux paramètres utilisés sont la matière azotée total (MAT), la digestibilité *in vitro* de la MS (DSC (Aufrère and Michalet-Doreau, 1983)), la teneur en Amidon (AMI), les fibres insolubles dans le détergent neutre (ou neutral detergent fiber (NDF)), les fibres insolubles dans le détergent acide (ou acide detergent fiber (ADF)) et les celluloses brutes (CB).

**Tableau 4 :Prévisions de la digestibilité de la matière organique (dMO, %) et des valeurs UFL (par 100 kg de MO) à partir de la composition chimique (en g/kg de MO) et de la digestibilité enzymatique d'Aufrère (DCS en %) (Andrieu, 1995).**

								R	RSD		
M1	DMO	=	79,4	+	0,0652 MAT <sub>∅</sub>	-	0,0591 CB <sub>∅</sub>	0,634	1,98		
M2	DMO	=	75,7	+	0,0701 MAT <sub>∅</sub>	+	0,0156 NDF <sub>∅</sub>	-	0,0720 ADF <sub>∅</sub>	0,643	1,97
M3*	DMO	=	32,5	+	0,0764 MAT <sub>∅</sub>	+	0,0049 AMI <sub>∅</sub>	+	0,4700 DCS	0,680	1,88
M4	DMO	=	28,5	+	0,0732 MAT <sub>∅</sub>	+	0,5501 DCS			0,668	1,91
M1	UFL <sub>∅</sub>	=	110,15	+	0,1233 MAT <sub>∅</sub>	-	0,1167 CB <sub>∅</sub>			0,683	3,40
M2	UFL <sub>∅</sub>	=	103,95	+	0,1339 MAT <sub>∅</sub>	+	0,0255 NDF <sub>∅</sub>	-	0,1358 ADF <sub>∅</sub>	0,691	3,37
M3*	UFL <sub>∅</sub>	=	20,20	+	0,1462 MAT <sub>∅</sub>	+	0,0109 AMI <sub>∅</sub>	+	0,8818 DCS	0,724	3,22
M4	UFL <sub>∅</sub>	=	11,38	+	0,1390 MAT <sub>∅</sub>	+	1,0609 DCS			0,707	3,29

\* L'amélioration de la précision liée à la prise en compte de la teneur en amidon (comparaison entre M3 et M4) étant faible, on pourra s'affranchir de sa détermination et utiliser le modèle M4.

C'est le modèle M4 (Tableau 4) qui en 1998 fut retenu et utilisé au cours des études VATE afin prédire la valeur UFL à partir de la matière azotée totale (MAT) et de la DCS (digestibilité enzymatique *in vitro* de Aufrère et Michalet-Doreau (1983)) (Tableau 4) (Andrieu, 1995). Le choix fut porté sur le M4 plus que le M3 car, selon les auteurs, l'amélioration de la précision apporté par la teneur en amidon n'est pas importante (Tableau 4) (Andrieu, 1995; Peyrat, 2014). Il semblerait que ce choix fut basé sur la corrélation de la prédiction avec les valeurs de références, l'ajout d'un indicateur objectif tel que l'AIC (Akaike information criterion) ou BIC (Bayesian information criterion) aurait permis de bien affirmer ce choix.

Néanmoins ces résultats montrent que la variation de la DCS permet d'expliquer 55% de la variation de la digestibilité de la MO *in vivo* (Dardenne et al., 1993; Andrieu, 1995; Peyrat, 2014). De plus ces résultats sont en accord avec des résultats antérieurs (Cummins and Burns, 1969; Roth et al., 1970) qui montrent que la digestibilité *in vitro* de la MS (IVDMD) peut être un bon indicateur de la digestibilité du maïs fourrage (Valdes et al., 1987).

Le modèle M4 fut précisé à partir d'hybrides plus récents récoltés à plusieurs stades par Peyrat et al. (2016) afin d'obtenir le modèle M4.2 (Tableau 5) qui aujourd'hui est très largement utilisé par la communauté du maïs fourrage en France. Comme vu précédemment, le modèle M4.2 est utilisé au cours des études VATE afin de prédire l'UFL, unité de référence comme valeur énergétique de l'ensilage de maïs ("Evaluation de la Valeur Agronomique Technologique et Environnementale (VATE) des nouvelles variétés à l'inscription au Catalogue Français," 2018).

**Tableau 5 : Modèles de prédiction des valeurs UF mis à jour par Peyrat et al., (2016).**

Dans le système d'alimentation INRA 2007, la valeur UF du maïs fourrage en vert, incluant la mise à jour « M4.2 », peut être prédite directement (VI) avec :

### **M4.2**

UFL vert (/kg MO) =

$$0,1877 + 0,001389 \times \text{MAT vert (g/kg MO)} + 0,009491 \times \text{DCS vert (\%)} \\ (\text{N}=290 ; \text{R}^2=0,53 ; \text{ETR}=0,032)$$

UFV vert (/kg MO) =

$$- 0,0080 + 0,001473 \times \text{MAT vert (g/kg MO)} + 0,01073 \times \text{DCS vert (\%)} \\ (\text{N}=290 ; \text{R}^2=0,52 ; \text{ETR}=0,036)$$

En parallèle, de ces recherches dans la mise en place d'une méthode de prédiction de la digestibilité *in vivo* de la matière sèche et de l'UFL, les paramètres biochimiques prédictifs de l'UFL font eux aussi l'objet de recherches prédictives afin d'accélérer les analyses, augmenter le nombre d'échantillons analysés et de réduire les coûts (Valdes et al., 1987; Andrieu et al., 1993; Dardenne et al., 1993; Andrieu, 1995). La technique émergente pour atteindre ces objectifs est la spectroscopie proche infrarouge. Dans le paragraphe suivant nous allons voir comment fonctionne la NIRS et sa mise en place.

## **VI. La technologie de spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR ou NIRS en anglais)**

La spectroscopie proche infrarouge (SPIR ou en anglais near infrared spectroscopy (NIRS)) eu sa première application moderne en 1963 par Norris and Hart pour déterminer la teneur en humidité de graines à partir de spectres de spectrométrie infrarouge. Dès les années 70 la spectrométrie infra rouge est appliquée pour prédire rapidement la teneur en protéines et en eau de graines et d'huiles (Hymowitz et al., 1974; Norris et al., 1976). Puis cette technique

fut appliquée sur des fourrages afin de déterminer leurs digestibilités et teneurs de différents composés biochimique (Valdes et al., 1987; Norris et al., 1976; Andrieu et al., 1993; Dardenne et al., 1993; Andrieu, 1995).

## Principe

La méthode NIRS se base sur le principe de réflectance de la matière dans le proche infrarouge pour des nombres d'ondes compris entre 4000 et 10000  $\text{cm}^{-1}$ . Sous l'incidence d'un rayonnement infrarouge les liaisons chimiques de la matière absorbent l'énergie et entrent en vibration. Puis la matière va libérer une partie de l'énergie par réflectance. Sachant que la couche de matière étudiée ne permet pas au rayonnement d'être transmis, l'absorbance est définie comme étant le logarithme de l'inverse de la reflectance (Giordanengo et al., 2009).

$$A = \text{Log} \left( \frac{1}{R} \right) \quad \& \quad R = \frac{(I_r + I_{rd})}{I_0}$$

Où : A= Absorbance

R= Réflectance

La réflectance est la somme de deux types d'intensités de réflexion non dissociables, la réflexion spéculaire ( $I_r$ ) et la réflexion diffuse ( $I_{rd}$ ) sur l'intensité du rayon incident ( $I_0$ ) (Giordanengo et al., 2009).

A l'issue de ce procédé est obtenu un spectre d'absorbance NIRS composé d'environ 1500 variables, chaque spectre est dit spécifique de l'échantillon. L'acquisition d'un ensemble d'échantillons permet la mise en place d'équations de prédictions. En parallèle de la prise de spectre, un certain nombre d'analyses peuvent être effectuées. Les valeurs de ces analyses seront utilisées comme références lors de la mise en place de l'équation. Afin de commencer à calibrer une équation, il faut un minimum d'une cinquantaine d'échantillons caractérisés en biochimie et dont les spectres NIRS ont été acquis. Une série d'environ deux tiers des échantillons sera utilisée pour calibrer l'équation (dès lors que plus de 100 échantillons sont disponibles) et le tiers restant permettra de faire une validation externe de l'équation (sinon une validation croisée sera réalisée). La construction d'une équation passe par deux étapes, il y a dans un premier temps un traitement spectral qui permet de lisser, normaliser et dériver les spectres. Il existe un grand nombre de traitements spectraux tels que Savitzky-Golay derivate (SG), Variable Sorting for Normalisation (VSN), Probabilistic Quotient Normalisation (PQN),



Standard Normal Variate (SNV), Robust Normal Variate (RNV), Multiplicative Scatter Correction (MSC). Puis dans un deuxième temps, il y a la calibration puis la validation croisée utilisant des méthodes telles que la Partial Least Squares Regression (PLSR), Principal Component Regression (PCR) ou leurs différentes dérivées.

La sélection de l'équation finale se fera en comparant les différents indices des modèles tels que le  $r$  (corrélation) de validation et de calibration, Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC), Root Mean Square Error of Cross-Validation (RMSECV), Root Mean Square Error of Validation (RMSEV). L'équation ayant les meilleures caractéristiques sera employée afin de prédire un très grand nombre d'échantillons pour lesquels seule la prise de spectre sera nécessaire.

La NIRS est utilisée comme outil permettant de prédire rapidement les caractères biochimiques du maïs à partir d'analyses précédemment effectuées en biochimie sur de la matière sèche ou de la paroi extraite de maïs. Dans le paragraphe VII nous allons détailler la composition de la matière sèche et des parois de maïs.

## VII. Composition de la matière sèche de maïs

Lorsque le maïs fourrage atteint le stade de maturité ensilage fin aout / mi-septembre soit environ 32-35% de matière sèche, il est récolté avec un ensileuse qui coupe la tige à sa base puis broie la plante avant qu'elle ne soit ensilée. Afin d'analyser la composition biochimique de la biomasse ainsi récoltée, un échantillon (environ 300g de matière fraîche) de ce broyat est récupéré pour être broyé plus finement afin d'être analysé en laboratoire.

### A. Composition et relations entre les teneurs en constituants de la MS et sa digestibilité

La matière sèche d'une plante de maïs est composée de 3 compartiments : l'amidon, les solubles et les parois.

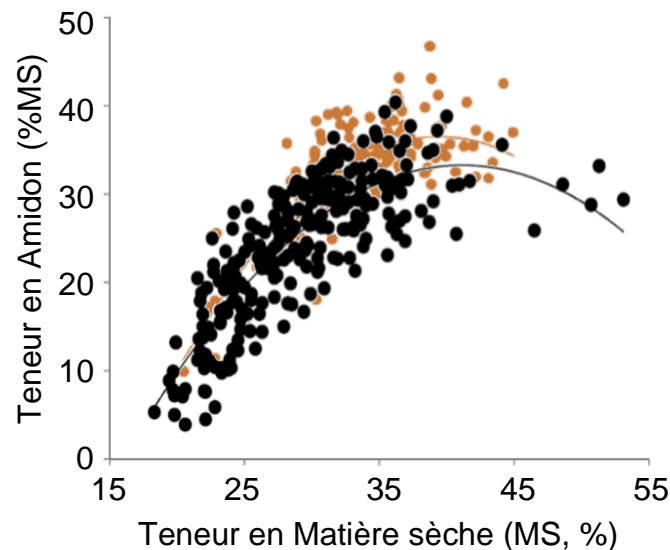
#### 1. Amidon

L'amidon représente une part importante de la MS de maïs fourrage, il provient majoritairement des grains de l'épi de maïs. L'amidon peut représenter en moyenne 33% de la MS au stade de récolte ensilage (Khan et al., 2014; Peyrat, 2014; INRA, 2018). La teneur en amidon de la MS est dépendante du stade de maturité de la plante (Figure 6) (Khan et al., 2014; Peyrat, 2014; INRA, 2018). Une augmentation linéaire de la teneur en amidon est observée



jusqu'au stade de récolte ensilage où une variabilité de teneur en amidon de 20 à 40% est observée. Au-delà du stade ensilage (35-37%MS) la teneur en amidon semble diminuer (Figure 6) (Khan et al., 2014; Peyrat, 2014; INRA, 2018).

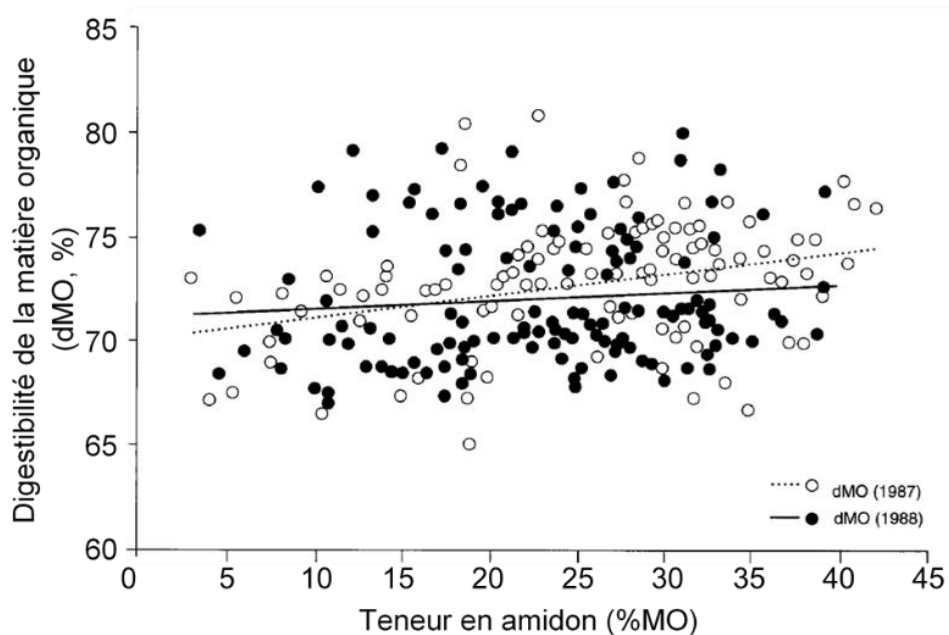
*In vivo* la digestibilité de l'amidon est en moyenne de 99% (Fernandez et al., 2004; Jensen et al., 2005; Peyrat, 2014). La digestibilité de l'amidon *in vivo* diminue très faiblement avec l'augmentation de la maturité de la plante (Bal et al., 1997; Fernandez et al., 2004; Jensen et al., 2005). Selon Jensen et al., (2005) la digestibilité *in vivo* de l'amidon diminuerait de 100% à 98% ( $P=0.01$ ) avec l'augmentation de la maturité de la plante.



**Figure 6 : Relations entre la teneur en matière sèche et la teneur en amidon.** Cette Figure regroupe les données de teneurs en amidon de maïs récoltés à différents stades de maturité. Les points orange issus de la revue de Khan et al., (2017) dont les données sont issues de 3 projets de thèse de 1992 à 2013 travaillant sur du maïs ensilage. (Adapté de INRA, 2007 (noir) ; Khan et al., 2014 (orange))

L'amidon est digéré à 90% au niveau du rumen et d'après Jensen et al., (2005) la digestibilité ruminale de l'amidon diminuerait de 2% entre 25 et 40 %MS alors que d'après Fernandez et al., (2004) la digestibilité ruminale diminuerait d'environ 14% entre 20 et 30 %MS (Fernandez et al., 2004; Jensen et al., 2005; Jurjanz and Monteils, 2005; Peyrat, 2014).

L'augmentation de la teneur en amidon pour améliorer la digestibilité de la MS n'est pas une solution, car il n'existe pas chez le maïs ensilage de corrélation entre la teneur en amidon et la digestibilité de la matière organique (Figure 7) (Demarquilly, 1994).

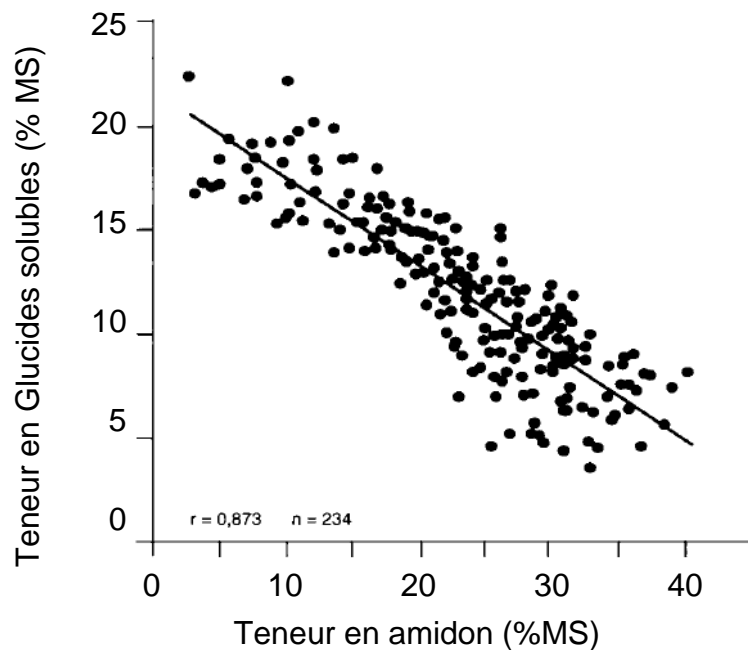


**Figure 7 : Relation entre la digestibilité de la matière organique (dMO) et la teneur en amidon chez le maïs.** Données de 15 hybrides de maïs ensilage récoltés à différents stades de maturité répartis dans 7 lieux sur deux années (Adapté de Demarquilly, 1994).

De plus un apport trop important en amidon entraîne une diminution du pH ruminal ou acidose ruminale (Peyraud and Apper-Bossard, 2006; INRA, 2018). L'acidose ruminale induit une ingestion irrégulière et une faible teneur en matière grasse du lait (Peyraud and Apper-Bossard, 2006; INRA, 2018). Il est donc recommandé de ne pas dépasser une teneur en amidon d'environ 25% dans la ration pour limiter le risque d'acidose (Peyraud and Apper-Bossard, 2006).

## 2. Les solubles

L'ensemble des éléments solubles correspond aux constituants cytoplasmiques et représente environ 20 à 30% de la matière sèche. La fraction soluble est principalement constituée de glucides solubles et de matières azotées totales (MAT). Ils sont considérés comme totalement digestibles (Andrieu et al., 1999; Andrieu and Baumont, 2000). Les glucides solubles représentent 5 à 20 %MS. Il existe une corrélation négative significative entre les glucides solubles et la teneur en amidon dans la matière sèche (Figure 8) (Demarquilly, 1994). Cette corrélation est liée à la maturité de la plante, plus la plante sera mature plus elle va puiser dans les sucres solubles pour se charger en amidon (Demarquilly, 1994).



**Figure 8 : Relation entre la teneur en glucides solubles et la teneur en amidon,  $r$  =coefficient de corrélation,  $n$  = nombre d'échantillon (Adapté de Demarquilly, 1994).**

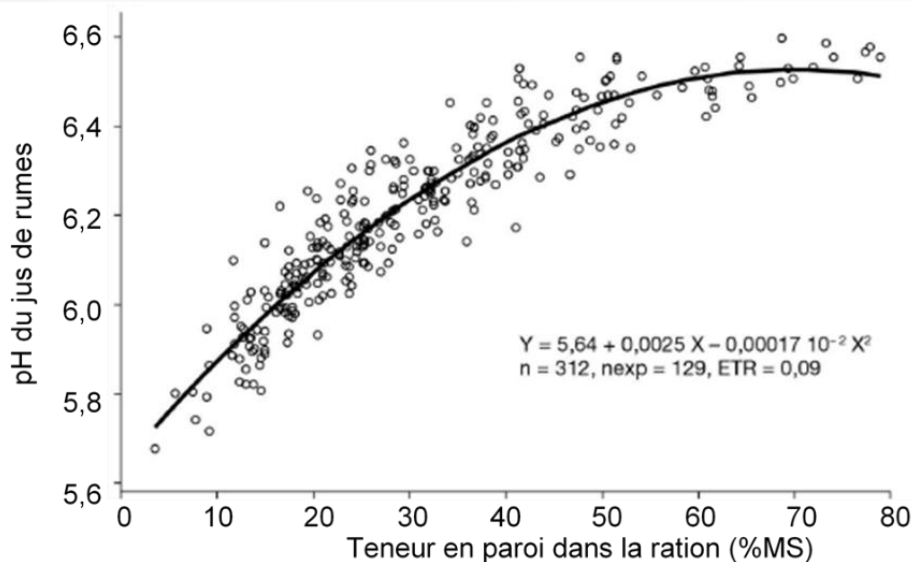
La matière azotée totale permet d'estimer la teneur en protéines et représente en moyenne 7 à 8% de la MS (Michalet-Doreau et al., 2004). La matière azotée totale est principalement localisée dans le grain (60%) puis la tige (20%) (Michalet-Doreau et al., 2004). Il n'y a pas de corrélation certaine entre la digestibilité de la matière sèche et la teneur en protéines (Michalet-Doreau et al., 2004).

### 3. La paroi

La paroi cellulaire est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques de la plante : la structure et le maintien de la plante, la croissance et la différenciation cellulaire, la communication cellulaire et les mouvements hydriques, la résistance à la verse et aux stress biotiques ou abiotiques (Santiago et al., 2013).

Les parois sont issues principalement de la partie non grain de la plante, donc de la tige, des feuilles et de la rafle, respectivement 62%, 26% et 12% (Masoero et al., 2006). La teneur de paroi représente entre 40 à 60% de la matière sèche de maïs en plante entière récoltée au stade ensilage. La teneur en paroi est influencée par le stade de maturité de la plante (Andrieu and Baumont, 2000; Zhang et al., 2011; INRA, 2018). Dans une ration la teneur en paroi doit être comprise entre 30% et 50%, pas moins de 30% pour maintenir le pH du rumen de la vache (entre 5,8 et 6) et pas plus de 50% pour ne pas trop diminuer la digestibilité de la matière organique et augmenter l'effet d'encombrement de la ration (Figure 9) (INRA, 2018).

**Figure 9 : Relation entre le pH du jus de rumen et la teneur en parois dans la ration, n = nombre d'échantillon, ETR = écart-type résiduel (Adapté de INRA, 2018).**

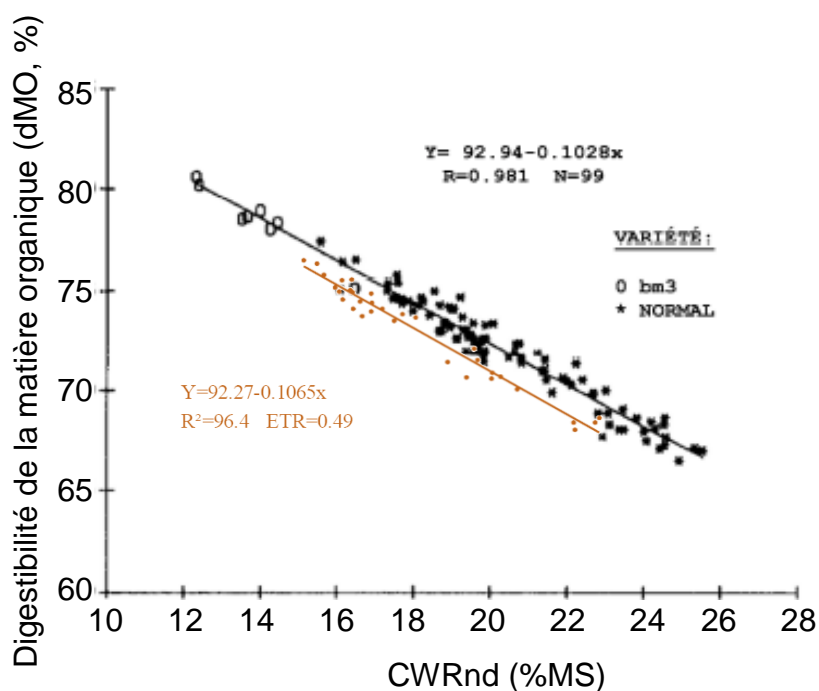


La digestibilité de la paroi est le principal facteur limitant de la digestibilité de la MS (Andrieu et al., 1999).

En 1983, Struik propose de calculer la digestibilité *in vitro* de la paroi à partir de la digestibilité de la MS, la teneur en cendres et la teneur en parois et montre, à partir de 5 génotypes, un coefficient de détermination élevé ( $R^2=0,874$ ) entre la digestibilité de la MS et la digestibilité de la paroi pour 10 sous fractions d'organes ou de tissus (Struik, 1983).

La digestibilité des parois est très variable, passant du simple au double, d'environ 30% à 60% de la paroi (Andrieu et al., 1999; Surault et al., 2005; Peyrat et al., 2016). La teneur en paroi non digestible est la quantité de parois végétales de maïs ensilage non digérée *in vivo* (CWRnd). CWRnd est corrélée négativement avec la digestibilité de la MO (Figure 10) (Andrieu et al., 1993; Sauvart and Noziere, 2013a, 2013b; Peyrat, 2014).

**Figure 10 : Relation entre la digestibilité de la matière organique (dMO) et la teneur en CWR non digestible (CWRnd).** Cette Figure regroupe les données de 15 hybrides de maïs ensilage et une lignée mutant *bm3* récoltés à différents stades de maturité, répartis dans 7 lieux sur deux années issues de Dardenne et al., (1993) en noir, ainsi que les données de 4 hybrides de maïs ensilage récoltés à 4 stades de maturité sur deux années issues de Peyrat (2014) en orange (Adapté de Dardenne et al., 1993; Peyrat, 2014).



Méchin et al., (2000) comparent 4 méthodes, deux méthodes reposant sur le calcul et deux méthodes reposant sur des mesures *in vitro*, pour estimer la digestibilité de la paroi.

Les méthodes *in silico* font appel à des paramètres mesurés tels que la digestibilité de la matière sèche et la teneur en paroi (dans la première méthode = ISCWRD1) ou la teneur en paroi dans le résidu non digestible obtenu après digestion de la matière sèche (CWR.IVDMD) (la deuxième méthode = ISCWRD2) (Méchin et al., 2000). La première méthode contrairement à la deuxième fait l'hypothèse que seule la paroi cellulaire peut être non digestible.

Méthodes de calcul :

$$\text{ISCWRD1} = 100 \times [\text{IVDMD} - (100 - \text{CWR})] / \text{CWR}$$

$$\text{ISCWRD2} = 100 - [\text{CWR.IVDMD} \times (100 - \text{IVDMD})] / \text{CWR}$$

Pour les méthodes *in vitro* une digestion enzymatique est appliquée sur du résidu pariétal obtenu via la chaîne Van Soest (Deinum and Van Soest, 1969) (dans première méthode = IVCWRD1) ou un résidu pariétal obtenu après application d'une solution aqueuse (la deuxième méthode = IVCWRD2) (Méchin et al., 2000). Les estimations de la digestibilité de la paroi d'échantillons de tiges de maïs obtenues à partir de ces 4 méthodes sont très bien corrélées entre elles (Tableau 6) (Méchin et al., 2000).

**Tableau 6 : Coefficients de corrélation (r) entre les différentes méthodes d'estimation de la digestibilité de paroi.** Données obtenues à partir d'échantillons de tiges de maïs de 22 lignées (dont quatre sont des *bm3* : triangle vert) et à partir d'échantillons de tiges de maïs de 18 lignées normales (triangle orange) (Adapté de Méchin et al., 2000).

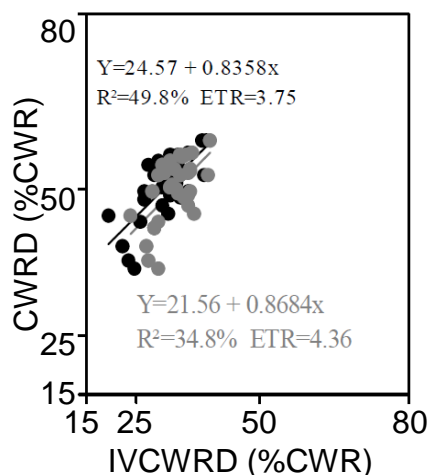
	ISCWRD2	ISCWRD1	IVCWRD1	IVCWRD2
ISCWRD2		0,97**	0,91**	0,91**
ISCWRD1	0,99**		0,91**	0,93**
IVCWRD1	0,96**	0,95**		0,89**
IVCWRD2	0,95**	0,95**	0,93**	

Puis en 2014, Peyrat propose un protocole *in vitro* d'estimation de la digestibilité des parois (IVCWRD) sur la base des protocoles de Van Soest and Wine (1967) et de la digestibilité d'Aufrère (1983) pour l'obtention du résidu pariétal dans un premier temps et de sa digestibilité (IVCWRD) dans un deuxième temps, très similaire à la digestibilité sur paroi (IVCWRD1) de Méchin et al., (2000). Néanmoins la méthode de Peyrat (2014) sous-estime la digestibilité de

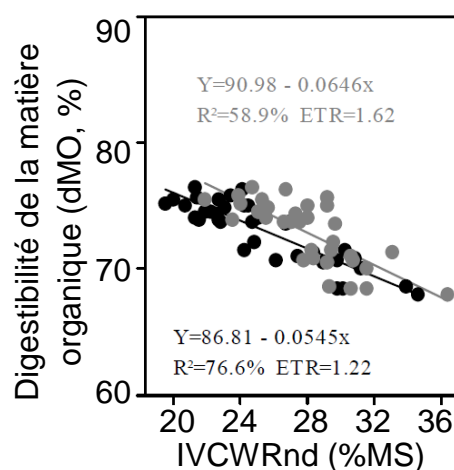
la paroi *in vivo* (Figure 11) (Peyrat, 2014). Il existe une corrélation négative des résidus non digestibles estimés *in vitro* (IVCWRnd) avec la digestibilité de la MO ( $R^2$  d'environ 0.65) (Figure 12) mais elle est moins importante que lorsque la CWRnd est estimée *in vivo* ( $R^2$  d'environ 0,96) (Figure 10), cela est sûrement dû aux approximations des protocoles *in vitro*.

IVCWRnd (%MS) est calculée à partir de la teneur en paroi (CWR, %MS) du maïs fourrage et de la digestibilité de cette paroi (IVCWRD, %CWR) :

$$IVCWRnd = CWR * (100-IVCWRD) / 100$$



**Figure 11 : Corrélation entre la digestibilité de la paroi *in vivo* (CWRD) et *in vitro* (IVCWRD) du résidu pariétale,  $R^2$  = coefficient de détermination, ETR = écart-type résiduel (Adapté de Peyrat, 2014).**



**Figure 12 : Relation entre la digestibilité de la matière organique (dMO) et la teneur en CWR non digestible dans la MS estimé *in vitro* (IVCWRnd),  $R^2$  = coefficient de détermination, ETR = écart-type résiduel (Adapté de Peyrat, 2014).**

Pour les Figures 11 et 12 les données sont issues de Peyrat (2014) regroupant les informations de 4 hybrides de maïs ensilage récoltés à 4 stades de maturité sur deux années.

De plus, IVCWRD est dépendant de la composition pariétale (El Hage, 2018; El Hage et al., 2021) ainsi que de la répartition de la lignification au sein des tissus de la tige de maïs (El Hage et al., 2018). La composition ainsi que la répartition de la lignification évoluent en fonction de la maturité de la plante (Zhang et al., 2019). La composition pariétale et la répartition tissulaire au sein de la tige sont les leviers importants d'amélioration de la digestibilité de la paroi et donc de la digestibilité de la matière sèche permettant d'améliorer l'UFL (Andrieu et al., 1999). Il est estimé que l'amélioration de 1% de IVCWRD augmente significativement la production de lait de 0,08 à 0,20 kg.J<sup>-1</sup> (Oba and Allen, 1999; Krämer-Schmid et al., 2016).



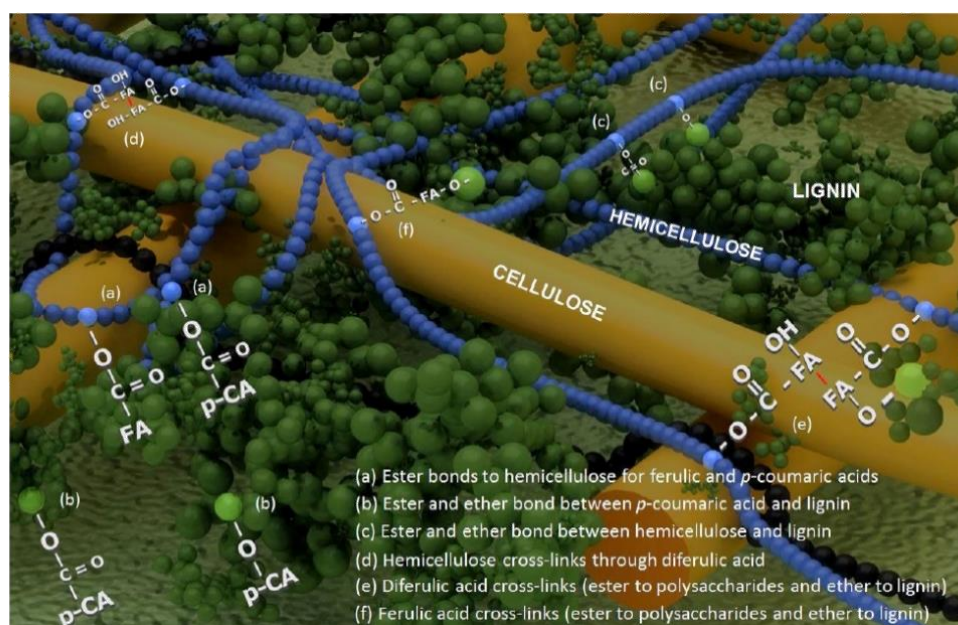
Dans le paragraphe suivant de l'introduction, nous allons voir plus en détails la composition ainsi que la structure des constituants pariétaux chez le maïs fourrage ainsi que leurs relations avec la digestibilité.

## VIII. Composition de la paroi cellulaire du maïs

L'étude des composants biochimiques, leurs structures, leurs interactions et leurs répartitions est essentielle pour une bonne compréhension des corrélations entre les composés de la biomasse pariétale et leurs digestibilités.

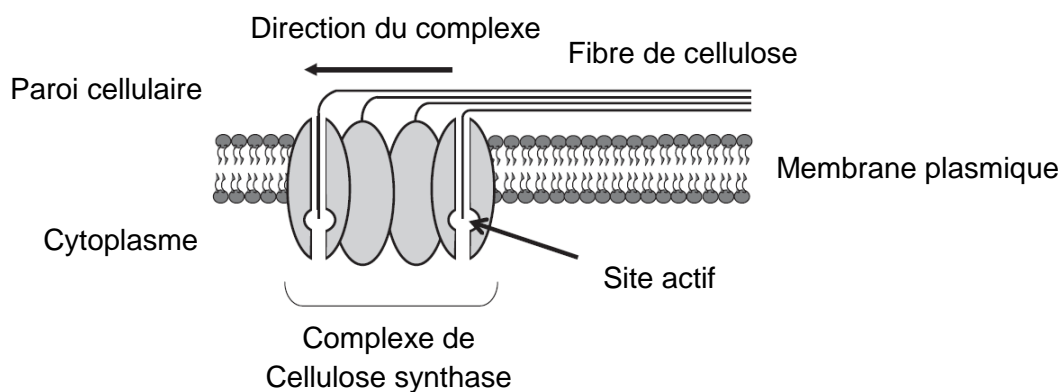
Les parois de maïs fourrage au stade de récolte ensilage sont majoritairement composées de 2 types de constituants. La première catégorie est constituée de polysaccharides que sont la cellulose et les hémicelluloses. Le deuxième type de constituants regroupe des composés phénoliques que sont les lignines et les acides *p*-hydroxycinnamiques (Barros-Rios et al., 2011a; Santiago et al., 2013; El Hage, 2018). Ces 4 composés (cellulose, hémicelluloses, lignines et acides *p*-hydroxycinnamiques) possèdent des structures, des compositions complexes et/ou des teneurs qui vont évoluer en fonction du stade de maturité de la plante (Aufrère et al., 1992; Masoero et al., 2006; Zhang et al., 2019), de l'environnement (El Hage et al., 2021, 2018), de l'origine tissulaire (Struik, 1983; Jung and Casler, 2006a, 2006b; Masoero et al., 2006; Perrier et al., 2017; El Hage et al., 2018) et du génotype de maïs (El Hage et al., 2021). De plus, ils interagissent directement ou indirectement entre eux afin de former la paroi cellulaire (Figure 13) (Barros-Rios et al., 2012a, 2011b; Kang et al., 2019; Terrett and Dupree, 2019). Pour la suite de ce chapitre « composition de la paroi cellulaire du maïs » nous nous intéresserons uniquement à la composition des parois de maïs fourrages récoltés au stade ensilage.

**Figure 13 : Représentation de la structure de la paroi secondaire du maïs** (Santiago et al., 2013).

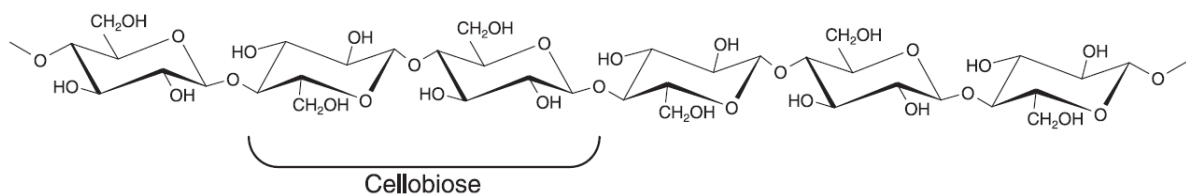


## A. La cellulose : composition, structure et relations avec la digestibilité

La cellulose représente environ 30 à 40% des parois chez le maïs ensilage (Vogel, 2008; Masoero et al., 2006; INRA, 2018; El Hage et al., 2018, 2021), c'est le plus simple et le plus abondant des polysaccharides composant la paroi cellulaire (Taylor, 2008). La cellulose est synthétisée par un complexe de protéines transmembranaires à 6 lobes dont chacun est composé de différentes sous unités de cellulose synthase (CesA) (Figure 14) (Barros-Rios et al., 2011a; Taylor, 2008). La cellulose est un homopolymère linéaire composé de molécules de D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$ . Au sein de la chaîne on retrouve répété le cellobiose qui est un dimère de glucose liés par des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figure 15) (Barros-Rios et al., 2011a; Santiago et al., 2013).



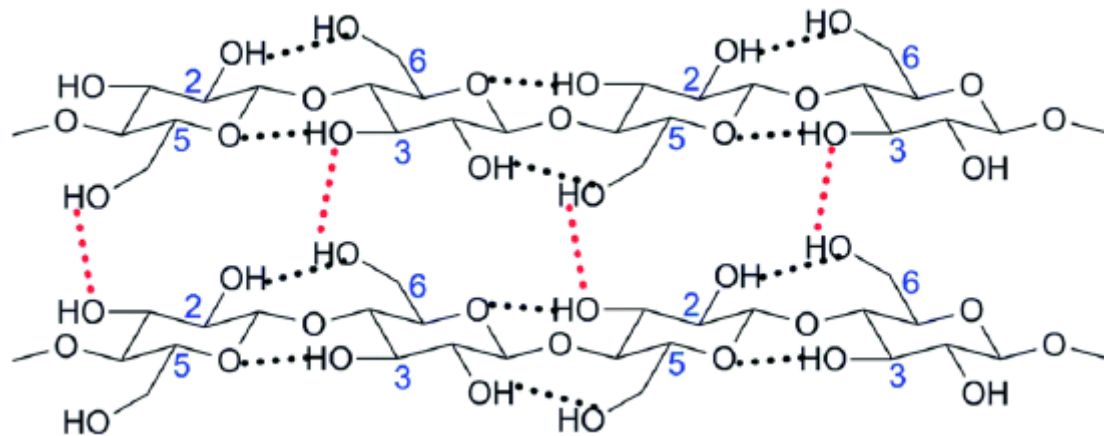
**Figure 14 : Modèle d'un complexe d'enzyme cellulose synthétase synthétisant une microfibrille de cellulose.** Coupe transversale au niveau du complexe protéique de cellulose synthase. L'élongation d'une chaîne de cellulose s'effectue au niveau du site actif d'une des sous unités catalytiques et va au niveau extracellulaire cristalliser lorsqu'elle pénètre dans la paroi (Adapté de Taylor, 2008).



**Figure 15 : Structure d'une chaîne de cellulose ( $\beta(1\rightarrow4)$  glucan).** La cellobiose est l'unité répétée au sein de la chaîne. (Adapté de Vogel, 2008)



De plus, il y a aussi deux types de liaisons hydrogènes non covalentes qui permettent de structurer les chaînes de cellulose, les premières sont au sein d'une même chaîne de D-glucopyranose (intramoléculaire, Figure 16, pointillé noir) alors que les deuxièmes se font entre les différentes chaînes de  $\beta(1\rightarrow4)$  glucan (intermoléculaire, Figure 16, pointillé rouge) (Credou and Berthelot, 2014). Ces liaisons hydrogènes non covalentes augmenteraient la cristallinité de la fibre de cellulose (Hatfield, 1989; Weimer, 1992; Hatfield, 1993).



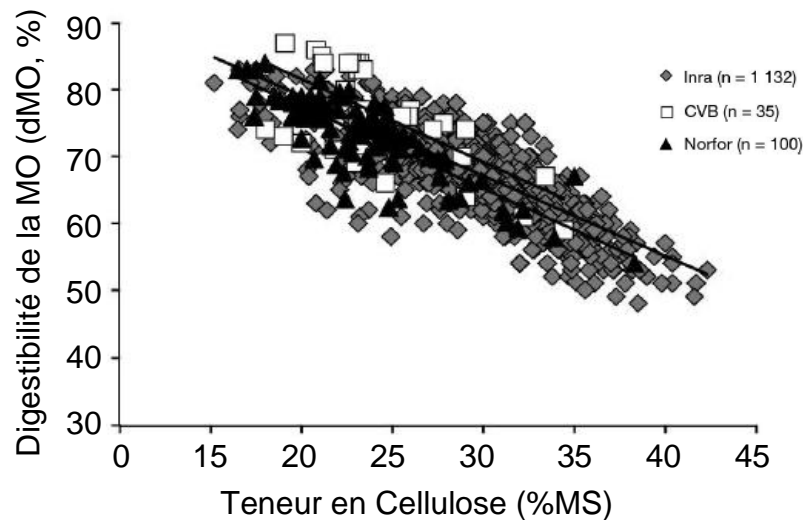
**Figure 16 : Structure de deux chaînes de cellulose ( $\beta(1\rightarrow4)$  glucan) liées par des liaisons hydrogènes non covalentes.** Les pointillés noirs représentent les liaisons intramoléculaires alors que les pointillés rouges représentent les liaisons intermoléculaires. (Adapté de Credou and Berthelot, 2014)

La dégradation de la cellulose est effectuée par des bactéries cellulolytiques symbiotiques qui sécrètent des enzymes pour cliver les liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$  afin de produire le cellobiose qui sera ensuite incorporé pour être hydrolysé dans la bactérie en glucose (Kaufmann et al., 1980; Weimer, 1992). La cellulose est dégradée en majorité dans le rumen chez le mouton ou la vache (Gray, 1947; Fauconneau et al., 1953). Même si la cellulose est un sucre et peut être dégradée par des enzymes bactériennes, sa vitesse de dégradation est relativement lente en comparaison de celle de l'amidon (Kaufmann et al., 1980).

La digestibilité de la cellulose serait d'environ 50 % (Fauconneau et al., 1953) et dépendrait de sa cristallinité (Coninck-Chosson, 1988; Weimer, 1992). Dans ce sens, Andrieu et al., (1993) montrent que la digestibilité *in vivo* de la cellulose de maïs ensilage est d'environ 57 %.

Il est montré que la teneur en cellulose dans la matière sèche est négativement corrélée à la digestibilité (Figure 17) (INRA, 2018), et que cette corrélation est de 0.90 chez une population de 15 lignés étudiées dans une quinzaine d'environnements sur 2 ans (Argillier et

al., 1995). De plus, El Hage et al., (2018) montrent que la teneur en cellulose dans les parois est aussi négativement corrélée à la IVCWRD.

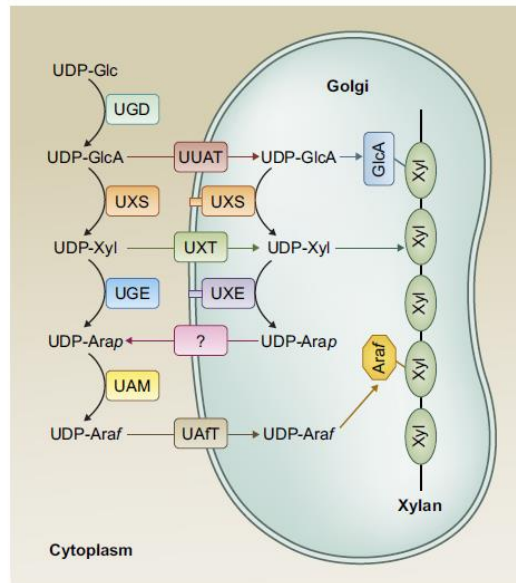


**Figure 17 : Relation entre la digestibilité de la matière organique (dMO, %) et la teneur en cellulose (%MS).** Ce graphique regroupe des données de fourrages (d'espèces fourragères de graminées, légumineuses, céréales et de prairies) obtenues à partir de 3 bases de données (INRAe (France), CVB (Pays-Bas), NorFor (Pays nordiques)) (Adapté de INRA, 2018)

## B. Les hémicelluloses : composition, structure et relations avec la digestibilité

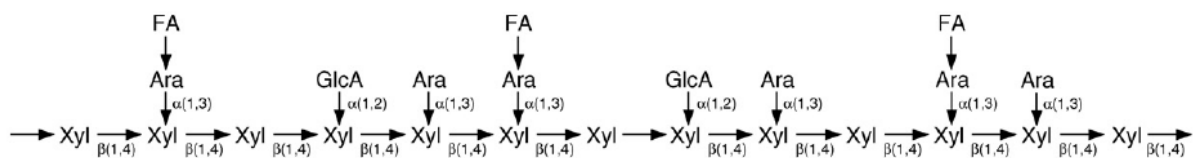
Les hémicelluloses sont le deuxième composé le plus présent dans les parois, avec environ 35 à 50% dans les parois chez le maïs ensilage (Masoero et al., 2006; Jin et al., 2009; Santiago et al., 2013). Comme la cellulose, les hémicelluloses peuvent être quantifiées par la méthode de solubilisation séquentielle de Van Soest (Van Soest and Wine, 1967; Van Soest et al., 1991). Les hémicelluloses sont des polysaccharides pariétaux complexes composés de plusieurs sous unités saccharidiques différentes ayant des chaînes et des modèles répétés différents (Vogel, 2008). La structure des hémicelluloses évolue au cours du développement, les teneurs des différentes structures vont évoluer en fonction du type de paroi cellulaire (Ishii, 1997; Terrett and Dupree, 2019; Vogel, 2008). La teneur totale en hémicelluloses va augmenter au cours du développement (Andrieu et al., 1993).

Les hémicelluloses sont synthétisées dans l'appareil de Golgi (Figure 18) et sécrétées par exocytose au niveau de la membrane plasmique (Carpita, 1996; Terrett and Dupree, 2019; Zhong et al., 2019).



**Figure 18 : Schéma synthétique du transport puis de la polymérisation des sucres impliqués dans la synthèse des hémicelluloses glucuronoarabinoxylans (GAX) dans le golgi d'Arabidopsis thaliana.** UAFT, transporteur d'UDP-Araf; UAM, UDP-Ara mutase; UGD, UDP-Glc 6-déshydrogénase; UGE, UDP-glucose 4-épimérase; UUAT, transporteur d'acide UDP-uronique; UXE, UDP-Xyl 4-épimérase; UXS, UDP-Xyl synthase; UXT, transporteur UDP-Xyl (Zhong et al., 2019).

La forme la plus présente des hémicelluloses chez le maïs est le glucuronoarabinoxylane (GAX). Les GAX sont composés d'une chaîne de monomères de xylose liés par des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$ . Cette chaîne est ramifiée d'unités  $\beta(1,3)$ arabinofuranose,  $\beta(1,3)$ arabinofuranose (5-O)acide férulique (Figure 19) (Carpita, 1996; Vogel, 2008; Santiago et al., 2013; Terrett and Dupree, 2019; Zhong et al., 2019).



**Figure 19 : Structure de l'hémicellulose de type glucuronoarabinoxylans (GAX).** Gax est une chaîne de xylose (Xyl) liés par des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$  ramifiée par des sous unité arabinose (Ara), acide glucuronique(GlcA) et acide férulique (FA) (adapté de Vogel, 2008).

D'autres types d'hémicelluloses sont présentes dans les parois de maïs ensilage : les mixed linkage glucans (MLG), les xyloglucan (XyG) et les mannans / glucomanans (Carpita, 1996; Ishii, 1997; Terrett and Dupree, 2019; Vogel, 2008).

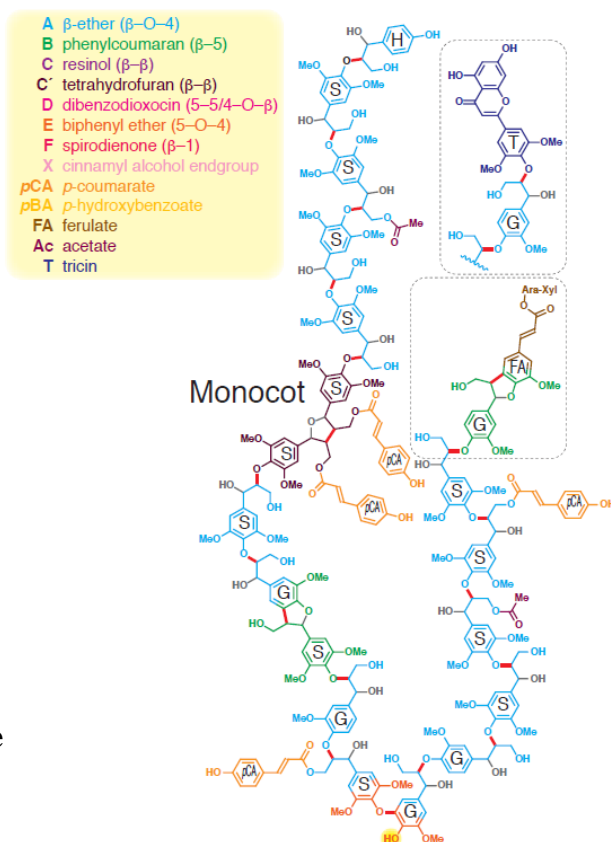
Comme pour la cellulose, les hémicelluloses vont être dégradables par des bactéries à activité hémicellulosique principalement au niveau du rumen (Kaufmann et al., 1980; Barrière

and Emile, 2000). Les hémicelluloses pures semblent être presque entièrement dégradables (Jin et al., 2009) alors que la digestibilité *in vivo* des hémicelluloses est d'environ 60 % (Andrieu et al., 1993).

La teneur en hémicelluloses dans les parois ne semble pas corrélée avec la digestibilité des parois (El Hage et al., 2018). En revanche, la teneur en hémicelluloses dans la matière sèche est corrélée positivement avec la teneur en parois non dégradables (Jancik et al., 2008) et donc négativement avec la digestibilité de la MS (Argillier et al., 1995) sûrement du fait d'une augmentation de la teneur en paroi plutôt que d'une augmentation des hémicelluloses à proprement parler.

### C. Les lignines : composition, structure et relations avec la digestibilité

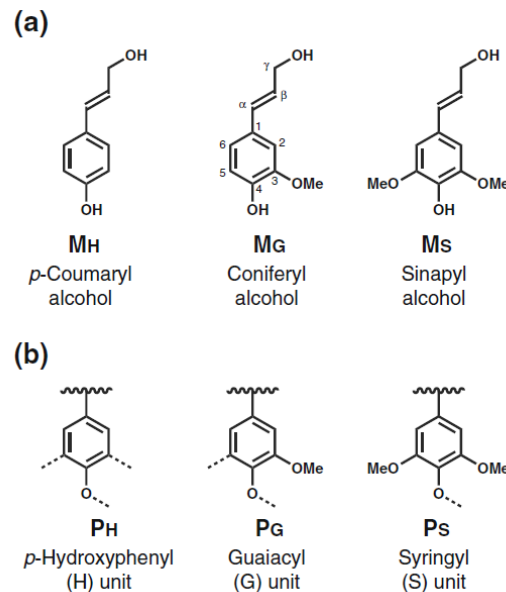
La lignine est un polymère complexe constitué de sous unités phénoliques (Figure20) (Ralph et al., 2019).



**Figure 20 : Structure modèle de lignine de monocotylédone** (Ralph et al., 2019).

La lignine est composée de plusieurs sous-unités phénoliques (monolignols) dont les principales sont p-Hydroxyphenyl (H), Guaiacyl (G) et Syringyl (S), qui sont liées entre elles par une grande diversité de liaisons (Figure 21) (Ralph, 2010; Santiago et al., 2013; J. P. Wang et al., 2019). Les sous unités S ont la particularité chez le maïs d'être acylées en position gamma

par de l'acide *p*-coumarique dans 10 à 25 % des cas (12 % en moyenne dans (Zhang et al., 2011)). L'acide *p*-coumarique lié à la chaîne de lignine augmente son encombrement. C'est aussi un intermédiaire important dans la voie de biosynthèse des monolignols (Figure 22) (Terashima et al., 1993; Riboulet et al., 2009). Ces sous-unités sont incorporées dans le polymère de lignine (Karlen et al., 2018). Des sous unités plus atypiques sont aussi incorporées au sein du polymère de lignine (Vanholme et al., 2019). Nous noterons que la lignine incorpore aussi chez le maïs des acides férulique (Ralph et al., 2008; Méchin et al., 2014).



**Figure 21 : Principales sous-unités composant la lignine, (A) Sous forme de monolignol (B) Incorporées dans le polymère de lignine (Adapté de Ralph, 2010).**

Les sous unités monolignols qui sont liées par des liaisons  $\beta$ O4 ou  $\alpha$ O4 peuvent être quantifiées par la méthode de thioacidolyse (Lapierre et al., 1986). Chez le maïs, le rendement obtenu représente moins de 25% de la lignine (Lapierre, 1993). Il est estimé chez le maïs que H, G et S représentent respectivement environ 5%, 49% et 46% du rendement des monolignols liés uniquement en  $\beta$ O4 quantifiés (liaisons de type A, Figure 20) (Lapierre, 1993; Kumar et al., 2020).

Les sous unités monolignols sont synthétisées au niveau cytoplasmique à partir de la phénylalanine et de la tyrosine via un maillage métabolique multienzymatique (Figure 22) (Riboulet et al., 2009; Halpin, 2019; Vanholme et al., 2019; J. P. Wang et al., 2019; Zhong et al., 2019). Le transport et la compartimentation intracellulaire des monolignols dépendra de leurs types de glycosylations (Wang et al., 2013). Puis au niveau pariétal deux types d'enzymes, les laccases et les peroxydases, permettront de polymériser la lignine (Tobimatsu and Schuetz, 2019).

## Introduction

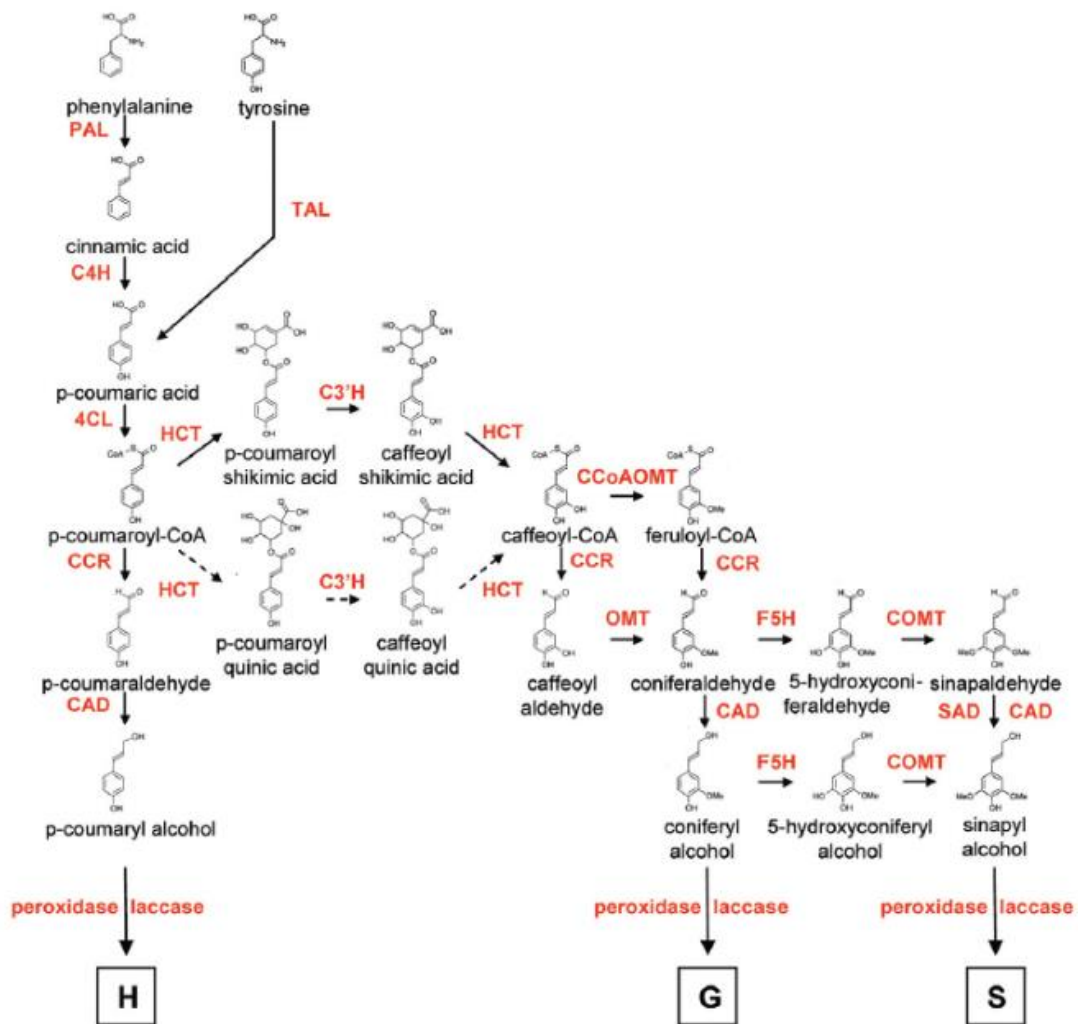
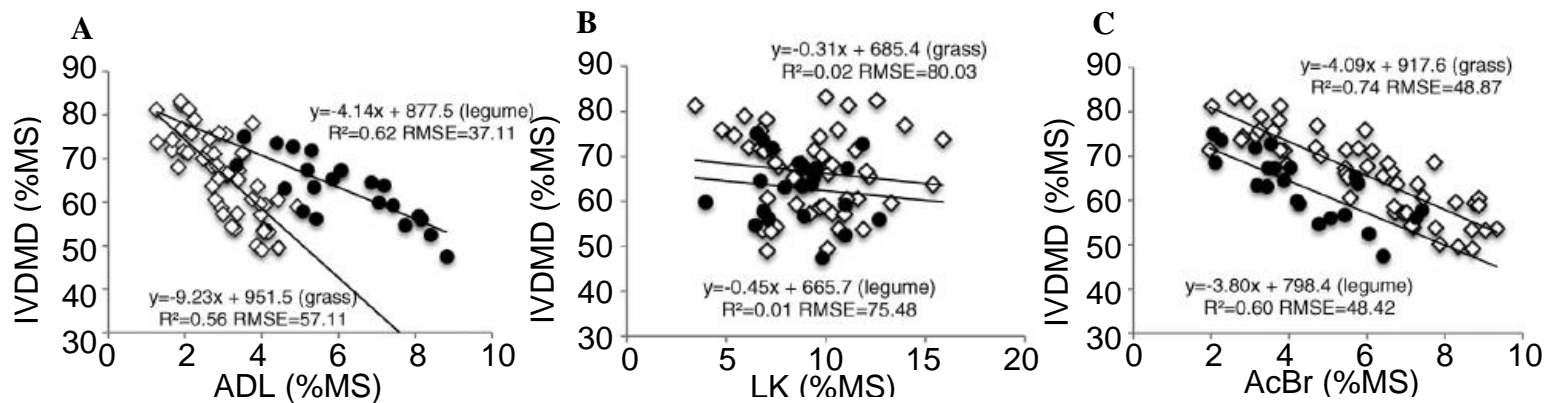


Figure 22 : Voie de biosynthèse des monolignols chez le maïs (Riboulet et al., 2009).

Aujourd'hui la teneur en lignine est quantifiée principalement par 3 méthodes : via la fragmentation séquentielle de Van Soest avec l'obtention finale de la fraction d' acid detergent lignin (ADL) (Van Soest and Wine, 1967; Van Soest et al., 1991), via une méthode spectrométrique quantifiant le bromure d'acétyle fixé sur la lignine solubilisée afin d'obtenir l'acetyl bromide lignin (AcBr) (Fukushima and Hatfield, 2004, 2001), et via une méthode gravimétrique qui utilise les propriétés insolubles des lignines dans l' $H_2SO_4$  pour obtenir la lignine de Klason (LK) (Dence, 1992). Les teneurs en lignine obtenues par ces différentes techniques ne sont pas semblables ni corrélées entre elles. Leurs corrélations avec la digestibilité de matière sèche varient également (Figure 23) (Giger, 1985; Fukushima et al., 2015).





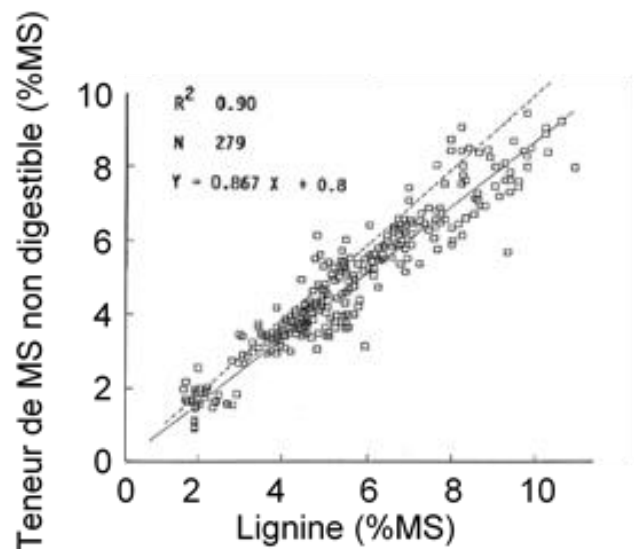
**Figure 23 : Relation entre la digestibilité *in vitro* (IVDMD) et différente estimation de la teneur en lignine** (A) ADL quantifié par la méthode de Van Soest and Wine (1967), (B) LK quantifié par la méthode Klason (Dence, 1992), (C) AcBr quantifié la méthode par bromure d'acétyl (Fukushima and Hatfield, 2004, 2001). Losange blanc = 73 échantillons de plante fourrage dont 5 génotype de maïs, rond noir = 22 échantillons de légumineuses,  $R^2$  = coefficient de détermination, RMSE = erreur quadratique moyenne (Adapté de Fukushima et al., 2015).

En fonction de la méthode employée, les lignines représentent au total environ 5 à 20% des parois ou 2 à 15% de la matière sèche (Figure 23). De plus, la teneur en lignine sera dépendante du stade de maturité de la plante (Andrieu et al., 1993; Masoero et al., 2006), de l'environnement (El Hage et al., 2021, 2018), de l'origine tissulaire (Jung and Casler, 2006a, 2006b; Masoero et al., 2006; Perrier et al., 2017; El Hage et al., 2018) et du génotype (Méchin et al., 1998, 2001; El Hage et al., 2021).

Il est néanmoins reconnu que la teneur en lignine est le premier facteur corrélé négativement avec la digestibilité des parois (Dardenne et al., 1993; Argillier et al., 1995; Méchin, 2000; Méchin et al., 2005; El Hage et al., 2018) et la digestibilité de la MO ou de la MS (Dardenne et al., 1993; Argillier et al., 1995; Méchin et al., 1998; Méchin, 2000). La lignine n'est pas métabolisée par les ruminants (Giger, 1985; Van Soest, 1993; Traxler et al., 1998). Van Soest (1993) reprend et recalcule les données sur fourrage de Giger (1985) en calculant la teneur non digestible dans la matière sèche et complète son discours en montrant une corrélation positive et un coefficient de détermination très élevé ( $R^2=0.90$ ) entre la teneur non digestible de la MS et la teneur en lignines (Figure 24) (Giger, 1985; Van Soest, 1993).



**Figure 24 : Relation entre la teneur non digestible de la matière sèche et la teneur en lignine.** Trait en pointillés :  $y=x$  (Adapté de Van Soest, 1993).



Néanmoins, il n'est pas envisageable de réduire drastiquement la teneur en lignine car une certaine teneur en lignine est essentielle dans le maintien et la protection de la plante (J. P. Wang et al., 2019). Chez le maïs, l'impact de la réduction de la teneur en lignine a été largement étudiée via les mutants brown-midrib *bm* (Cherney et al., 1991; Méchin et al., 1998; Halpin et al., 1998; Barrière et al., 2004a, 2004b; Méchin et al., 2005; Ali et al., 2010). De façon générale, les lignées mutantes *bm* sont associées à une réduction de la teneur en lignine, du rendement en grain et en tige mais présentent une amélioration de la digestibilité (Cherney et al., 1991; Machinet et al., 2011; Halpin, 2019). Néanmoins la corrélation entre la teneur en lignine et la digestibilité n'est pas toujours évidente. Outre le fait que la technique utilisée pour quantifier la teneur en lignine peut fortement influencer la corrélation avec la digestibilité (Fukushima et al., 2015; Grabber et al., 2004), les interactions moléculaires entre les différents composés pariétaux peuvent également fortement impacter la digestibilité (Grabber et al., 1998b, 1998a, 2004).

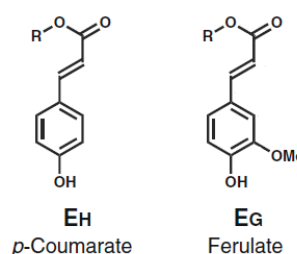
Les interactions entre les différents polymères pariétaux peuvent être directes via des liaisons covalentes ou non covalentes (Simmons et al., 2016; Terrett and Dupree, 2019) ou indirectes via des monomères ou dimères d'acides *p*-hydroxycinnamiques (Grabber et al., 1998b, 1998a, 2004; Machinet et al., 2011).

Dans le sous chapitre suivant « D. Acides hydroxycinnamique » nous allons voir quels sont les principaux acides *p*-hydroxycinnamiques chez le maïs.

## D. Acides hydroxycinnamiques et relation avec la digestibilité

Les acides *p*-hydroxycinnamiques sont issus de la voie de biosynthèse des monolignols (Figure 22). Les acides *p*-hydroxycinnamiques principalement présents chez le maïs sont l'acide *para*-coumarique (*p*-Coumarate (PCA)) et l'acide férulique (Ferulate (FA)) (Figure 25) (Ralph, 2010). Ils sont des constituants pariétaux particulier : l'acide férulique est impliqué dans les liaisons entre les lignines et/ou les hémicelluloses. Cela complexifie la structure de la paroi, resserre le maillage matriciel de la paroi limitant ainsi sa digestibilité (Ralph et al., 1994b, 1994a; Grabber et al., 1998a, 1998b; Jung et al., 1999; Jung, 2003). Le rôle de l'acide *p*-coumarique est peu connu. La teneur en acide *p*-coumarique augmente fortement dans les stades jeunes et suit la même dynamique au cours du développement que la teneur en lignine (Zhang et al., 2019). De plus, les teneurs en PCA et en FA dans la paroi cellulaire sont souvent rapportées comme corrélées négativement avec la digestibilité des parois (Hartley, 1972; Jung et al., 1999; Méchin et al., 2005; Zhang et al., 2019).

**Figure 25 : Principaux acides hydroxycinnamiques** (Adapté de Ralph, 2010).



Dans le sous paragraphe suivant « E. Liaisons intermoléculaires dans la paroi » nous allons décrire les différentes interactions intermoléculaires rencontrées dans la paroi cellulaire.

## E. Liaisons intermoléculaires dans la paroi

La variation de la composition pariétale permet de comprendre en partie les variations de digestibilité. Les multiples liaisons intermoléculaires remplissent un rôle majeur dans l'accessibilité de la paroi cellulaire aux enzymes.

Des liaisons intermoléculaires peuvent intervenir entre la cellulose et les hémicelluloses via des liaisons hydrogènes non covalentes (Santiago et al., 2013; Kang et al., 2019) ou covalentes (montré chez *Arabidopsis thaliana* (Simmons et al., 2016)). Les liaisons intermoléculaires sont aussi présentes entre les hémicelluloses et la lignine via des liaisons ester et éther directes entre ces deux composés ou via l'intermédiaire de l'acide férulique

monomérique ou dimérique lié par liaison ester aux hémicelluloses et par liaison éther à la lignine (Ralph et al., 1994b; Santiago et al., 2013; Kang et al., 2019).

La composition des parois de maïs est largement variable tant au cours du développement de la plante qu'entre les différents génotypes. Les relations entre la composition pariétale et digestibilité pariétale sont complexes puisqu'elles intègrent de multiples facteurs. Nous avons pu voir que la teneur en paroi est négativement corrélée à la digestibilité de MS et que la digestibilité de paroi est corrélée négativement à la teneur en cellulose et en lignine dans les parois. Cela résulte directement de la composition générale de la plante sans prendre en compte la répartition des tissus dans la plante.

Il a été montré que des tissus d'origines histologiques différentes présentent des compositions et des digestibilités pariétales variables et un lien entre la variation de la digestibilités et la répartition histologique des tissus a été proposé (Akin, 1989; Méchin et al., 2005; El Hage, 2018).

Dans le paragraphe suivant nous allons détailler l'histologie de la coupe transversale de la tige de maïs ainsi que les différents outils proposés pour quantifier les tissus histologiques et caractériser au mieux la coupe transversale de tige de maïs afin d'expliquer une part de la digestibilité.

## IX. Histologie de la tige maïs

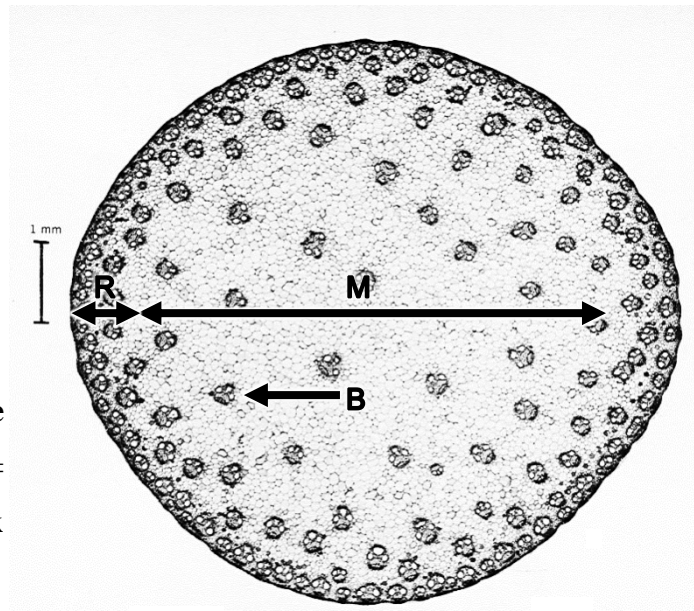
L'histologie est un axe de la biologie qui étudie la structure des tissus. L'imagerie et la microscopie ont largement été utilisées et développées pour décrire de façon toujours plus précise les tissus et leur organisation au sein d'un organe végétal ou animal.

Dans ce chapitre je m'intéresse particulièrement à l'histologie de la tige de maïs et à l'organisation de ses tissus en coupe transversale d'entrenœud qui est le principal objet d'étude de ma thèse. La tige représente 40 % de la MS, le reste étant 20 % de feuilles et 40 % d'épi (Masoero et al., 2006; Arrigo and Stoll, 2012; Servais, 2019), c'est donc la principale source de parois et donc l'organe principal limitant la digestibilité.

Je commencerai par présenter l'anatomie de la coupe transversale d'un entrenœud de maïs à partir d'observation en microscopie à fond clair puis j'enchaînerai par la présentation succincte de différentes techniques de coloration et de quantification à plus ou moins haut débit pour finir en développant la présentation de la coloration FASGA, la quantification haut débit des images associées et le lien entre les caractères histologiques et la digestibilité de la paroi.

## A. Anatomie de la coupe transversale de la tige de maïs

La coupe transversale de tige de maïs au niveau des entrenœuds est caractérisée par 3 régions principales : la moelle, l'écorce et les faisceaux (Figure 26) (Esau, 1953; Jung and Casler, 2006b). Ces 3 régions sont présentes dans chaque entrenœud le long de la tige de maïs dans des proportions différentes (Murdy, 1960; Morrison et al., 1998; El Hage, 2018) et évoluent en fonction du stade de maturité (Wilson, 1993; Morrison et al., 1998).

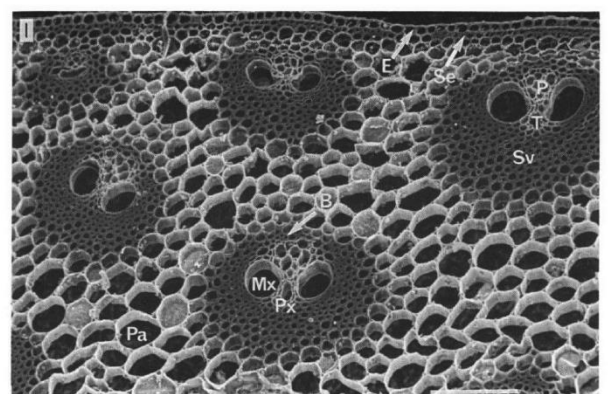


**Figure 26 : Anatomie générale d'une coupe transversale de tige de maïs.** R = écorce, M = moelle, B = faisceaux (Adapté de Esau, 1953).

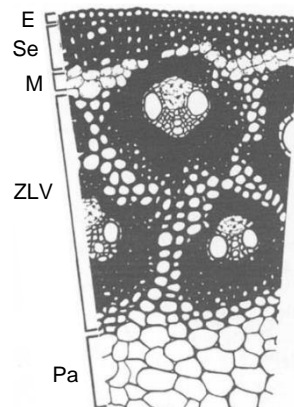
### 1. Ecorce

L'écorce est la région périphérique de la tige (Figure 26). Elle est composée de l'extérieur vers l'intérieur d'une couche cellulaire épidermique, puis de cellules sclérenchymateuses sous épidermiques et enfin de parenchyme (Figure 27) (Esau, 1953; Willemse and Den Outer, 1988; Wilson et al., 1993; Jung and Casler, 2006b). De plus, l'écorce est parsemée de faisceaux (Figure 26, 27).

**Figure 27 : Focus sur l'écorce d'une coupe transversale de tige de maïs prise en microscopie électronique à balayage.** E = épiderme, Se = Sclérenchyme sous épidermique, Sv = Sclérenchyme des faisceaux, P= metaphloème, Px= protoxylème, Mx= metaxylem des faisceaux, T= lacune de protoxylème, B= Faisceaux, Pa=parenchyme corticale (Willemse and Den Outer, 1988).



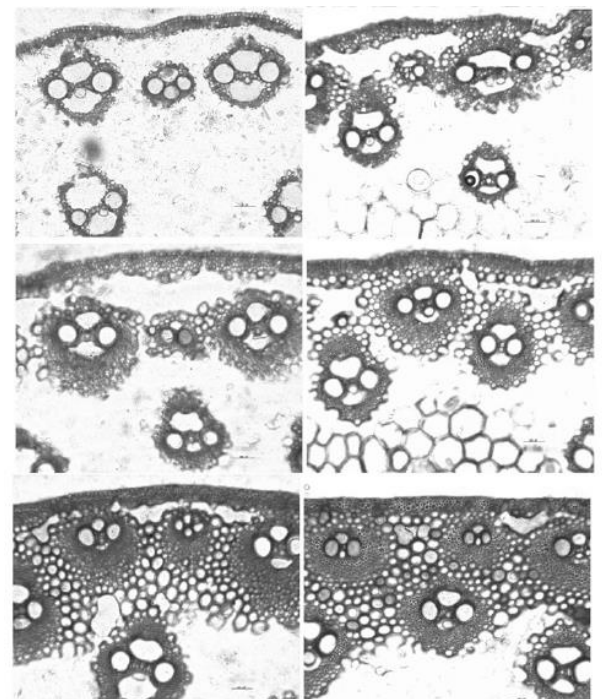
Lorsque l'on regarde l'organisation tissulaire du sorgho, très similaire à celle du maïs, il est défini un tissu supplémentaire le mésophylle localisé entre le sclérenchyme sous épidermique et la zone vasculaire lignifiée (Figure 28) (Wilson, 1993).



**Figure 28 : Focus sur l'écorce d'une coupe transversale de tige de sorgho.** E = épiderme, Se = Sclérenchyme sous épidermique, M = mésophylle, ZLV = Zone lignifié vasculaire , Pa=parenchyme corticale (Willemse and Den Outer, 1988).

Le mésophylle est un tissu composé de cellules non lignifiées, facilement et rapidement digestible (Akin, 1989; Wilson, 1993). Pour pouvoir observer ce tissu chez le maïs qui possède des parois d'épaisseur plus homogène que celle du sorgho (Figure 27) il faut appliquer une solution de digestion sur coupe. Les travaux de Jung et al., 2006 et Boon et al., 2008 chez le maïs permettent d'observer un tissu situé entre le sclérenchyme sous épidermique et la zone vasculaire lignifiée qui se digère facilement (Figure 29 & 30). De plus il est observé une variabilité de digestibilité et de répartition des différents tissus corticaux le long de la tige au même stade de maturité (Boon et al., 2008) mais aussi au cours du développement pour le même entre-nœud (Boon et al., 2012).

**Figure 29 : Focus sur l'écorce d'une coupe transversale de tige de maïs digérée pendant 24h avec un jus de rumen.** Coupe des variétés de maïs Viltaro (gauche) et Volens (droite) des entre nœud 14 (haut), 12, (milieu) et 10 (bas) (Adapté de Boon et al., 2008).

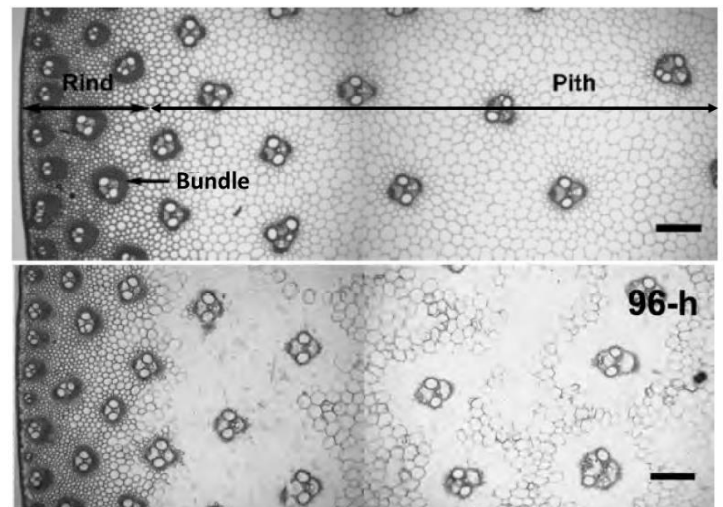




### 2. Moelle

La moelle est la région centrale de la tige de maïs. Elle est constituée de parenchyme et parsemée de faisceaux (Figure 26) (Esau, 1953; Willemse and Den Outer, 1988). La moelle a une densité volumique inférieure à celle de l'écorce et de ce fait elle représente environ 20 à 30 % de la MS en masse (Wilson et al., 1993), alors que la surface de coupe occupée par la moelle est très supérieure à celle de l'écorce et représente ainsi entre 75 à 90 % de la surface de la coupe contre 25 à 10 % pour l'écorce (Willemse and Den Outer, 1988; Legland et al., 2017). De plus la moelle est plus digestible que l'écorce (Akin, 1989; Wilson et al., 1993). Néanmoins comme dans l'écorce, les digestibilités des tissus de la moelle ne sont pas homogènes chez le maïs. La moelle est composée deux types de parenchymes, un digestible (peu lignifié souvent en position sous épidermique ainsi qu'autour des faisceaux) et un non digestible (lignifié) (Figure 30) (Jung and Casler, 2006a).

**Figure 30 : Coupe transversale d'entrenœud de maïs digérée pendant 96h avec du jus de rumen.** Rind = écorce, Pith = moelle, Bundle = faisceaux, ParD = parenchyme digestible, ParND = parenchyme peu digestible Barre d'échelle = 500 µm (Adapté de Jung and Casler, 2006a, 2006b).



### 3. Les faisceaux vasculaires

Les faisceaux constituent le système vasculaire de la plante de maïs. Ils sont principalement localisés dans l'écorce avec une densité de faisceaux supérieure à celle de la moelle (Du et al., 2016; Z. Zhang et al., 2020).

Les faisceaux vasculaires regroupent les tissus qui permettent les échanges entre les différents organes de la plante (Figure 31) (Esau, 1953). Un faisceau vasculaire de maïs est composé par :

- Le xylème qui est le tissu qui permet l'acheminement de l'eau et des minéraux, il est composé par une lacune de protoxylème, de deux faisceaux de métaxylème reliés par des fibres (Esau, 1953). Le xylème est un tissu lignifié et peu digestible (Figure 29 & 31) (Jung and Casler, 2006a; Boon et al., 2008; Devaux et al., 2018).

- Le phloème est le tissu conducteur de la sève, il est composé par un metaphloème et souvent associé à un protophloème comprimé, ces tissus regroupent de multiples fibres cellulaires (Esau, 1953). Le phloème est un tissu peu lignifié et digestible (Figure 29 & 31) (Jung and Casler, 2006a; Boon et al., 2008; Devaux et al., 2018).
- Le sclérenchyme est un tissu de maintien très lignifié et non digestible, souvent retrouvé en amas cellulaires aux extrémités supérieures et inférieures du faisceau ainsi que sous forme d'une gaine entourant le faisceau (Figure 29 & 31) (Esau, 1953; Jung and Casler, 2006a; Boon et al., 2008; Devaux et al., 2018).

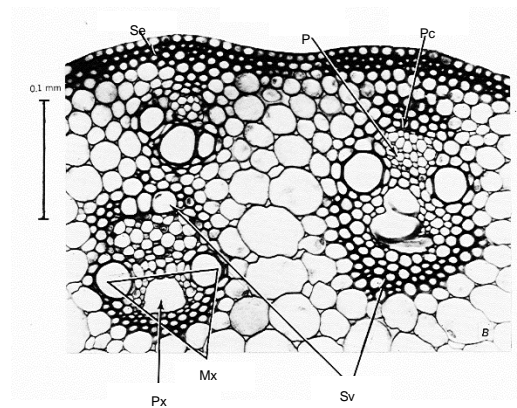


Figure 31 : Focus sur les faisceaux de l'écorce d'une coupe transversale de tige de maïs. Se = Sclérenchyme sous épidermique, Sv = Sclérenchyme des faisceaux, P= metaphloème, Pc= protophloème comprimé, Px= lacune de protoxylème, Mx= métaxylème des faisceaux (Esau, 1953).

## B. Colorations et Quantifications des images

### 1. Diversité des types de caractérisation histologique

L'histologie de la tige de maïs a largement évolué au cours du dernier demi-siècle en profitant du développement de la microscopie et de l'informatique. De nombreuses stratégies de coloration et d'excitation des tissus par rayonnement ont été développées afin de différencier et d'observer des caractéristiques différentes en fonction des tissus.

Nous distinguerons deux types de stratégies pour caractériser les tissus : celles dites à fond clair de celles dites à fond sombre.

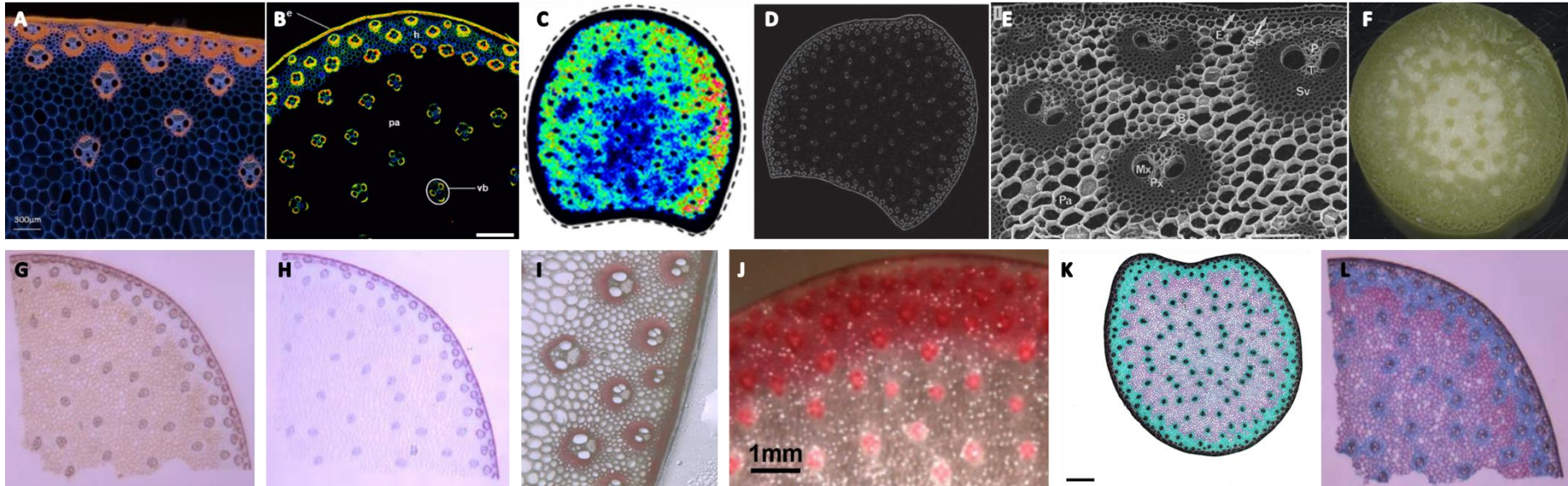
Les stratégies à fond sombre font appel aux caractéristiques de réfraction de la lumière par l'objet, la lumière n'atteint pas directement l'objectif. Elles sont très utilisées pour visualiser des échantillons transparents qui sont difficilement observables. Nous trouverons aussi l'utilisation de filtres de fluorescence (Figure 32 A) (Corcel, 2017; Corcel et al., 2017),

de fluorescence sur la tige colorée à la safranine (Figure 32 B) (Baldacci-Cresp et al., 2020), de l'imagerie par spectrométrie de masse (Figure 32 C) (Arnaud et al., 2020), de la tomodensitométrie à rayons X (Figure 32 D) (Du et al., 2016; Zhang et al., 2018; X. Wang et al., 2019; Y. Zhang et al., 2020), de l'imagerie avec un scanner de documents sur coupe d'entrenœud frais (Figure 32 F) (Heckwolf et al., 2015) et de la microscopie électronique à balayage (Figure 32 E) (Wilson, 1993).

Les stratégies à fond clair font appel aux caractéristiques d'absorption de la lumière par l'objet, la lumière est recueillie directement depuis la source en étant transmise par l'échantillon. Ces stratégies sont généralement moins contrastées que les stratégies en fond sombre et font très souvent appel à des techniques de colorations, telle que la coloration de Maïle (Figure 32 G) (Meshitsuka and Nakano, 1977; Méchin, 2000; Méchin et al., 2005), la coloration au phloroglucinol (Figure 32 H I J) (Vallet et al., 1996; Méchin, 2000; Sindhu et al., 2007; Penning et al., 2019), ou la coloration au FASGA (Fucsina, Alcian bleu, Safranina, Glicerina et Aqua) (Figure 32 K L) (Méchin, 2000; Méchin et al., 2005; Zhang et al., 2013; Legland et al., 2017; El Hage et al., 2018, 2021).

Parmi l'ensemble des stratégies de caractérisation développées, la coloration au FASGA est celle qui offre de façon contrastée le plus de variabilité histologique au sein de l'ensemble de la coupe d'entrenœud de maïs (Méchin et al., 2005).



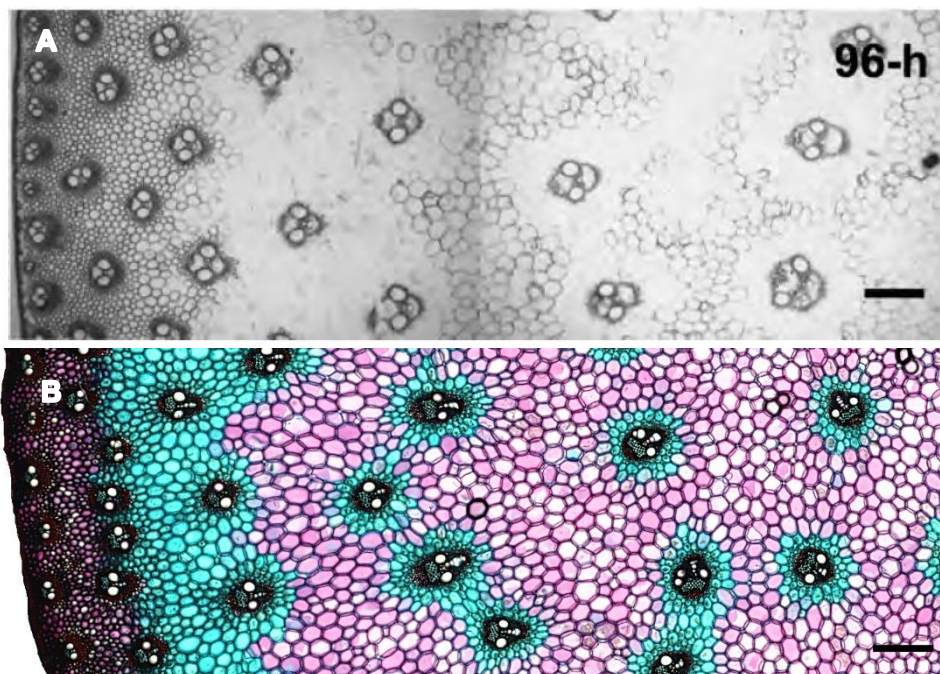


**Figure 32 : Présentation des profils histologiques dans la diversité de caractérisation.** (ABCDEF) Stratégies de caractérisation en fond sombre et (GHIJKL) stratégies de caractérisation en fond clair : (A) filtres de fluorescences (Corcel, 2017), (B) fluorescences sur la tige colorée de safranine (Baldacci-Cresp et al., 2020), (C) de l'imagerie par spectrométrie de masse (Arnaud et al., 2020), (D) la tomographie à rayons X (Du et al., 2016), (E) de la microscopie électronique à balayage (Wilson, 1993), (F) l'imagerie avec un scanner de documents sur coupe d'entre-nœud frais (Heckwolf et al., 2015), (G) la coloration de Maüle (Méchin, 2000), (H) coloration au phloroglucinol, (H) (Méchin, 2000), (I) (Sindhu et al., 2007), (J) (Penning et al., 2019), (KL) coloration au FASGA : (K) (El Hage et al., 2018) et (L) (Méchin, 2000).

### La coloration FASGA

La coloration FASGA a été développée par Tolivia et Tolivia (1987). C'est la coloration qui fut retenue par Méchin et al., (2005) comme étant la plus contrastante entre les différents types cellulaires et celle qui permettra une discrimination facile et automatique des tissus sur une image de coupe transversale d'entrenœuds de maïs. C'est donc la coloration que j'utiliserai pour caractériser mes coupes transversales d'entrenœuds de maïs.

La coloration FASGA permet l'identification des tissus lignifiés ou peu lignifiés et aide à l'identification et à la segmentation des tissus en histologie. En effet, la coloration FASGA repose sur l'utilisation de deux colorants, la Safranine O un colorant basique (cationique) qui permet de colorer les tissus lignifiés en rose en interagissant avec les groupements hydroxy-phénoliques de la lignine. Alors que le bleu Alcian, deuxième colorant de la solution FASGA, est un colorant acide (anionique) qui va permettre de colorer les tissus pas ou peu lignifiés en bleu (Figure 33) (Tolivia and Tolivia, 1987; Méchin, 2000; Méchin et al., 2005; Legland et al., 2017).



**Figure 33 : Comparaison de la répartition des tissus digestibles et de la répartition des tissus colorés à la solution FASGA sur une coupe transversale de tiges de maïs (A) Répartition des tissus digestibles au sein d'une coupe transversale d'entrenœud de maïs digérée pendant 96h avec du jus de rumen (adapté de Jung and Casler, 2006a) Barre = 500  $\mu$ m. (B) Répartition des tissus colorés par la solution FASGA d'une coupe transversale d'entrenœud de maïs. Barre = 500  $\mu$ m.**

De plus la répartition des tissus colorés avec la solution FASGA est cohérente avec les observations faites en digestibilité sur coupe. Les tissus colorés en bleu semblent plus digestibles, moins récalcitrants à la dégradation que les tissus qui pourraient être colorés par la Safranine O (Figure 33).

Malgré le fait que la coloration améliore les contrastes, l'identification des tissus et leur segmentation reste un challenge. La coloration peut donner un sens biologique aux tissus mais la quantification des caractères histologiques est complexe car elle intègre une spatialisation des tissus. L'expertise manuelle est chronophage et quasiment impossible lorsque le nombre d'échantillons est élevé. Néanmoins depuis une dizaine d'années, avec l'essor de l'informatique et l'amélioration des outils d'analyses d'images sont apparus des outils permettant de segmenter automatiquement des tissus histologiques et d'en extraire leurs caractéristiques (surface, forme, nombre, ect...).

Dans le sous chapitre suivant nous nous intéresserons aux techniques histologiques qui ont développé des outils de quantifications automatiques ainsi qu'aux caractères quantifiés. Nous détaillerons plus particulièrement l'outil développé par Legland et al., (2017) sur des images de coupes transversales colorées par la solution FASGA.

## 2. Caractérisation et automatisation

La caractérisation précise et l'automatisation informatique de la quantification des tissus histologiques de coupe de maïs est aujourd'hui le principal verrou technologique pour mettre en lien les caractères histologiques avec des caractéristiques biochimiques et/ou structurales (verse) et d'analyser leurs déterminismes génétiques.

De multiples stratégies d'automatisation d'analyses d'images sont mises en place pour caractériser une coupe de maïs. Il ressort de la littérature trois principales méthodes d'acquisitions d'images permettant de quantifier des tissus histologiques d'une coupe transversale de maïs. La méthode de tomographie à rayons X (Du et al., 2016), la méthode d'imagerie avec un scanner de documents sur coupes d'entreœud frais (Heckwolf et al., 2015) et l'acquisition d'images par microscopie sur coupes colorées à la solution FASGA (Tolivia and Tolivia, 1987; Zhang et al., 2013; Legland et al., 2017). Des workflows d'analyses d'images ont été créés afin d'extraire des caractères histologiques mesurés à partir des images acquises par les différentes méthodes. Les caractères histologiques extraits diffèrent en fonction de la méthode.

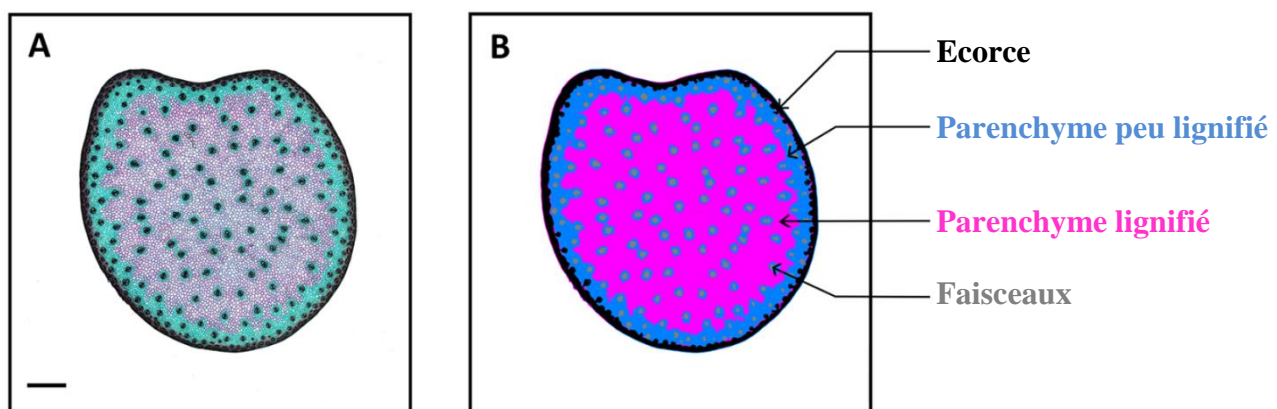
Les images acquises en tomographie à rayons X permettent de compter avec précision l'ensemble des faisceaux de la coupe transversale et d'estimer des caractéristiques



morphologiques de la coupe et des faisceaux (Du et al., 2016; Y. Zhang et al., 2020). Il en découle un nombre important de caractères géométriques et de densité des faisceaux calculés à partir des données extraites (Y. Zhang et al., 2020).

Les images acquises au scanner de documents peuvent contenir plusieurs coupes transversales de tige de maïs permettant ainsi d'extraire les caractères histologiques de plusieurs génotypes/plantes en même temps en facilitant la prise d'images et en augmentant le débit d'analyse (Heckwolf et al., 2015). Néanmoins, ce workflow est moins précis que celui de la tomodensitométrie, il permet de compter seulement les faisceaux de la moelle et de caractériser des phénotypes morphologiques de la coupe (Heckwolf et al., 2015). La densité des faisceaux sera aussi calculée dans la moelle.

A partir d'images acquises au microscope de coupes colorées à la coloration FASGA de nombreux caractères histologiques ont été extraits à partir d'analyses d'images partiellement automatiques impliquant des étapes manuelles de segmentation chez le maïs (Méchin et al., 2005) ou chez le sorgho (Perrier et al., 2017). De plus, sur coupes transversales d'entrenoeuds de maïs colorées à la solution FASGA, deux stratégies de quantifications automatisées ont été proposées avec une distribution spatiale du ratio d'intensité de coloration rouge sur bleu de l'écorce vers le centre de la moelle (Zhang et al., 2013) ou avec une segmentation des tissus colorés (Legland et al., 2017). Ce dernier workflow requiert une paramétrisation par lot d'images permettant ainsi la quantification de 4 types tissulaires : l'écorce, les faisceaux, le parenchyme lignifié et le parenchyme peu lignifié (Figure 34). Pour chaque aire quantifiée, l'intensité moyenne du pixel dans les 3 canaux R, G, et B est obtenue et permettra la mise en place de nouvelles variables calculées (El Hage et al., 2018).



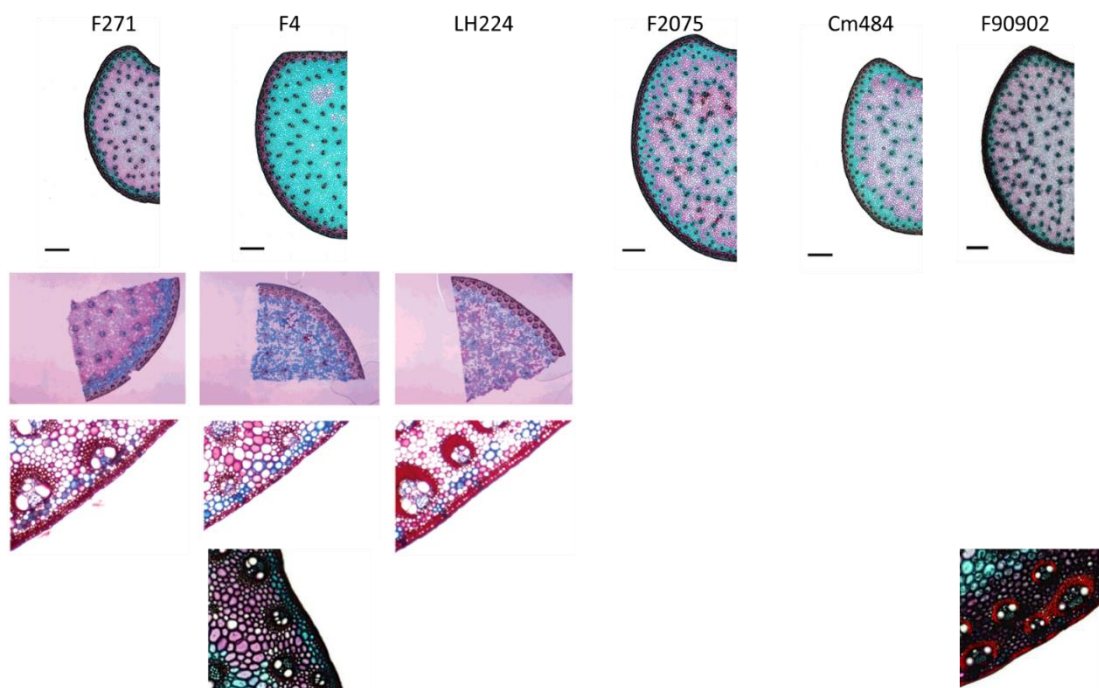
**Figure 34 : Segmentation automatique d'images de coupes transversales d'entrenœud de maïs colorées à la solution FASGA** (A) Coupe transversale d'entrenœud de maïs d'une lignée colorée à la solution FASGA. (B) Segmentation automatique des tissus de l'image de la coupe présentée en A. Barre d'échelle = 2 mm. (Adapté de El Hage et al., 2018).

L'étude de la répartition de la lignification des tissus au sein de la tige, sa caractérisation et sa quantification cherchent à être toujours plus précises du fait de l'existence chez le maïs d'une large variabilité des profils histologiques. Cette variabilité peut expliquer une part non négligeable de la variation des caractères biochimiques d'intérêt. Dans le sous paragraphe suivant « Distribution des tissus lignifiés », nous allons détailler la variabilité des profils histologiques chez le maïs mais aussi les différences biochimiques qui ont pu être mises en évidence dans différents types de tissus de la tige.

## C. Distribution des tissus lignifiés

### 1. Diversité des profils histologiques

Il est observé chez des lignées de maïs des profils histologiques variables dont la seule coloration de la moelle permet de mettre en avant deux profils très contrastés (Méchin et al., 2005; El Hage et al., 2018). La coloration de la moelle peut être totalement bleue (comme pour la lignée F4) ou posséder différentes teintes de rose plus ou moins parsemées de bleu autour des faisceaux ou en périphérie de la moelle (Méchin et al., 2005; Legland et al., 2017; El Hage et al., 2018) (Figure 35). Des différences tissulaires plus subtiles sont aussi observées comme l'épaisseur de tissus sclérenchymateux sous épidermiques ou la surface des sclérenchymes des faisceaux (Figure 35) (Méchin et al., 2005).



**Figure 35 : Diversité de profils histologiques de coupes de lignées de maïs colorées au FASGA (Adapté de Méchin et al., 2005; El Hage et al., 2018; El Hage, 2018).**

La méthode de segmentation proposée par Legland et al., (2017) permet de mettre en évidence des effets génotypiques très importants mais aussi des effets de l'environnement (comme un déficit hydrique) et l'effet de l'interaction entre le génotype et l'environnement sur les caractères histologiques extraits par le workflow de segmentation (Legland et al., 2017; El Hage et al., 2018). La coloration FASGA met en évidence des caractéristiques de profils histologiques variables inter-génotypes qui peuvent être quantifiées sur un nombre important de coupes transversales de maïs. De plus, le profil des images de coupes colorées au FASGA présente de fortes similitudes avec le profil des images de coupes transversales de maïs après digestion enzymatique (Figure 33). Les différences de colorations peuvent mettre en évidence des différences de composition biochimique des parois. Dans le sous-paragraphe suivant « Liens entre biochimie et histologie » nous allons voir quelles sont les différences biochimiques mises en évidence entre différents tissus histologiques physiquement séparés mais aussi quelles relations ont été montrées entre les caractères biochimiques et histologiques.

## 2. Liens entre biochimie et histologie

### i. Biochimie sur tissus physiquement séparés

Il a été analysé biochimiquement à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle des tissus séparés manuellement. La séparation la plus fine fut réalisée sur sorgho à deux stades (floraison et maturité grain) en séparant l'épiderme, le sclérenchyme sous épidermique, la zone lignifiée vasculaire, les faisceaux de la moelle et le parenchyme de la moelle (Wilson et al., 1993) (Tableau 7). Wilson et al., (1993) ont aussi observé ces tissus sur coupe transversale de tiges. La moelle est le tissu le plus représenté en surface de coupe (environ 80 %) suivi de la zone lignifiée vasculaire (environ 13 %) alors qu'en pourcentage de masse de matière sèche la moelle ne représente plus qu'environ 47 % suivi de la zone lignifiée vasculaire qui, elle, représente environ 33 % de la matière sèche (Wilson et al., 1993) (Tableau 7). Il existe une différence d'échelle entre la surface des tissus d'une coupe transversale de tige et le pourcentage de masse de matière sèche de chaque tissu qui compose la matière sèche de la tige. Cela est d'autant plus vrai à l'échelle de la paroi où la zone vasculaire lignifiée représente, en masse, environ 52 % de la paroi suivie de la moelle qui représente environ 20 % (Wilson et al., 1993) (Tableau 7). De plus, les parois des cellules de la zone vasculaire lignifiée représente, en masse, la plus grande partie de paroi non digestible (environ 47 %) alors que la paroi de la moelle représente environ 25 % (Wilson et al., 1993) (Tableau 7). La moelle est le tissu le plus

digestible de la tige de sorgho et aussi le tissu le plus pauvre en paroi et dont la paroi est la moins riche en lignine (Wilson et al., 1993).

**Tableau 7 : Contribution des fractions cellulaires de 5 entrenœuds de tiges de sorgho au stade floraison (ANTH) et maturité grain (GM) (Wilson et al., 1993).**

Cell fraction	Cross-sectional area		Dry weight		CWC <sup>a</sup>		Indigestible CW <sup>b</sup>	
	ANTH	GM	ANTH	GM	ANTH	GM	ANTH	GM
Waxy layer	ND <sup>c</sup>	ND	0.4 ± 0.26	0.2 ± 0.05	ND	ND	ND	ND
Epidermis	0.6 ± 0.09	0.5 ± 0.06	2.8 ± 0.21	2.4 ± 0.09	4.4	4.8	6.5	6.2
Sclerenchyma	1.3 ± 0.06	1.3 ± 0.03	5.9 ± 1.12	7.3 ± 0.15	8.3	12.0	8.4	11.8
VBZ	12.0 ± 0.85	14.4 ± 1.50	35.6 ± 1.90	31.1 ± 2.85	53.6	51.9	45.5	50.5
IVB	6.2 ± 0.38	4.7 ± 0.32	10.4 ± 0.45	9.9 ± 2.38	11.7	11.4	9.1	8.8
Pith parenchyma	80.0 ± 0.55	79.2 ± 1.43	44.9 ± 1.23	49.2 ± 2.32	22.0	19.8	30.4	22.6

<sup>a</sup> Based on neutral detergent analysis.

<sup>b</sup> After 96 h digestion.

<sup>c</sup> Not determined.

Chez le maïs, les tissus sont le plus souvent segmentés en deux régions : l'écorce et la moelle. La matière sèche de l'écorce est significativement constituée de plus de parois que celle de la moelle (Morrison et al., 1998; Barros-Rios et al., 2012b). De plus, la matière sèche de l'écorce est aussi significativement moins digestible que la matière sèche de la moelle (Akin, 1989; Lopez et al., 1993; Barros-Rios et al., 2012b). La paroi cellulaire de la moelle est constituée de plus d'acide férulique estérifié qu'éthérifié. De plus, la teneur en acide férulique estérifié est plus élevée dans les parois de la moelle que dans celle de l'écorce alors qu'il y a plus d'acide éthérifié dans la paroi de l'écorce que celle de la moelle (Barros-Rios et al., 2012b). Cela pourrait laisser penser que moins d'amorces féruliques ont été recrutées dans la moelle, laissant ainsi plus d'acides féruliques estérifiés « libres ». Au contraire, ces amorces féruliques plus fortement sollicitées dans l'écorce donneraient ainsi plus de pontages féruliques (d'où l'augmentation de la teneur en acide férulique éthérifié) entre hémicelluloses et lignines. La paroi cellulaire de l'écorce semble également contenir plus de lignine et d'acide *para*-coumarique que la paroi cellulaire de la moelle (Lopez et al., 1993; Morrison et al., 1998; Barros-Rios et al., 2012b).

La séparation manuelle des tissus de l'entrenœud a permis de mettre en évidence des différences biochimiques entre ces tissus. Maintenant, est-il possible d'expliquer les variations biochimiques observées à l'échelle de la plante entière avec des variations de profils histologiques observées à l'échelle de la coupe transversale de tige de maïs ?



- ii. Corrélations et modèles histologiques expliquant la digestibilité de la paroi cellulaire de maïs

La première relation entre la digestibilité de la plante et des caractères histologiques de coupes transversales de tiges de maïs fut établie par Méchin et al., (2005). A partir de 13 lignées, Méchin et al., (2005) ont montré qu'il était possible d'expliquer 89% des variations de digestibilité de la paroi à partir de 2 paramètres biochimiques (teneur en acide *p*-coumarique estérifié et rapport S/G lié à la composition monomérique des lignines) et 2 paramètres histologiques (Aire de rose (lignifié) sur la coupe colorée au FASGA et le nombre de couches cellulaires dans le sclérenchyme sous épidermique) (Méchin et al., 2005).

Un peu plus tard, El Hage et al., (2018) ont mis en lumière, à partir de 11 lignées de maïs cultivées en conditions de stress hydrique et de bonne irrigation, le rôle important de la répartition de la lignification et de la *p*-coumaroylation entre l'écorce et la moelle dans la réponse au déficit hydrique. En condition irriguée, la digestibilité de la paroi cellulaire serait significativement corrélée positivement (0.62) à la quantité histologique du bleu dans le parenchyme peu lignifié, négativement avec la quantité histologique de rouge dans le parenchyme lignifié et l'intensité de rouge dans l'écorce (-0.66 et 0.59, respectivement) (El Hage et al., 2018). De plus ces caractères histologiques sont corrélés avec des caractères biochimiques. La quantité histologique de bleu dans le parenchyme peu lignifié est significativement et négativement corrélée à la teneur en lignine et en acide férulique (-0,60 et -0,64, respectivement) alors que la quantité histologique de rouge dans le parenchyme lignifié est significativement et positivement corrélée à la teneur en lignine, à celle en acide *p*-coumarique et en acide férulique étherifié (0,70, 0,57 et 0,68, respectivement) et la quantité histologique de rouge dans l'écorce est significativement et positivement corrélée à la teneur en acide férulique étherifié (0.61) (El Hage et al., 2018). En condition non irriguée, les corrélations avec la digestibilité de la paroi cellulaire observées avec les caractères histologiques sont conservées mais avec des coefficients de corrélation inférieurs à ceux observés en condition irriguée. De plus, seul le caractère de quantité histologique de rouge dans l'écorce conserve une corrélation significative avec des caractères biochimiques comme la teneur en lignine et la teneur en acide *p*-coumarique (0,74 et 0,67, respectivement) (El Hage et al., 2018). Ce travail a ainsi donné lieu à poser l'hypothèse selon laquelle en cas de stress hydrique une plante pourrait lignifier et *p*-coumaroyler proportionnellement plus son écorce que sa moelle.

L'effet du génotype est souvent très hautement significatif pour les caractères histologiques et toujours supérieur à l'effet de la condition irriguée ou non irriguée,

l'interaction entre le génotype et la condition environnementale reste non significative ou faiblement significative (Legland et al., 2017; El Hage et al., 2018).

L'histologie est une discipline qui apportera beaucoup à la compréhension de l'organisation des tissus et à leur implication dans la digestibilité du maïs. Les profils histologiques et les caractères identifiés semblent être héréditaires. La diversité des profils histologiques et la distribution de la lignification pourraient être contrôlées au niveau moléculaire et/ou génétique.

Au sein de ma thèse l'enjeu principal est de révéler de nouvelles cibles permettant d'améliorer la digestibilité du maïs ensilage sans diminuer drastiquement la teneur en lignine. Mon projet de thèse s'intéresse également aux déterminismes génétiques qui sous-tendent la variabilité des profils histologiques et des caractères biochimiques en lien avec la digestibilité. Nous allons donc dans le sous paragraphe suivant « X. Héritabilité et déterminismes génétiques » introduire ces notions.

## X. Héritabilité et déterminismes génétiques

Nous avons pu voir dans les paragraphes précédents qu'il existait chez le maïs une large variabilité génétique de composition de la matière sèche, de composition de la paroi, ainsi que des profils histologiques impliquant une large variabilité de distribution des tissus (Méchin et al., 2005; El Hage et al., 2018; Barrière et al., 2018).

Au niveau biochimique, l'analyse du déterminisme génétique des caractères fut très largement étudiée dans de nombreuses populations via différentes techniques d'analyse de variations génétiques, proposant ainsi de nombreuses listes de gènes candidats pour des caractères pariétaux de lignification et en lien avec la digestibilité (Méchin et al., 2001; Truntzler et al., 2010; Li et al., 2016; Virlovet et al., 2019; López-Malvar et al., 2019). Je ne ferai pas de présentation ou de liste des régions et/ou gènes candidats que présente l'ensemble de la littérature. Cet effort d'analyse en metaQTL fut déjà réalisé sur 14 populations (Truntzler et al., 2010). Les caractères pariétaux, de lignification et de digestibilité sont des caractères multigéniques rendant la comparaison de différentes populations très compliquée. Dans cette dynamique, l'identification de gènes et de mécanismes moléculaires qui sous-tendent la variabilité de ces caractères est quasiment impossible chez le maïs.

Les déterminismes génétiques dans chacune des populations ont montré que les caractères de digestibilité et de composition de la paroi sont multigéniques et que de nombreux

QTL (souvent à effet faible) ont été détectés. La cartographie de ces QTLs a souvent donné lieu à de nombreuses co-localisations qui soulignent le fait que les QTL de teneur en lignine ne co-localisent pas toujours avec ceux de digestibilité et que la recherche de gènes candidats présents sous un QTL n'aboutit pas toujours à l'identification de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la lignine.

Au niveau histologique, l'analyse du déterminisme génétique des caractères qui sous-tendent leur variabilité est plus récente et ceci notamment du fait de la difficulté de caractérisation et quantification des caractères histologiques à haut débit. Néanmoins depuis que les caractères histologiques peuvent être segmentés et quantifiés automatiquement, sont apparues des études sur les déterminismes génétiques de caractères histologiques (Mazaheri et al., 2019; Wang et al., 2020; El Hage et al., 2021).

Ce n'est que très récemment que le lien entre les déterminismes génétiques de la digestibilité et des caractères histologiques sont présentés via une approche de détection de QTLs au sein d'une population de lignées recombinantes dont les parents sont des lignées de maïs F271 et CM484 (El Hage et al., 2021) contrastées pour la digestibilité.

## XI. Hypothèses de travail et objectifs de la thèse

L'objectif principal et général de ma thèse est de trouver de nouvelles cibles biochimiques et/ou histologiques permettant d'améliorer la digestibilité tout en conservant une teneur en lignine nécessaire aux propriétés agronomiques du maïs ensilage et d'en étudier les déterminismes génétiques.

Nous avons vu précédemment que le critère principalement utilisé pour rendre compte de la qualité d'un fourrage est la valeur UFL. Ce critère permet la sélection de maïs ensilage à bonne valeur énergétique. Nous avons pu comprendre l'origine de cette variable, sa construction et son calcul via l'utilisation principalement de la digestibilité *in vivo*. En parallèle la digestibilité *in vivo* et l'UFL ont été étudiées afin d'estimer leurs valeurs par des procédés moins coûteux et chronophages. L'UFL peut être estimée maintenant *in vitro*. Cette dernière, en général, est prédite par la méthode NIRS.

L'outil principal utilisé au cours de la thèse pour rendre compte de la qualité du maïs ensilage et de sa digestibilité est la mesure *in vitro* de la digestibilité de la matière sèche.

Le premier objectif de la thèse a été de mettre en place un protocole biochimique permettant de quantifier la digestibilité *in vitro* de la MS à haut débit sur plantes de maïs avec

épi. Pour cela j'ai utilisé 6 géotypes d'hybrides de maïs cultivés en 2018 et couvrant la gamme de variabilité de digestibilité *in vitro* estimée à partir d'une adaptation du protocole d'Aufrère (1982). Ce travail a été valorisé par une publication acceptée dans le journal « Plants Methods » et fait l'objet de mon premier chapitre de thèse.

Au cours de l'introduction, j'ai utilisé la littérature existante pour montrer comment les variations de la digestibilité de la matière sèche étaient principalement expliquées par les variations de la teneur en paroi cellulaire couplées aux variations de la digestibilité de cette paroi. La paroi cellulaire est principalement constituée de cellulose, hémicelluloses et lignine. Seule la lignine n'est pas métabolisable par la vache. La lignine est le facteur principal limitant la digestibilité. Néanmoins la lignine est essentielle aux propriétés agronomiques de la plante tant dans sa tenue 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 de la lignification au sein d'une coupe transversale d'entre-nœud de maïs semble être une voie intéressante pour l'amélioration de la digestibilité. Nous avons pu constater dans cette introduction que la caractérisation et la quantification automatique de différents tissus au sein d'une coupe n'est pas évidente et reste problématique pour caractériser et rendre compte de la large variabilité des tissus présents au sein d'une coupe d'entre-nœud et de leur variabilité entre différentes coupes. J'ai donc pris l'initiative de proposer une nouvelle méthode de segmentation des tissus histologiques. Le développement de ce nouvel outil fut valorisé au cours de ma thèse par la rédaction d'un article soumis dans la revue « Plant methods ». J'ai réussi à améliorer la finesse et l'automatisation de la caractérisation et de la quantification des tissus au sein d'une coupe transversale de tige de maïs. Ce travail s'intègre dans ma thèse comme étant mon deuxième objectif qui vous sera présenté dans le chapitre 2.

Ayant maintenant à ma disposition des outils performants pour bien caractériser mes échantillons, mon objectif est de regarder quels paramètres biochimiques et/ou histologiques permettent de rendre compte des variations de digestibilité et ainsi proposer les cibles permettant l'amélioration de la digestibilité de la matière sèche et de la paroi.

Dans mon troisième chapitre, nous verrons comment est expliquée la digestibilité au sein d'un panel d'hybrides fournis et cultivés par des entreprises semencières. Cette série d'hybrides a été semée sur 3 ans et dans 8 lieux différents au total. Elle est composée chaque année de 80 hybrides ensilage modernes et précoces dont 7 témoins présents chaque année. Un bloc d'un lieu pour les deux premières années (2018 et 2019) a été caractérisé biochimiquement. L'objet de ce travail sera valorisé ultérieurement dans un article.

Dans mon quatrième chapitre, nous étudierons les variations de la digestibilité au sein d'une population de lignées recombinantes issue du croisement entre deux lignées de maïs dentées F4 et F7 choisies notamment pour le fort contraste de leurs profils histologiques. Les résultats d'une année de culture seulement (2020) seront présentés dans le manuscrit de ma thèse. Des analyses complémentaires effectuées sur le matériel de la deuxième année de récolte (2021) permettront de consolider les conclusions et renforcer les résultats. Ce type de matériel beaucoup plus académique pourrait permettre d'approfondir nos connaissances sur les cibles permettant d'améliorer la digestibilité voire même d'étendre ces conclusions aux hybrides modernes. Dans le second point, cette population nous permettra aussi de répondre à l'objectif qui est d'étudier les déterminismes génétiques des caractères histologiques et biochimiques en lien avec la digestibilité. Ces deux points constituant l'objectif 4 vous seront présentés dans le chapitre 4 et feront l'objet d'une publication une fois la deuxième année de récolte caractérisée.

Dans le chapitre final, je discuterai de l'ensemble des résultats obtenus, notamment de l'apport des développements méthodologiques (biochimiques et histologiques mis en œuvre pendant ma thèse) pour l'identification des cibles biochimiques et histologiques en lien avec la digestibilité du maïs. Je reprendrai les cibles identifiées sur les différents types de matériel (hybrides et lignées) et discuterai de leur intérêt pour la sélection.

## Références Introduction

- AGPM Maiz'Europ', 2018. Les chiffres clés maïs fourrage France/UE/Monde. agreste, 2020. Statistique agricole annuelle 2018-2019 [WWW Document]. URL <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/Chd2002/detail/> (accessed 5.12.20).
- Akin, D.E., 1989. Histological and Physical Factors Affecting Digestibility of Forages. *Agron. J.* 81, 17–25. <https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100010004x>
- Ali, F., Scott, P., Bakht, J., Chen, Y., Lübberstedt, T., 2010. Identification of novel brown midrib genes in maize by tests of allelism. *Plant Breed.* 129, 724–726. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2010.01791.x>
- Andrieu, J., 1995. Prédiction de la digestibilité et de la valeur énergétique du maïs fourrage à l'état frais. *INRA Prod. Anim.* 8, 273–274. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00896123>
- Andrieu, J., Barrière, Y., Demarquilly, C., 1999. Digestibilité et valeur énergétique des ensilages de maïs : le point sur les méthodes de prévision au laboratoire. *INRA Prod. Anim.* 12, 391–396.
- Andrieu, J., Baumont, R., 2000. Digestibilité et ingestibilité du maïs fourrage : Facteurs de variation et prévision. *Fourrages* 239–252.
- Andrieu, J., Demarquilly, C., Dardenne, P., Barrière, Y., Lila, M., Maupetit, P., Rivière, F., Femenias, N., 1993. Composition and nutritive value of whole maize plants fed fresh to sheep. I: Factors of variation. *Compos. Nutr. Value Whole Maize Plants Fed Fresh Sheep Factors Var.* 42, 221–249. <https://doi.org/10.1051/animres:19930301>
- Argillier, O., Barrière, Y., Hébert, Y., 1995. Genetic variation and selection criterion for digestibility traits of forage maize. *Euphytica* 82, 175–184. <https://doi.org/10.1007/BF00027064>
- Arnaud, B., Durand, S., Fanuel, M., Guillon, F., Méchin, V., Rogniaux, H., 2020. Imaging Study by Mass Spectrometry of the Spatial Variation of Cellulose and Hemicellulose Structures in Corn Stalks. *J. Agric. Food Chem.* 68, 4042–4050. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07579>
- Arrigo, Y., Stoll, P., 2012. Estimation de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs. *Rech. Agron. Suisse* 3, 442–449.
- ARVALIS, 2011. Le maïs fourrage est présent partout en France.
- Aufrère, J., 1982. Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Ann. Zootech.* 31, 111–130. <https://doi.org/10.1051/animres:19820202>
- Aufrère, J., Graviou, D., Demarquilly, C., Andrieu, J., Emile, J.C., Giovanni, R., Maupetit, P., 1992. Estimation of organic matter digestibility of whole maize plants by laboratory methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 36, 187–204. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(92\)90056-C](https://doi.org/10.1016/0377-8401(92)90056-C)
- Aufrère, J., Michalet-Doreau, B., 1983. In vivo digestibility and prediction of digestibility of some by-products. *EEC Semin.*
- Bal, M.A., Coors, J.G., Shaver, R.D., 1997. Impact of the Maturity of Corn for Use as Silage in the Diets of Dairy Cows on Intake, Digestion, and Milk Production. *J. Dairy Sci.* 80, 2497–2503. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76202-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76202-7)
- Baldacci-Cresp, F., Spriet, C., Twyffels, L., Blervacq, A.-S., Neutelings, G., Baucher, M., Hawkins, S., 2020. A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. *Plant J.* 102, 1074–1089. <https://doi.org/10.1111/tpj.14675>



- Baldy, A., Jacquemot, M.P., Griveau, Y., Bauland, C., Reymond, M., Mechin, V., 2017. Energy values of registered corn forage hybrids in France over the last 20 years rose in a context of maintained yield increase. *Am. J. Plant Sci.* 08, 1449–1461. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.86099>
- Barrière, Y., Demarquilly, C., Hebert, Y., Dardenne, P., Andrieu, J., Maupetit, P., Lila, M., Émile, J., 1991. Influences de la variabilité génétique et environnementale sur la digestibilité in vitro ou in vivo du maïs fourrage. *Agronomie* 11, 151–167. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885361>
- Barrière, Y., Emile, J.C., 2000. Le maïs fourrage III Evaluation et perspective de progrès génétique sur les caractères de valeur alimentaire. *Fourrages* 221–238.
- Barrière, Y., Emile, J.C., Traineau, R., Surault, F., Briand, M., Gallais, A., 2004a. Genetic variation for organic matter and cell wall digestibility in silage maize. Lessons from a 34-year long experiment with sheep in digestibility crates. *Maydica* 49, 115–126. <https://prodinra.inra.fr/record/75125>
- Barrière, Y., Guillaumie, S., Denoue, D., Pichon, M., Goffner, D., Martinant, J.-P., 2018. Investigating the unusually high cell wall digestibility of the old INRA early flint F4 maize inbred line. *Maydica* 62, 21.
- Barrière, Y., Ralph, J., Méchin, V., Guillaumie, S., Grabber, J.H., Argillier, O., Chabbert, B., Lapiere, C., 2004b. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *C. R. Biol.* 327, 847–860. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2004.05.010>
- Barros-Rios, J., Malvar, R.A., Jung, H.-J.G., Bunzel, M., Santiago, R., 2012a. Divergent selection for ester-linked diferulates in maize pith stalk tissues. Effects on cell wall composition and degradability. *Phytochemistry* 83, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.07.026>
- Barros-Rios, J., Malvar, R.A., Jung, H.-J.G., Santiago, R., 2011a. Cell wall composition as a maize defense mechanism against corn borers. *Phytochemistry* 72, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.004>
- Barros-Rios, J., Malvar, R.A., Jung, H.-J.G., Santiago, R., 2011b. Cell wall composition as a maize defense mechanism against corn borers. *Phytochemistry* 72, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.004>
- Barros-Rios, J., Santiago, R., Malvar, R.A., Jung, H.-J.G., 2012b. Chemical composition and cell wall polysaccharide degradability of pith and rind tissues from mature maize internodes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 172, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.01.005>
- Boon, E.J.M.C., Struik, P.C., Engels, F.M., Cone, J.W., 2012. Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L.) cultivars varying in whole plant digestibility. IV. Changes during the growing season in anatomy and chemical composition in relation to fermentation characteristics of a lower internode. *NJAS Wagening. J. Life Sci.* 59, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2011.05.001>
- Boon, E.J.M.C., Struik, P.C., Tamminga, S., Engels, F.M., Cone, J.W., 2008. Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L.) cultivars varying in whole plant digestibility. III. Intra-stem variability in anatomy, chemical composition and in vitro rumen fermentation. *NJAS Wagening. J. Life Sci.* 56, 101–122. [https://doi.org/10.1016/S1573-5214\(08\)80019-X](https://doi.org/10.1016/S1573-5214(08)80019-X)
- Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.), 2003. *Silage Science and Technology*.
- Carpentier, B., Cabon, G., 2011. Le maïs fourrage : élaboration du rendement et de la qualité, récolte et conservation. *Fourrages* 11–23.



- Carpita, N.C., 1996. Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 445–476.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.445>
- Cherney, J.H., Cherney, D.J.R., Akin, D.E., Axtell, J.D., 1991. Potential of Brown-Midrib, Low-Lignin Mutants for Improving Forage Quality, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 157–198. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60580-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60580-5)
- Clark, K.W., 1958. The adaptation of an artificial rumen technique to the estimation of the gross digestible energy of forages. *Theses Diss.* Available ProQuest 1–110.  
<https://docs.lib.purdue.edu/dissertations/AAI5803143>
- Coninck-Chosson, J. de, 1988. Aerobic degradation of cellulose and adsorption properties of cellulases in cellulomonas Uda JC3: Effects of crystallinity of substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 495–501. <https://doi.org/10.1002/bit.260310515>
- Corcel, M., 2017. Imagerie multispectrale en macrofluorescence en vue de la prédiction de l'origine tissulaire de particules de tiges de maïs (These de doctorat). Nantes, Ecole nationale vétérinaire.
- Corcel, M., Devaux, M.F., Guillon, F., Barron, C., 2017. Identification of tissular origin of particles based on autofluorescence multispectral image analysis at the macroscopic scale, *EPJ Web of Conferences*. EDP Sciences.  
<https://doi.org/10.1051/epjconf/201714005012>
- Credou, J., Berthelot, T., 2014. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *J. Mater. Chem. B* 2, 4767–4788. <https://doi.org/10.1039/C4TB00431K>
- Cummins, D.G., Burns, R.E., 1969. Yield and Quality of Corn Silage as Influenced by Harvest Height. *Agron. J.* 61, 468–470.  
<https://doi.org/10.2134/agronj1969.00021962006100030042x>
- Dardenne, P., Andrieu, J., Barrière, Y., Biston, R., Demarquilly, C., Femenias, N., Lila, M., Maupetit, P., Rivièrè, F., Ronsin, T., 1993. Composition and nutritive value of whole maize plants fed fresh to sheep. II. Prediction of the in vivo organic matter digestibility. *Ann. Zootech.* 42, 251–270. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00888946>
- Deinum, B., Van Soest, P.J., 1969. Prediction of forage digestibility from some laboratory procedures. *NJAS Wagening. J. Life Sci.* 17, 119–127.  
<https://doi.org/10.18174/njas.v17i2.17382>
- Demarquilly, C., 1994. Facteurs de variation de la valeur nutritive du maïs ensilage. *INRA Prod. Anim.* 7, 177–189.
- Demarquilly, C., Chenost, M., Giger, S., 1995. Pertes fécales et digestibilité des aliments et des rations, in: *Nutrition Des Ruminants Domestiques: Ingestion et Digestion*. pp. 601–645.
- Dence, C. W., 1992. The Determination of Lignin, in: Lin, S.Y., Dence, Carlton W. (Eds.), *Methods in Lignin Chemistry*, Springer Series in Wood Science. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 33–61. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_3)
- Devaux, M.-F., Jamme, F., André, W., Bouchet, B., Alvarado, C., Durand, S., Robert, P., Saulnier, L., Bonnin, E., Guillon, F., 2018. Synchrotron Time-Lapse Imaging of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis: Tracking Enzyme Localization by Protein Autofluorescence and Biochemical Modification of Cell Walls by Microfluidic Infrared Microspectroscopy. *Front. Plant Sci.* 0.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00200>
- Doebley, J., 2004. The Genetics of Maize Evolution. *Annu. Rev. Genet.* 38, 37–59.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092425>

- Du, J., Zhang, Y., Guo, X., Ma, L., Shao, M., Pan, X., Zhao, C., Du, J., Zhang, Y., Guo, X., Ma, L., Shao, M., Pan, X., Zhao, C., 2016. Micron-scale phenotyping quantification and three-dimensional microstructure reconstruction of vascular bundles within maize stalks based on micro-CT scanning. *Funct. Plant Biol.* 44, 10–22. <https://doi.org/10.1071/FP16117>
- El Hage, F., 2018. Impact du déficit hydrique sur les relations entre la dégradabilité, la biochimie pariétale et la répartition des tissus lignifiés chez l'entre-nœud de maïs et déterminisme génétique de ces caractères. l'Université Paris-Saclay, INRA Versailles.
- El Hage, F., Legland, D., Borrega, N., Jacquemot, M.-P., Griveau, Y., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2018. Tissue Lignification, Cell Wall p-Coumaroylation and Degradability of Maize Stems Depend on Water Status. *J. Agric. Food Chem.* 66, 4800–4808. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05755>
- El Hage, F., Virilouvet, L., Lopez-Marnet, P.-L., Griveau, Y., Jacquemot, M.-P., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2021. Responses of Maize Internode to Water Deficit Are Different at the Biochemical and Histological Levels. *Front. Plant Sci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.628960>
- Esau, K., 1953. *Plant Anatomy*. Soil Sci. 75, 407.
- FAOSTAT [WWW Document], 2019. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed 7.26.21).
- Fauconneau, G., François, A.C., Leroy, A.M., Zelter, S.Z., 1953. Processus digestifs des ruminants. *Ann. Zootech. INRAEDP Sci.* 2, 275–284.
- Fernandez, I., Nozière, P., Michalet-Doreau, B., 2004. Site and extent of starch digestion of whole-plant maize silages differing in maturity stage and chop length, in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 89, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.02.011>
- Fukushima, R.S., Hatfield, R.D., 2004. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3713–3720. <https://doi.org/10.1021/jf035497l>
- Fukushima, R.S., Hatfield, R.D., 2001. Extraction and Isolation of Lignin for Utilization as a Standard to Determine Lignin Concentration Using the Acetyl Bromide Spectrophotometric Method. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3133–3139. <https://doi.org/10.1021/jf010449r>
- Fukushima, R.S., Kerley, M.S., Ramos, M.H., Porter, J.H., Kallenbach, R.L., 2015. Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in vitro forage degradability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 201, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.12.007>
- Giger, S., 1985. Revue sur les méthodes de dosage de la lignine utilisées en alimentation animale. *Ann. Zootech.* 34, 85–122. <https://doi.org/10.1051/animres:19850107>
- Giordanengo, T., Charpentier, J.P., Boizot, N., Roussel, S., Roger, J.M., Chaix, G., Robin, C., Mourey, N., 2009. Oakscan: procédé de mesure rapide et non destructif des polyphénols du bois de chêne de tonnellerie. *Rev. Fr. Oenologie* 10–15.
- Goffart, A., 1877. *Manuel de la culture et de l'ensilage des maïs et autres fourrages verts*.
- Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Ralph, J., 1998a. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* 77, 193–200. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199806\)77:2<193::AID-JSFA25>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199806)77:2<193::AID-JSFA25>3.0.CO;2-A)
- Grabber, J.H., Ralph, J., Hatfield, R.D., 1998b. Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2609–2614. <https://doi.org/10.1021/jf9800099>

- Grabber, J.H., Ralph, J., Lapierre, C., Barrière, Y., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *C. R. Biol.* 327, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.02.009>
- Gray, F.V., 1947. The Digestion of Cellulose by Sheep the Extent of Cellulose Digestion at Successive Levels of the Alimentary Tract. *J. Exp. Biol.* 24, 15–19. <https://doi.org/10.1242/jeb.24.1-2.15>
- Halpin, C., 2019. Lignin engineering to improve saccharification and digestibility in grasses. *Curr. Opin. Biotechnol., Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.013>
- Halpin, C., Holt, K., Chojecki, J., Oliver, D., Chabbert, B., Monties, B., Edwards, K., Barakate, A., Foxon, G.A., 1998. Brown-midrib maize (bm1) – a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Plant J.* 14, 545–553. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00153.x>
- Hartley, R.D., 1972. p-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility. *J. Sci. Food Agric.* 23, 1347–1354. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740231110>
- Hatfield, R.D., 1993. Chapitre 12: Cell Wall Polysaccharide Interactions and Degradability, in: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 285–313. <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c12>
- Hatfield, R.D., 1989. Structural Polysaccharides in Forages and Their Degradability. *Agron. J.* 81, 39–46. <https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100010007x>
- Heckwolf, S., Heckwolf, M., Kaeppler, S.M., de Leon, N., Spalding, E.P., 2015. Image analysis of anatomical traits in stalk transections of maize and other grasses. *Plant Methods* 11, 26. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0070-x>
- Hymowitz, T., Dudley, J.W., Collins, F.I., Brown, C.M., 1974. Estimations of Protein and Oil Concentration in Corn, Soybean, and Oat Seed by Near-Infrared Light Reflectance 1. *Crop Sci.* 14, crops1974.0011183X001400050031x. <https://doi.org/10.2135/crops1974.0011183X001400050031x>
- Iantcheva, N., Steingass, H., Todorov, N., Pavlov, D., 1999. A comparison of in vitro rumen fluid and enzymatic methods to predict digestibility and energy value of grass and alfalfa hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 81, 333–344. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00037-1)
- INRA, 2018. *Alimentation des ruminants*, Quae. ed. Versailles, France.
- INRA, 2007. *Alimentation des bovins, ovins et caprins*, Quae. ed. Versailles, France.
- Ishii, T., 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* 127, 111–127. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00130-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00130-1)
- Jancik, F., Homolka, P., Cermak, B., Lad, F., 2008. Determination of indigestible neutral detergent fibre contents of grasses and its prediction from chemical composition. *Czech J. Anim. Sci. - UZPI Czech Repub.*
- Jensen, C., Weisbjerg, M.R., Nørgaard, P., Hvelplund, T., 2005. Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118, 279–294. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.10.011>
- Jin, A.X., Ren, J.L., Peng, F., Xu, F., Zhou, G.Y., Sun, R.C., Kennedy, J.F., 2009. Comparative characterization of degraded and non-degradative hemicelluloses from barley straw and maize stems: Composition, structure, and thermal properties. *Carbohydr. Polym.* 78, 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.024>
- Jones, D.I.H., Hayward, M.V., 1975. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *J. Sci. Food Agric.* 26, 711–718. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740260518>

- Jung, H.G., Casler, M.D., 2006a. Maize Stem Tissues: Impact of Development on Cell Wall Degradability. *Crop Sci.* 46, 1801–1809. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.02-0086>
- Jung, H.G., Casler, M.D., 2006b. Maize Stem Tissues: Cell Wall Concentration and Composition during Development. *Crop Sci.* 46, 1793–1800. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.02-0085>
- Jung, H.-J.G., 2003. Maize stem tissues: ferulate deposition in developing internode cell walls. *Phytochemistry* 63, 543–549. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00221-8)
- Jung, H.-J.G., Ni, W., Chapple, C.C.S., Meyer, K., 1999. Impact of lignin composition on cell-wall degradability in an Arabidopsis mutant. *J. Sci. Food Agric.* 79, 922–928. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990501\)79:6<922::AID-JSFA307>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990501)79:6<922::AID-JSFA307>3.0.CO;2-9)
- Jurjanz, S., Monteils, V., 2005. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. *Anim. Res.* 54, 3–15. <https://doi.org/10.1051/animres:2004041>
- Kang, X., Kirui, A., Widanage, M.C.D., Mentink-Vigier, F., Cosgrove, D.J., Wang, T., 2019. Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat. Commun.* 10, 347. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08252-0>
- Karlen, S.D., Free, H.C.A., Padmakshan, D., Smith, B.G., Ralph, J., Harris, P.J., 2018. Commelinid Monocotyledon Lignins Are Acylated by p-Coumarate. *Plant Physiol.* 177, 513–521. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00298>
- Kaufmann, W., Hagemester, H., Dirksen, G., 1980. Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding, in: Ruckebusch, Y., Thivend, P. (Eds.), *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants: Proceedings of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology, Held at Clermont — Ferrand, on 3rd–7th September, 1979.* Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 587–602. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-8067-2\\_28](https://doi.org/10.1007/978-94-011-8067-2_28)
- Khan, N.A., Yu, P., Ali, M., Cone, J.W., Hendriks, W.H., 2014. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. *J. Sci. Food Agric.* 95, 238–252. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6703>
- Krämer-Schmid, M., Lund, P., Weisbjerg, M.R., 2016. Importance of NDF digestibility of whole crop maize silage for dry matter intake and milk production in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 219, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.007>
- Kumar, R., Gyawali, A., Morrison, G.D., Saski, C.A., Robertson, D.J., Tharayil, N., Schaefer, R.J., Beissinger, T.M., Sekhon, R.S., 2020. Genetic Architecture of Maize Rind Strength Revealed by the Analysis of Divergently Selected Populations. *bioRxiv* 2020.04.14.041517. <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.041517>
- Lapierre, C., 1993. Application of New Methods for the Investigation of Lignin Structure, in: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* John Wiley & Sons, Ltd, pp. 133–166. <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c6>
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C., 1986. Preparative Thioacidolysis of Spruce Lignin: Isolation and Identification of Main Monomeric Products 40, 47–50. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1986.40.1.47>
- Leff, B., Ramankutty, N., Foley, J.A., 2004. Geographic distribution of major crops across the world. *Glob. Biogeochem. Cycles* 18. <https://doi.org/10.1029/2003GB002108>
- Legland, D., El-Hage, F., Méchin, V., Reymond, M., 2017. Histological quantification of maize stem sections from FASGA-stained images. *Plant Methods* 13, 84. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0225-z>

- Li, K., Wang, H., Hu, X., Liu, Z., Wu, Y., Huang, C., 2016. Genome-Wide Association Study Reveals the Genetic Basis of Stalk Cell Wall Components in Maize. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158906>
- Lila, M., Barrière, Y., Rémi, T., 1986. Mise au point et étude d'un test enzymatique de la digestibilité de fourrages pauvres ou riches en amidon. *Agronomie* 6, 285–291. <https://doi.org/hal-02725058>
- Lopez, S., Murison, S.D., Travis, A.J., Chesson, A., 1993. Degradability of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated at different developmental stages from a newly extended maize internode. *Acta Bot. Neerlandica* 42, 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1993.tb00693.x>
- López-Malvar, A., Butrón, A., Samayoa, L.F., Figueroa-Garrido, D.J., Malvar, R.A., Santiago, R., 2019. Genome-wide association analysis for maize stem Cell Wall-bound Hydroxycinnamates. *BMC Plant Biol.* 19, 519. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2135-x>
- Machinet, G.E., Bertrand, I., Barrière, Y., Chabbert, B., Recous, S., 2011. Impact of plant cell wall network on biodegradation in soil: Role of lignin composition and phenolic acids in roots from 16 maize genotypes. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1544–1552. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.002>
- Marten, G.C., Barnes, R.F., 1979. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. IDRC, Ottawa, ON, CA.
- Masoero, F., Rossi, F., Pulimeno, A.M., 2006. Chemical composition and in vitro digestibility of stalks, leaves and cobs of four corn hybrids at different phenological stages. *Ital. J. Anim. Sci.* 5, 215–227. <https://doi.org/10.4081/ijas.2006.215>
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., G, J.S., Buckler, E., Doebley, J., 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6080–6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Mazaheri, M., Heckwolf, M., Vaillancourt, B., Gage, J.L., Burdo, B., Heckwolf, S., Barry, K., Lipzen, A., Ribeiro, C.B., Kono, T.J.Y., Kaeppler, H.F., Spalding, E.P., Hirsch, C.N., Robin Buell, C., de Leon, N., Kaeppler, S.M., 2019. Genome-wide association analysis of stalk biomass and anatomical traits in maize. *BMC Plant Biol.* 19, 45. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1653-x>
- Méchin, V., 2000. Etude de facteurs biochimiques et génétiques explicatifs de la variabilité pour la valeur alimentaire du maïs fourrage. INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON, INRA - Lusignan.
- Méchin, V., Argillier, O., Barrière, Y., Menanteau, V., 1998. Genetic variation in stems of normal and brown-midrib 3 maize inbred lines. Towards similarity for in vitro digestibility and cell wall composition. *Maydica* 43, 205–210.
- Méchin, V., Argillier, O., Hébert, Y., Guingo, E., Moreau, L., Charcosset, A., Barrière, Y., 2001. Genetic Analysis and QTL Mapping of Cell Wall Digestibility and Lignification in Silage Maize. *Crop Sci.* 41, 690–697. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.413690x>
- Méchin, V., Argillier, O., Rocher, F., Hébert, Y., Mila, I., Pollet, B., Barrière, Y., Lapierre, C., 2005. In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5872–5881. <https://doi.org/10.1021/jf050722f>
- Méchin, V., Laluc, A., Legée, F., Cézard, L., Denoue, D., Barrière, Y., Lapierre, C., 2014. Impact of the Brown-Midrib bm5 Mutation on Maize Lignins. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5102–5107. <https://doi.org/10.1021/jf5019998>
- Meshitsuka, G., Nakano, J., 1977. Studies on the mechanism of lignin colour reaction (XI). Maule colour reaction. *Mokuzai Gakkaishi J. Jpn. Wood Res. Soc.* 23, 232–236.



- Meyer, C., 2019. UFL - Dictionnaire des Sciences Animales.
- Michalet-Doreau, B., Corneloup, F., Aizac, B., Andrieu, J., Baumont, R., 2004. Variabilité et facteurs de variation de la teneur en matières azotées des maïs récoltés en plantes entières. *INRAE Prod. Anim.* 17, 3–10. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2004.17.1.3539>
- Morrison, T.A., Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., 1998. Cell-Wall Composition of Maize Internodes of Varying Maturity. *Crop Sci.* 38, crops1998.0011183X003800020031x. <https://doi.org/10.2135/crops1998.0011183X003800020031x>
- Murdy, W.H., 1960. The Strengthening System in the Stem of Maize. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 47, 205–226. <https://doi.org/10.2307/2394734>
- Norris, K.H., Barnes, R.F., Moore, J.E., Shenk, J.S., 1976. Predicting Forage Quality by Infrared Reflectance Spectroscopy. *J. Anim. Sci.* 43, 889–897. <https://doi.org/10.2527/jas1976.434889x>
- Norris, K.H., Hart, J.R., 1963. Direct Spectrophotometric Determination of Moisture Content of Grain and Seeds. *J. Infrared Spectrosc.* 4, 23–30. <https://doi.org/10.1255/jnirs.940>
- Oba, M., Allen, M.S., 1999. Evaluation of the Importance of the Digestibility of Neutral Detergent Fiber from Forage: Effects on Dry Matter Intake and Milk Yield of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 82, 589–596. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75271-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75271-9)
- OECD/FAO, 2019. OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028. OECD Publ. Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. [https://doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2019-en](https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2019-en)
- Penning, B.W., McCann, M.C., Carpita, N.C., 2019. Evolution of the Cell Wall Gene Families of Grasses. *Front. Plant Sci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01205>
- Perrier, L., Rouan, L., Jaffuel, S., Clément-Vidal, A., Roques, S., Soutiras, A., Baptiste, C., Bastianelli, D., Fabre, D., Dubois, C., Pot, D., Luquet, D., 2017. Plasticity of Sorghum Stem Biomass Accumulation in Response to Water Deficit: A Multiscale Analysis from Internode Tissue to Plant Level. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01516>
- Peyrat, J., 2014. Digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage chez les ruminants : conséquences sur l'évaluation de sa valeur nutritive. Université Blaise Pascal: Clermont-Ferrand II, France.
- Peyrat, J., Nozière, P., Féraud, A., Le Morvan, A., Meslier, E., Protin, P.V., Carpentier, B., Baumont, R., 2016. Digestibilité du maïs fourrage : équations et critères de prédiction. ARVALIS - Inst. Végétal - INRA.
- Peyraud, J.L., Apper-Bossard, E., 2006. L'acidose latente chez la vache laitière. *INRAE Prod. Anim.* 19, 79–92. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2006.19.2.3484>
- Piperno, D.R., Ranere, A., Holst, I., Iriarte, J., Dickau, R., 2009. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5019–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812525106>
- Ralph, J., 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem. Rev.* 9, 65–83. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9141-9>
- Ralph, J., Hatfield, R.D., Quideau, S., Helm, R.F., Grabber, J.H., Jung, H.-J.G., 1994a. Pathway of p-Coumaric Acid Incorporation into Maize Lignin As Revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 9448–9456. <https://doi.org/10.1021/ja00100a006>
- Ralph, J., Kim, H., Lu, F., Grabber, J.H., Lepié, J.-C., Berrio-Sierra, J., Mir Derikvand, M., Jouanin, L.L., Boerjan, W., Lapierre, C., 2008. Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into

- angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl CoA reductase deficiency). *Plant J.* 53, 368–379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03345.x>
- Ralph, J., Lapierre, C., Boerjan, W., 2019. Lignin structure and its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol., Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., 1994b. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 3485–3498. <https://doi.org/10.1039/P19940003485>
- Riboulet, C., Guillaumie, S., Mechin, V., Bosio, M., Pichon, M., Goffner, D., Catherine, L., Pollet, B., Lefevre, B., Martinant, J.-P., Barrière, Y., 2009. Kinetics of Phenylpropanoid Gene Expression in Maize Growing Internodes: Relationships with Cell Wall Deposition. *Crop Sci. - CROP SCI* 49. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.03.0130>
- Roth, L.S., Marten, G.C., Compton, W.A., Stuthman, D.D., 1970. Genetic Variation of Quality Traits in Maize (*Zea mays* L.) Forage1. *Crop Sci.* 10, [crops1970.0011183X001000040014x](https://doi.org/10.2135/cropsci1970.0011183X001000040014x). <https://doi.org/10.2135/cropsci1970.0011183X001000040014x>
- Santiago, R., Barros-Rios, J., Malvar, R.A., 2013. Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6960–6980. <https://doi.org/10.3390/ijms14046960>
- Sauvant, D., Noziere, P., 2013a. La quantification des principaux phénomènes digestifs chez les ruminants : les relations utilisées pour rénover les systèmes d'unités d'alimentation énergétique et protéique. *INRA Prod. Anim.* 26, 327–346.
- Sauvant, D., Noziere, P., 2013b. The quantification of the main digestive processes in ruminants: The equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Prod. Anim.* 26, 327–346. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002670>
- Sawers, R.J.H., Sanchez-Leon, N., 2011. Origins of maize: a further paradox resolved. *Front. Genet.* 0. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00053>
- Servais, L., 2019. Choisir des variétés adaptées à ses objectifs.
- Simmons, T.J., Mortimer, J.C., Bernardinelli, O.D., Pöppler, A.-C., Brown, S.P., deAzevedo, E.R., Dupree, R., Dupree, P., 2016. Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat. Commun.* 7, 13902. <https://doi.org/10.1038/ncomms13902>
- Sindhu, A., Langewisch, T., Olek, A., Multani, D.S., McCann, M.C., Vermerris, W., Carpita, N.C., Johal, G., 2007. Maize Brittle stalk2 Encodes a COBRA-Like Protein Expressed in Early Organ Development But Required for Tissue Flexibility at Maturity. *Plant Physiol.* 145, 1444–1459. <https://doi.org/10.1104/pp.107.102582>
- Struik, P.C., 1983. Physiology of forage maize (*Zea mays* L.) in relation to its production and quality (phd). S.I.
- Surault, F., Barrière, Y., Briand, M., Emile, J.C., Traineau, R., 2005. Variabilité génétique de la digestibilité in vivo d'hybrides de maïs. *Bilan de 34 années de mesures. Fourrages* 459–474.
- Taylor, N.G., 2008. Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytol.* 178, 239–252. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02385.x>
- Tenaillon, M.I., Charcosset, A., 2011. A European perspective on maize history. *C. R. Biol., On the trail of domestications, migrations and invasions in agriculture* 334, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.015>
- Terashima, N., Fukushima, K., He, L.-F., Takabe, K., 1993. Comprehensive Model of the Lignified Plant Cell Wall. *Forage Cell Wall Struct. Dig. accesspublicati*, 247–270. <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c10>



- Terrett, O.M., Dupree, P., 2019. Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. *Curr. Opin. Biotechnol., Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.10.010>
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. *Grass Forage Sci.* 18, 104–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Tobimatsu, Y., Schuetz, M., 2019. Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well? *Curr. Opin. Biotechnol., Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.10.001>
- Tolivia, D., Tolivia, J., 1987. Farga: A new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *J. Microsc.* 148, 113–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02859.x>
- Traxler, M.J., Fox, D.G., Van Soest, P.J., Pell, A.N., Lascano, C.E., Lanna, D.P.D., Moore, J.E., Lana, R.P., Vélez, M., Flores, A., 1998. Predicting forage indigestible NDF from lignin concentration. *J. Anim. Sci.* 76, 1469–1480. <https://doi.org/10.2527/1998.7651469x>
- Truntzler, M., Barrière, Y., Sawkins, M.C., Lespinasse, D., Betran, J., Charcosset, A., Moreau, L., 2010. Meta-analysis of QTL involved in silage quality of maize and comparison with the position of candidate genes. *Theor. Appl. Genet.* 121, 1465–1482. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1402-x>
- Valdes, E., B. HUNTER, R., PINTER, L., 1987. Determination of quality parameters by near infrared reflectance spectroscopy in whole-plant corn silage. *Can. J. Plant Sci. - CAN J PLANT SCI* 67, 747–754. <https://doi.org/10.4141/cjps87-102>
- Vallet, C., Chabbert, B., Czaninski, Y., Monties, B., 1996. Histochemistry of Lignin Deposition during Sclerenchyma Differentiation in Alfalfa Stems. *Ann. Bot.* 78, 625–632. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0170>
- Van Soest, P.J., 1993. Chapitre 15: Cell Wall Matrix Interactions and Degradations-Session synopsis, in: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. pp. 377–395.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50, 50–55. <https://doi.org/10.1093/jaoac/50.1.50>
- Vanholme, R., De Meester, B., Ralph, J., Boerjan, W., 2019. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol., Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.018>
- Vermorel, M., Coulon, J.B., Journet, M., 1987. Revision du système des unités fourragères (UF). *Bull. Tech. Cent. Rech. Zootech. Vét. Theix* 70, 9.
- Virlovet, L., El Hage, F., Griveau, Y., Jacquemot, M.-P., Gineau, E., Baldy, A., Legay, S., Horlow, C., Combes, V., Bauland, C., Palafre, C., Falque, M., Moreau, L., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2019. Water Deficit-Responsive QTLs for Cell Wall Degradability and Composition in Maize at Silage Stage. *Front. Plant Sci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00488>
- Vogel, J., 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.002>
- Wang, J.P., Matthews, M.L., Naik, P.P., Williams, C.M., Ducoste, J.J., Sederoff, R.R., Chiang, V.L., 2019. Flux modeling for monolignol biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol., Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.12.003>

- Wang, X., Shi, Z., Zhang, R., Sun, X., Wang, J., Wang, Shuai, Zhang, Ying, Zhao, Y., Su, A., Li, C., Wang, R., Zhang, Yunxia, Wang, Shuaishuai, Wang, Y., Song, W., Zhao, J., 2020. Stalk architecture, cell wall composition, and QTL underlying high stalk flexibility for improved lodging resistance in maize. *BMC Plant Biol.* 20, 515. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02728-2>
- Wang, X., Zhang, R., Shi, Z., Zhang, Ying, Sun, X., Ji, Y., Zhao, Y., Wang, J., Zhang, Yunxia, Xing, J., Wang, Y., Wang, R., Song, W., Zhao, J., 2019. Multi-omics analysis of the development and fracture resistance for maize internode. *Sci. Rep.* 9, 8183. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44690-6>
- Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R., Hawkins, S., 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Front. Plant Sci.* 4, 220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00220>
- Weimer, P.J., 1992. Cellulose Degradation by Ruminant Microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 189–223. <https://doi.org/10.3109/07388559209069192>
- Willemse, M.T.M., Den Outer, R.W., 1988. Stem anatomy and cell wall autofluorescence during growth of three maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Acta Bot. Neerlandica* 37, 39–47. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1988.tb01580.x>
- Wilson, J.R., 1993. Chapitre 1: Organization of Forage Plant Tissues, in: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–32. <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c1>
- Wilson, J.R., Mertens, D.R., Hatfield, R.D., 1993. Isolates of cell types from sorghum stems: Digestion, cell wall and anatomical characteristics. *J. Sci. Food Agric.* 63, 407–417. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740630406>
- Zhang, Y., Culhaoglu, T., Pollet, B., Melin, C., Denoue, D., Barrière, Y., Baumberger, S., Méchin, V., 2011. Impact of Lignin Structure and Cell Wall Reticulation on Maize Cell Wall Degradability. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10129–10135. <https://doi.org/10.1021/jf2028279>
- Zhang, Y., Legay, S., Barrière, Y., Méchin, V., Legland, D., 2013. Color Quantification of Stained Maize Stem Section Describes Lignin Spatial Distribution within the Whole Stem. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3186–3192. <https://doi.org/10.1021/jf400912s>
- Zhang, Y., Legland, D., Hage, F.E., Devaux, M.-F., Guillon, F., Reymond, M., Méchin, V., 2019. Changes in cell walls lignification, feruloylation and p-coumaroylation throughout maize internode development. *PLOS ONE* 14, e0219923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219923>
- Zhang, Y., Ma, L., Pan, X., Wang, J., Guo, X., Du, J., 2018. Micron-scale Phenotyping Techniques of Maize Vascular Bundles Based on X-ray Microcomputed Tomography. *JoVE J. Vis. Exp.* e58501. <https://doi.org/10.3791/58501>
- Zhang, Y., Ma, L., Wang, J., Wang, X., Guo, X., Du, J., 2020. Phenotyping analysis of maize stem using micro-computed tomography at the elongation and tasseling stages. *Plant Methods* 16, 2. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0549-y>
- Zhang, Z., Zhang, X., Lin, Zhelong, Wang, J., Liu, H., Zhou, L., Zhong, S., Li, Y., Zhu, C., Lai, J., Li, X., Yu, J., Lin, Zhongwei, 2020. A Large Transposon Insertion in the stiff1 Promoter Increases Stalk Strength in Maize. *Plant Cell* 32, 152–165. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00486>
- Zhong, R., Cui, D., Ye, Z.-H., 2019. Secondary cell wall biosynthesis. *New Phytol.* 221, 1703–1723. <https://doi.org/10.1111/nph.15537>



# Chapitre 1 :

## **High throughput accurate method for estimating in vitro dry matter digestibility of maize silage**

*Les travaux présentés au cours de ce premier chapitre de thèse répondent au premier objectif de la thèse : « mettre en place un protocole biochimique permettant de quantifier à haut débit la digestibilité in vitro de la MS provenant de plantes de maïs avec épi ».*

*Alors que le protocole biochimique proposé par Aufrère en 1983 pour quantifier la digestibilité de la MS in vitro chez le maïs fait référence, ce protocole s'avère particulièrement lourd à mettre en œuvre dans un laboratoire analytique, avec des volumes de matière sèche à analyser importants et des débits d'analyse faibles. Par ailleurs, il existe pléthore de protocoles dans la littérature, proposant chacun des protocoles plus ou moins modifiés par rapport à celui d'Aufrère.*

*Au cours de ce chapitre, je vous présente le développement d'un protocole de quantification in vitro de la matière sèche de maïs. Pour augmenter le débit du protocole, j'ai modifié la quantité de matière sèche analysée et j'ai augmenté le débit d'analyse en gardant les étapes cruciales du protocole d'Aufrère et en proposant de faciliter les étapes laborieuses. J'ai bien évidemment testé que les modifications apportées n'engendraient pas de différences significatives avec la digestibilité issue du protocole Aufrère et qu'elles permettaient bien de rendre compte des différences de digestibilité entre différentes matières sèches obtenues dans le cadre d'essais menés au sein du projet Promaïs DECLIC.*

*Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique paru en 2021, intitulé "High throughput accurate method for estimating in vitro dry matter digestibility of maize silage" et publié dans « Plants Methods ». (DOI : 10.1186/s13007-021-00788-5). C'est cet article qui est présenté dans le chapitre 1 de la thèse.*



## METHODOLOGY

## Open Access



# High throughput accurate method for estimating in vitro dry matter digestibility of maize silage

P.-L. Lopez-Marnet<sup>1,2</sup>, S. Guillaume<sup>1</sup>, M.-P. Jacquemot<sup>1</sup>, M. Reymond<sup>1</sup> and V. Méchin<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Since the introduction of studies on maize silage digestibility at the end of the nineteenth century, protocols to estimate dry matter digestibility have not stopped evolving. Since the early 1980s, the protocol developed by Aufrère became a benchmark in many laboratories to estimate in vitro dry matter digestibility. In order to increase its throughput, to facilitate its execution and to decipher the impact of the different parameters of the protocol we decided to test the combination of 7 parameters in 21 different protocols.

**Results:** We thus tested the impact of (1) the presence or absence of pepsin in HCl solution, (2) the temperature of incubation during enzymatic hydrolysis, (3) the presence or absence of a gelatinization step, (4) washing/rinsing versus neutralization step, (5) the presence or absence of  $\alpha$ -amylglucosidase in enzymatic solution, (6) the duration of cellulase incubation, and (7) the concentration of the cellulase solution. The major result of our work highlighted that it was essential to carry out a gelatinization step to correctly estimate the in vitro dry matter digestibility of maize silage.

**Conclusions:** The proposed protocol in this paper is innovative, reliable, highthroughput and easy to implement in many laboratories to accurately quantify in vitro dry matter digestibility.

**Keywords:** In vitro digestibility, Maize silage, Gelatinization, Protocol

## Background

First introduction of study on maize silage digestibility appeared in France with the work of Auguste Gofart “Manuel de la culture et de ensilage des maïs” [1] for cow winter nutrition and milk production. During the middle of the twentieth century, the concept of digestibility was first introduced by comparing in vivo silage digestibility and in vitro dry matter digestibility (IVDMD) using rumen fluid [2, 3] (Table 1). Tilley and Terry [2] were the first to propose IVDMD quantification following a two step protocol. The first step consists

in the action of rumen fluid directly added on the dry matter (DM) and the second step consists in the action of acidic solution and enzymes [2] (Table 1). However, the use of rumen fluid in protocols caused supply difficulties and its utilization was restricted to few teams [4]. To encompass the use of rumen fluid, IVDMD protocols using fungal enzymes appeared in North America during the 70's (Table 1). Indeed, in 1975, Jones and Hayward [5] proposed a two step digestibility protocol with fungal enzymes (Table 1). The first step of this protocol consists in an enzymatic pretreatment with pepsin ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) in acidic solution (HCl 0.1 N) during 24 h at 40 °C and the second step in an acidic digestion with Cellulase (*Trichoderma viride*) during 48 h at 40 °C (Table 1). To establish this protocol Jones and Hayward [5] studied the impact of different parameters such as the influence

\*Correspondence: valerie.mechin@inrae.fr

<sup>1</sup> Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Bat 2 - Route de St Cyr, 78000 Versailles, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



**Table 1** Reported correlations between in vivo and in vitro digestibilities since 1955. Adapted from Aufrere [6] and Marten and Barnes [4]

References	Authors (year)	Forage types	Animals feed	In vitro protocol step 1	In vitro protocol step 2	Correlation coefficient (R)	Prediction equation established
[28]	Thurman and Wehnt (1955)	Sorghum/Corn silage	Rabbits	-	Solution 1% HCl 15 lb pressure 1 h	0.66	-
[29]	Clark (1958)	Thirteen grass species	Sheep	-	Rumen jus	0.87	-
[2]	Tilley and Terry (1963)	Clover/Lucerne	Sheep	Rumen jus	HCl 0.1 N-2 g L <sup>-1</sup> pepsin		y = 0.99x - 1.01
[30]	Donefer et al. (1963)	Green grass silage	Sheep	-	Cellulase + pepsin 24 h 40 °C	0.93	-
[14]	Alexander and McGowan (1966)	Grasses/Legumes/Hays	Sheep	Rumen liquor/buffer mixture	HCl-pepsin	0.96	y = 0.97x + 5.05
[31]	Deinum and Soest (1969)	Hays/grasses/Grass silages	-	Rumen jus		0.89	y = 1.28x - 44.8
[32]	Jones and Hayward (1973)	Temperate grasses	Sheep	-	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> 6.25 g L <sup>-1</sup> 48 h 40 °C	0.92	y = 0.72x + 32.95
[33]	Hartley et al. (1974)	Grasses/Legumes	Sheep	NDF [3]	Cellulase basidiomycete 16 h	0.96	-
[5]	Jones and Hayward (1975)	Temperate grass	Sheep	Rumen jus [2]	37 °C HCl 0.1 N-2 g L <sup>-1</sup> pepsin [2]	0.96	-
[34]	McQueen and Van Soest (1975)	Temperate grass/Legumes	Sheep and cattle	HCl 0.1 N-2 g L <sup>-1</sup> pepsin 24 h 40 °C 45 mg Onozuka cellulase in 6.5 ml of 1 M acetate, pH 4.5 4.5-40 °C 72 h Rumen jus [2]	Cellulase "BDH" 48 h 40 °C 0.96 ( <i>Trichoderma viride</i> ) 70 mg pepsin in 1 ml of 1 M acetate, pH 4.5 40 °C 24 h	0.80	y = 0.61x + 30.4
[35]	Adegbola and Paladines (1977)	Tropical grasses/Legumes	Sheep	HCl 0.05 N Pepsin 48 h 40 °C	Cellulase <i>Trichoderma</i> (Worthington Biochemical Corporation) 48 h 40 °C	0.98	-
[36]	Clark and Beard (1977)	Green Silage/Hays/Straw	Sheep or cattle	HCl 0.1 N Pepsin 24 h 40 °C	Cellulase ( <i>Aspergillus niger</i> ) 48 h 40 °C	0.80	y = 39.1 + 0.76x
[37]	Downman and Collins (1977)	Grass silage	Sheep	HCl 0.1 N Pepsin 24 h 40 °C	Cellulase "BDH" 48 h 40 °C 0.89		y = 0.58x + 31.57
[38]	Goto and Minson (1977)	Tropical and temperate grasses	Sheep	HCl 0.1 N Pepsin 48 h 40 °C	Cellulase "Onozuka SS-P" 48 h 40 °C	0.94	y = 0.69x + 20.3
[39]	Roughan and Holland (1977)	Temperate grasses and legumes	-	NDF solution	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> 5 h and 18 h 50 °C	0.98	y = 0.98x - 10.12
[2]	Tilley and Terry (1963)	Temperate grasses	Sheep	HCl 0.1 N-2 g L <sup>-1</sup> pepsin 24 h 40 °C	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> ("BDH", phosphate citrate buffer, pH 4.6) 48 h 40 °C	0.96	y = 0.56x + 34.7

Table 1 (continued)

References	Authors (year)	Forage types	Animals feed	In vitro protocol step 1	In vitro protocol step 2	Correlation coefficient (R)	Prediction equation established
[40, 41]	Kellner and Kirchgessner (1977), Kirchgessner and Kellner (1978)	Green silage Hays Legumes	—	HCl 2 N 30 min 100 °C	Cellulase (0.1 M Na-acetate buffer, pH 4.5) 24 h 39 °C HCl 0.1 N—pepsin 2 mg L <sup>-1</sup> 48 h	0.91	y = 1.15x - 12.02
[42]	McLeod and Minson (1978)	Tropical and temperate grasses	—	HCl 0.1 N 48 h 39 °C	Cellulase*Onozuka SS—P0.94 1500* 48 h 39 °C	0.94	y = 0.70x + 18.2
[43]	Adamson and Terry (1980)	Hays	Sheep	HCl 0.1 N 2 g L <sup>-1</sup> 40 °C pepsin 24 h	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> ("BDH", phosphate citrate buffer, pH 4.6) 48 h 40 °C	0.91	y = 0.68x + 24.18
[6]	Aufrère (1982)	Green silage Hays Legumes	Sheep	HCl 0.1 N 2 g L <sup>-1</sup> 40 °C pepsin 24 h	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> *Onozuka R 10* (sodium acetate de 0.05 M pH 4.6) 24 h at 40 °C	0.91	y = 0.793x + 0.125 + Δ <sub>forage</sub>
[7]	Aufrère (1983)	—	—	HCl 0.1 N 2 g L <sup>-1</sup> 40 °C C30 min 80 °C pepsin 24 h	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> *Onozuka R 10* (sodium acetate de 0.05 M pH 4.6) 24 h at 40 °C	0.79	—
[8]	Limagrain (1985)	—	—	HCl 0.1 N 2 g L <sup>-1</sup> 40 °C C30 min 80 °C pepsin 24 h	Cellulase*Onozuka R 10* and amyloglucosidase 24 h 40 °C	—	—
[16]	Lila et al. (1986)	Maize silage	Sheep	α-Amylase (A-1278 SIGMA) 39 °C 24 h HCl 1 N 20 g L <sup>-1</sup> 39 °C 24 h pepsin 39 °C 24 h	Cellulase (Celluclast 200 L type N de Novo, sodium acetate pH 4.8) 50 °C 58 h	0.25	—
[44]	Aufrère and Michalet-Doreau (1988)	Dry forages, energy feeds, protein supplements	Sheep	HCl 0.1 N 2 g L <sup>-1</sup> 40 °C C30 min 80 °C pepsin 24 h	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> *Onozuka R 10* (sodium acetate de 0.05 M pH 4.6) 24 h at 40 °C	0.95	y = 0.699x + 22.6
[45]	De Boever et al. (1988)	Maize silage	Sheep and cattle	HCl 0.1 N—2 g L <sup>-1</sup> 24 h 40 °C and 45 min 80 °C	Cellulase 24 h 40 °C	0.71	y = 0.610x + 28.2
[15]	Barrière et al. (1991)	Maize silage hybrids	Texels castrated sheep	Aufrère [6], Lila et al. [16], Limagrain (NIRS prediction)	—	0.540, 0.290, 0.380, 0.37	—
[8, 9]	Andrieu et al. (1993), Dardenne et al. (1993)	Maize silage	Sheep	Limagrain [8]	Limagrain [8]	0.537	—
				Aufrère [7]	Aufrère [7]	0.613	—



**Table 1** (continued)

References	Authors (year)	Forage types	Animals feed	In vitro protocol step 1	In vitro protocol step 2	Correlation coefficient (R)	Prediction equation established
[46]	Ferret et al. (1997)	Maize silage	Sheep	Lila et al. [16]	Lila et al. [16]	0.450	-
[11]	Aufrère (2007)	Green silage/Silage/Hay	Sheep	Rumen liquor/buffer mixture HCl-pepsin HCl 0.1 N 2 g L <sup>-1</sup> pepsin 24 h 40 °C 30 min 80 °C	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> *Onozuka R 10* (sodium acetate de 0.05 M pH 4.6)	0.62 0.78	y = 0.75x + 0.1728 y = 0.630x + 29.7
[17]	Damiran et al. (2008)	Forages	Sheep	28 mL of the McDougall's solution and 7 mL of ruminal fluid 39 °C 48 h	HCl 0.1 N—pepsin 6.6 g L <sup>-1</sup> 39 °C 48 h (Galjean 1997)	0.58	y = 0.614x + 0.149
[18]	Kowalski et al. (2014)	Grass silage	Sheep	-	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> *Onozuka R 10* (sodium acetate de 0.01 M pH 4.6) 39 °C 48 h	0.53	y = 0.527x + 0.356
[12]	Peyrat (2015)	Maize	Sheep and cattle	Aufrère et al. (2007)	Aufrère et al. (2007)	0.736	Y = 37.79x + 0.4936
[13]	Virlouvet et al. (2019)	Maize	-	HCl 0.1 N 24 h 40 °C	Cellulase <i>Trichoderma viride</i> *Onozuka R 10* (sodium acetate de 0.05 M pH 4.6) 72 h 50 °C	-	-

of different pretreatments, the order of the two step, and the impact of different cellulase origins. Their results on grasses demonstrated that a protocol with two step [step 1: Pepsin; step 2: cellulase solution (*T. viride*)] was more accurate ( $r=0.96$ ) to account for in vivo digestibility values and variation than a protocol without pepsin pretreatment step ( $r=0.91$ ). Moreover, they also showed that applying pepsin solution before cellulase cocktail reflected better in vivo digestibility rather than after cellulase cocktail [5].

Thereafter, even if the different protocols proposed and used by the scientific community have their own specificities, they all retained two step procedure as demonstrated by the protocols reported in Table 1 (adapted from [4, 6]). Aufrère [6, 7] tested several combinations to adapt the digestibility protocol of Jones and Hayward [5] on temperate grasses. During that experimentation, the impact of the 5 following parameters on IVDMD was studied: the acid concentration during the pretreatment step as well as the duration and temperature of this pretreatment, the cellulase concentration in enzymatic treatment step and the addition of a starch gelatinization step to solubilize the high amount of starch provided by the cob in the case of maize dry matter (Table 1) [6, 8, 9]. The starch gelatinization allowed the breaking down of intermolecular bonds of starch granules and more precisely of amylopectin the more crystalline part of starch.

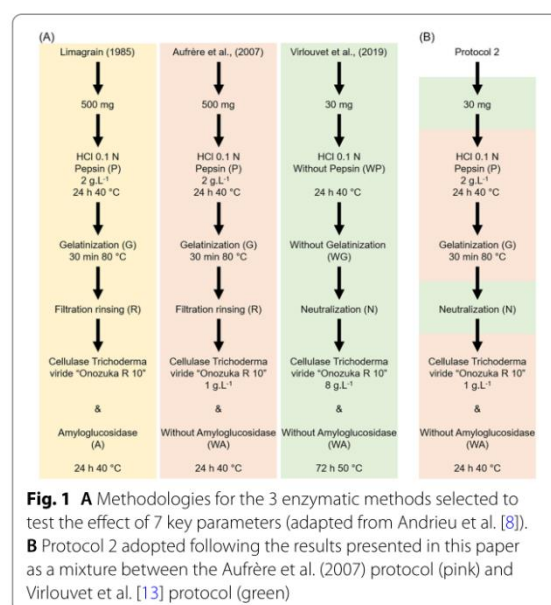
This has led to the establishment of the “Aufrère protocol” [7] to quantify maize IVDMD at silage stage: this protocol first proceeds to a pretreatment step with a 0.1 N HCl solution with 2% pepsin at 40 °C for 24 h. Afterwards a gelatinization step (80 °C for 30 min) is applied. Finally, after filtration and washing, an enzymatic hydrolysis step is carried out at 40 °C with an Onozuka R10 cellulase solution (1 mg mL<sup>-1</sup>) for 24 h. The obtained IVDMD is expressed as the mass percentage of matter lost during these successive steps. Resulting IVDMD quantification obtained with this protocol accounts in an acceptable way for more than 60% of in vivo digestibility observed variation [10].

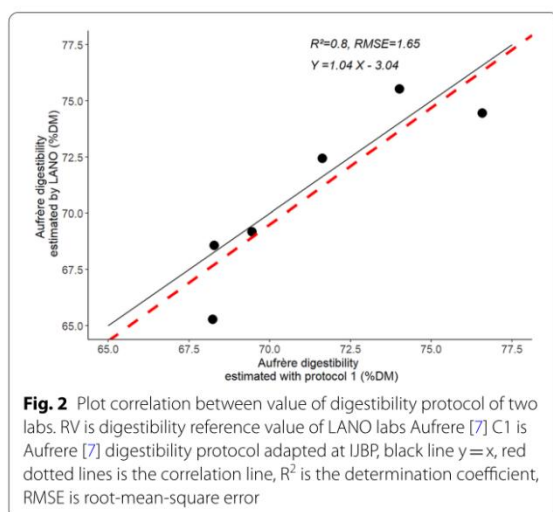
Nowadays, the protocol developed by Aufrère is a benchmark in many laboratories to estimate IVDMD [8, 9, 11, 12] of silage maize. In its original version, this protocol allows to estimate digestibility but it remains restrictive: first of all because 500 mg of DM are digested and this requires high amount of solutions and space to manipulate and secondly because the gelatinization step is followed by a tedious rinsing step before the addition of enzymatic solution, reducing the throughput of the protocol.

In our group we developed a few years ago a high-throughput protocol to characterize starch-free maize samples digestibility. This protocol tardily published

[13] was an adaptation of the Aufrère protocol developed in 1982 for starch-free. This protocol first proceeds to a pretreatment step of 30 mg of dry matter with a 0.1 N HCl solution at 40 °C for 24 h. Afterwards a neutralization step was performed with NaOH 2 N before an enzymatic hydrolysis step carried out at 50 °C with an Onozuka R10 cellulase solution (8 mg mL<sup>-1</sup>) for 72 h.

Herein, we developed a protocol dedicated to starch containing maize samples and capable of enabling high-throughput analyzes. With the aim to facilitate protocol execution, we propose to reduce the dry matter sampling to 30 mg and, instead of rinsing, to neutralize the solution after the gelatinization step as proposed in Virloquet et al. [13]. We also tested the influence of different parameters which differ significantly between Aufrère and Doreau [7] and Virloquet et al. [13] (Fig. 1a) for the estimation of IVDMD of maize silage. We also tested the impact of  $\alpha$ -amylglucosidase in enzymatic solution as proposed by Limagrain [8] (Fig. 1a). For that we compared 21 protocols to test the impact of 7 parameters: (1) presence or absence of pepsin in HCl solution, (2) temperature of incubation during enzymatic hydrolysis, (3) presence (G) or absence (WG) of gelatinization step, (4) washing/rinsing (R) or neutralization (N) step, (5) presence or absence of  $\alpha$ -amylglucosidase in enzymatic solution, (6) duration (24 or 72 h) of cellulase incubation, and (7) concentration (1 or 8 mg mL<sup>-1</sup>) of the cellulase solution.





**Fig. 2** Plot correlation between value of digestibility protocol of two labs. RV is digestibility reference value of LANO labs Aufrère [7] C1 is Aufrère [7] digestibility protocol adapted at IJBP, black line  $y=x$ , red dotted lines is the correlation line,  $R^2$  is the determination coefficient, RMSE is root-mean-square error

This study leads to the establishment of an accurate, highthroughput and easy to handle protocol to quantify IVDMD of maize samples.

**Results**

**Reference values of IVDMD**

IVDMD reference values were determined by LANO laboratory on a selection of 6 maize dry matter samples that cover a large range of variation for dry matter digestibility. These IVDMD reference values varied from 65 to 76%DM (Fig. 2). Protocol 1 (Table 2) is the one which most closely resembles that proposed by Aufrère [6], taken up by the LANO laboratory.

We applied protocol 1 to the 6 selected samples and compared IVDMD obtained values with reference ones. IVDMD values obtained with protocol 1 varied from 67 to 77%DM which faithfully reflects the values obtained by the LANO laboratory. Moreover, between these two protocols, the determination coefficient ( $R^2$ ) is 0.8 and the slope is 1.04 (Fig. 2), indicating that IVDMD values obtained with protocol 1 are similar to the ones obtained by the reference protocol [6].

**Gelatinization step is crucial to obtain high similarity of IVDMD with the reference protocol**

The impact of 7 parameters was tested by applying on the 6 selected samples the 21 protocols presented in Table 2

**Table 2** Protocols analyzed

Protocol number	Pepsin 2 g L <sup>-1</sup>	Gelatinization 80 °C—30 min	Rinsing or neutralization	Cellulase solution (CS) [] mg L <sup>-1</sup>	Amyloglucosidase 1.5 mL L <sup>-1</sup>	Duration of incubation h	Temperature of incubation °C
1	P	G	R	1	WA	24	40
2	P	G	N	1	WA	24	40
3	WP	WG	N	8	WA	72	40
4	WP	WG	N	8	A	72	50
5	P	WG	N	1	WA	24	50
6	P	WG	N	1	A	24	50
7	P	WG	N	1	A	72	50
8	P	WG	N	8	WA	72	50
9	P	WG	N	8	A	24	50
10	P	WG	N	8	A	72	50
11	P	WG	N	8	A	72	40
12	P	WG	R	1	WA	24	40
13	P	G	N	1	A	24	50
14	P	G	N	8	WA	72	50
15	P	G	N	8	A	24	50
16	P	G	R	1	WA	24	50
17	P	G	R	1	A	24	50
18	P	G	R	8	WA	24	50
19	P	G	R	8	WA	72	50
20	P	G	R	8	A	72	50
21	P	WG	R	8	WA	24	50

The 21 protocols tested as a combination of the 7 retained parameters: (1) Pepsin concentration at 2 (P) or 0 g.L<sup>-1</sup> (WP), (2) presence of gelatinization (G) or absence (WG), (3) rinsing (R) or neutralization (N) steps, (4) concentration of cellulase solution (8 or 1 mg L<sup>-1</sup>), (5) amyloglucosidase concentration (1.5 (A) or 0 mL L<sup>-1</sup> (WA)), (6) 24 or 72 h of incubation time and (7) 50 or 40 °C for incubation temperatures





which vary for the presence of pepsin, the application of gelatinization, Rinsing or Neutralization, the concentration of cellulase, the presence of amyloglucosidase, the duration of incubation, the temperature of incubation. Determination coefficient, slope and repeatability (cf. “Methods” section) were criteria used to discriminate protocols according to their similarity with the Aufrère protocol [6]. The slope evolved from 0.2 to 1.2 depending protocols. Repeatability is a check of protocol quality and covers a range of 1 to 4% of error except protocol 21 that presents a lower repeatability of with a 6% error.

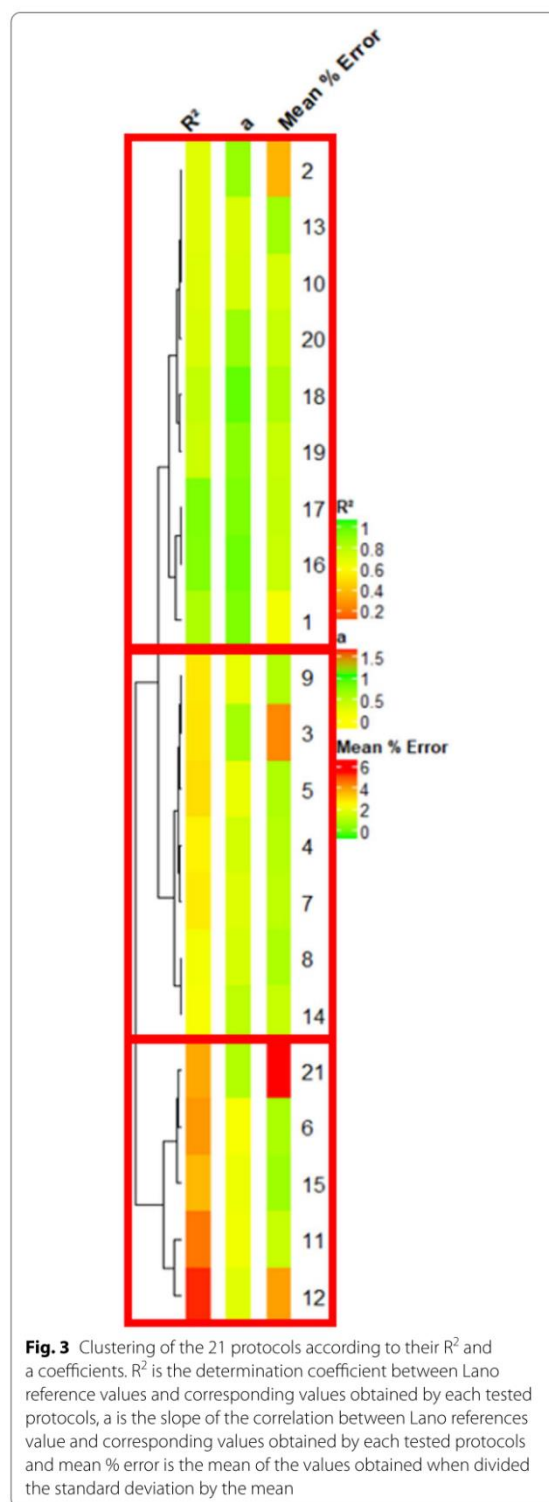
The dendrogram clustered the 21 tested protocols in three distinct groups (Fig. 3). The groups to which Protocol 1 belongs presented highly significant correlations (higher than 0.7) with reference values than the 2 other groups (lower than 0.5) (Figs. 3 and 4). Height of the 9 tested protocols (1, 2, 10, 16, 17, 18, 19 and 20) clustered in this first group are highly correlated together (coefficient correlation R higher than 0.8) (Fig. 4). This group also presented slopes closest to 1. Moreover, protocol 21 belonging to the third group, which showed the highest mean % error (Fig. 3) and was eliminated for further statistical analyses. All other protocols showed good repeatability with less than 5% of mean % error.

The regression analysis performed including only main effect parameters yielded in a model with the lowest Akaike Information Criterion (AIC) including the gelatinization step and the temperature of cellulosic hydrolysis incubation (Table 3). In order to clearly depict the impact of these two parameters,  $R^2$  of protocols were separated either according to their temperature of incubation (40 or 50 °C; Fig. 5A) or according if a gelatinization step was included in the protocol (Fig. 5B).  $R^2$  of protocols were not significantly different if temperature of incubation was either 40 or 50 °C. On the other hand,  $R^2$  was significantly increased ( $p\text{Value}=3.6e10^{-3}$ ) when a gelatinization was included in the protocol, suggesting that gelatinization step is clearly a parameter that needs to be included to increase similarity with the Aufrère protocol on maize silage samples.

**Interactions between gelatinization and rinsing/neutralization and between gelatinization and incubation temperature also impacted IVDMD**

Multiple regressions were also performed to pinpoint interactions between parameters that impacted the variation of IVDMD protocol compared to the reference protocol. This analysis identified two interactions that significantly impacted the IVDMD estimation (Table 3).

Firstly, the interaction between gelatinization and rinsing/neutralization was involved significantly in the variation of  $R^2$  of the protocols. Indeed, protocols including a gelatinization step and a rinsing step after gelatinization



**Fig. 3** Clustering of the 21 protocols according to their  $R^2$  and a coefficients.  $R^2$  is the determination coefficient between Lano reference values and corresponding values obtained by each tested protocols, a is the slope of the correlation between Lano references value and corresponding values obtained by each tested protocols and mean % error is the mean of the values obtained when divided the standard deviation by the mean

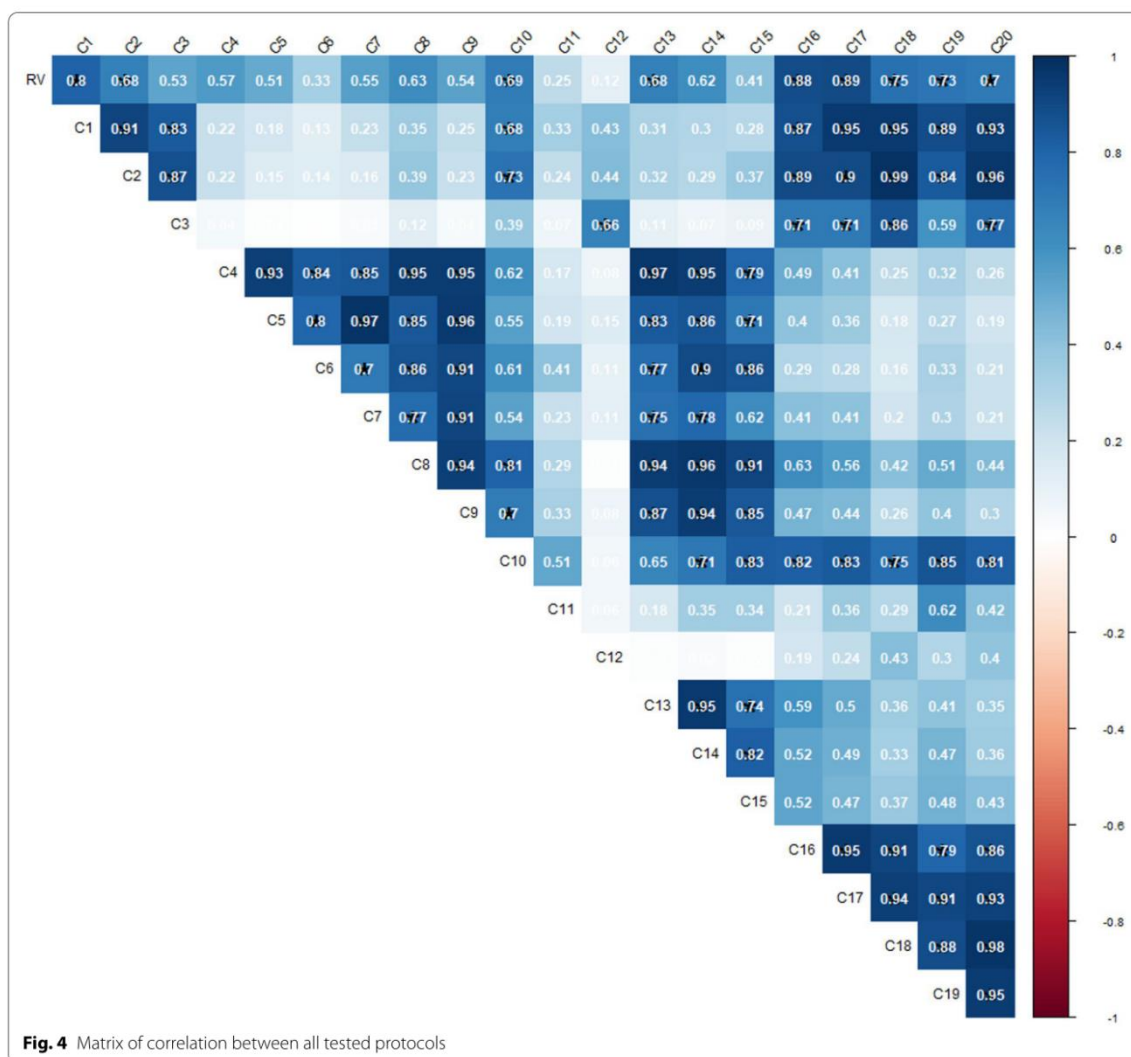


Fig. 4 Matrix of correlation between all tested protocols

showed significantly higher  $R^2$  than protocols without gelatinization and/or with neutralization (Fig. 5C). It is important to note that protocols without gelatinization step and with rinsing step showed similar  $R^2$  than model with gelatinization and with neutralization step (Fig. 5C).

Secondly, the interaction between gelatinization step and the incubation temperature also significantly impacted the estimation of IVDMD. In order to better understand the impact of this interaction, Fig. 5D showed that the incubation temperature did not impacted the  $R^2$  of the protocols when a gelatinization step was included. However, without gelatinization, the protocols with incubation temperature set up at 50 °C showed higher  $R^2$  than

protocols with incubation temperature set up at 40 °C (Fig. 5D).

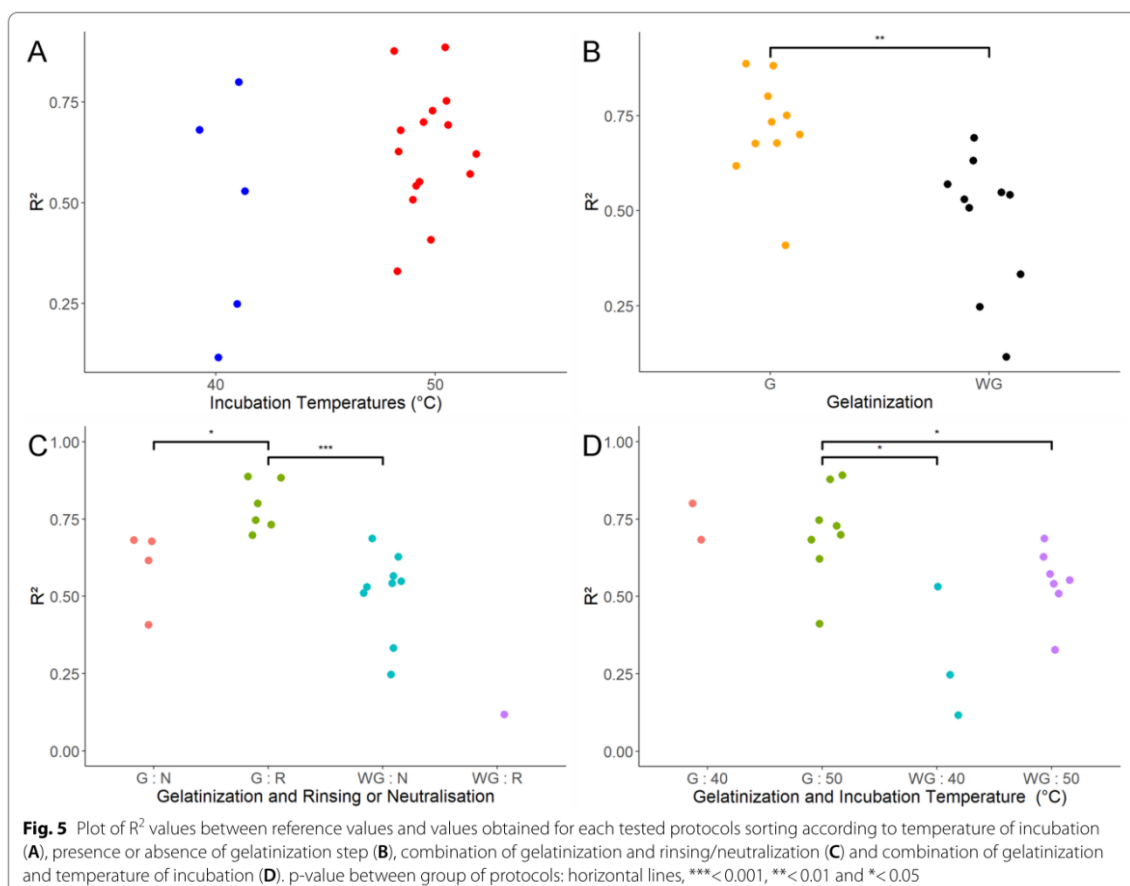
**Discussion**

Digestibility protocols have greatly evolved since the middle of the twentieth century. Protocols presented in the literature are very variable. There is no standard in these digestibility estimation protocols and the number of steps, the type or quantity of enzymes or even the incubation times can be very different. In particular, this can make it difficult to compare results from one study to another. Important evolution of these protocols lied in first time by the introduction of two successive steps

**Table 3** Multiple regression analyses with the tested model, selected parameters in the tested model, AIC criteria of the model and p-value of each selected parameters

Model	Step_out	Step_AIC	Anova_p.value	Anova_star
$Y_{mn} = \mu + Dm + Jr + Enn$	Gelatinisation + incubation:temperatures	- 13.28	Gelatinization = 4.48e-04 incubation:temperatures = 1.18e-01	Gelatinization = *** incubation:temperatures = NS
$Y_{mn} = \mu + Dm + Enn$	Gelatinisation	- 12.59	Gelatinisation = 7.33e-04	Gelatinization = ***
$Y_{lmnr} = \mu + Dm + Jr + Cl + Fn + Lnm + Mm + Nrl + Elmnr$	Gelatinization + incubation:temperatures + pepsin + rinsing:neutralization + gelatinisation:incubation:temperatures + gelatinisation:rinsing:neutralization + incubation:temperatures:pepsin	- 22.94	Gelatinization = 1.43e-06 incubation:temperatures = 3.17e-2 pepsin = 1.41e-1 rinsing:neutralization = 2.94e-1 gelatinisation:incubation:temperatures = 2.83e-3 gelatinisation:rinsing:neutralization = 1.22e-2 incubation:temperatures:pepsin = 2.08e-1	Gelatinization = *** incubation:temperatures = NS rinsing:neutralization = NS gelatinisation:incubation:temperatures = ** gelatinisation:rinsing:neutralization = * incubation:temperatures:pepsin = NS
$Y_{lmnr} = \mu + Dm + Jr + Lnm + Mm + Elmnr$	Gelatinization + incubation:temperatures + gelatinisation:incubation:temperatures + gelatinisation:rinsing:neutralization	- 22.25	Gelatinization = 3.63e-06 incubation:temperatures = 3.90e-2 gelatinisation:incubation:temperatures = 2.33e-2 gelatinisation:rinsing:neutralization = 5.39e-3	Gelatinization = *** incubation:temperatures = * gelatinisation:incubation:temperatures = * gelatinisation:rinsing:neutralization = **
$Y_{mn} = \mu + Dm + Lnm + Mm + Elmnr$	Gelatinization + gelatinisation:incubation:temperatures + gelatinisation:rinsing:neutralization	- 22.25	Gelatinization = 3.63e-06 gelatinisation:incubation:temperatures = 9.04e-3 gelatinisation:rinsing:neutralization = 5.39e-3	Gelatinization:*** gelatinisation:incubation:temperatures = ** gelatinisation:rinsing:neutralization = **





in the protocols [5, 14] and in second time by the standardization of steps [6, 8, 9, 15]. Some protocols were proposed with a supplemental  $\alpha$ -Amylase enzymatic step [16], or McDougall's solution and ruminal fluid (39 °C 48 h) followed by acid pepsin treatment (0.1 N 6.6 g L<sup>-1</sup> 39 °C 48 h [17]) or only one step of enzymatic hydrolysis by a cellulosic solution [18]. These different protocols gave digestibility values respectively correlated with *in vivo* digestibility to 0.25, 0.58 and 0.53. However, these correlation with *in vivo* digestibility data were always weaker than correlation obtained with Aufrère 1982 protocol [6]. This was largely described in the literature and coefficient of correlation between *in vitro* digestibility values and *in vivo* digestibility evaluation ranged from 0.9 and 0.6. For example this coefficient was of 0.91 in Aufrère [6], 0.54 in Barrière [15], 0.61 in Andrieu and in Dardenne [8, 9], 0.78 in Aufrère [11] and 0.73 Peyrat [12]. The Aufrère protocol is then considered as a robust and reliable protocol but it remains heavy and bulky to implement.

The *in vitro* digestibility protocol established by Aufrère [6, 10] is the reference one in digestibility studies of maize silage [19]. Moreover in France, combined with protein content, IVDMD values obtained with the Aufrère protocol are used to estimate UFL (Unité Fourrage Laitier) value with model M4 since 1995 [20] and since 2016 with model M4.2 slightly adapted from M4 model [21]. UFL value is essential for the registration process of maize silage varieties in French maize silage catalog [22]. However, the Aufrère protocol does not allow a highthroughput characterization of dry matter samples. Some attempts to adapt the Aufrère protocol to achieve a high characterization rate have been made. The use of Daisy technology have been performed [23]. The Daisy II method can be used on feeds to increase labor efficiency [24] but from our point of view, it still presents major drawbacks. Indeed, this technology always necessitates high quantity of dry matter samples and large volumes of enzymatic solutions. Moreover, the filter bags used in daisy technology can present variations in their porosity

depending on the batch used which can cause undigested particle leaks [25]. Furthermore, all the sample is bathed in the same solution and we can always fear interactions between sample and inhibitions on enzymatic activities related to a particular sample. We thus proposed herein, a protocol with smallest dry matter sampling (30 mg) than Aufrère protocol with 500 mg of DM [10].

We demonstrated that few protocols were highly correlated with LANO reference values. With this new format we avoid some problems like variable bag porosity or digestive samples interactions, and it's broadband, repeatable and comparable to Aufrère protocol. We have clearly underlined the importance of two major parameters in the implementation of these digestibility estimations.

First, we highlighted the need to perform a gelatinization step. This additional step was proposed by Aufrère between 1982 and 1983 [6, 7]. This gelatinization step allowed starch gelatinization i.e. the breaking down of intermolecular bonds of starch granules and more precisely of amylopectin the more crystalline part of starch. Gelatinization step thus allowed a better accessibility of starch molecules for subsequent hydrolysis.

The second important step we revealed is the rinsing step between acidic pretreatment and Onozuka enzymatic hydrolysis step. The combination of these two step (starch gelatinization and rinsing) was the best one to obtain values similar to the reference values. Strictly speaking, we should have retained protocol 16 or 17 as the best one. However, practical aspects allowing high-throughput analyzes also guided our choice. Thus a neutralization step was preferred to rinsing steps even if the results were a little less faithful to the references. This is why protocol 2 was chosen rather than protocol 16 or 17. Protocol 2 combined good statistical performances and presented a high level of practicality for its high-throughput implementation in the laboratory. This combination aimed reducing the arduousness and the time of manipulation while giving very reliable results. Therefore we retained the protocol 2 as the more suitable to easily and accurately measure dry matter digestibility.

## Conclusions

Protocol 2 retained in this study first proceeds to a pretreatment step of 30 mg of dry matter with 0.1 N HCl solution with 2 g L<sup>-1</sup> pepsin at 40 °C for 24 h. Afterwards a gelatinization step (80 °C for 30 min) is applied. Finally, after a neutralization step, an enzymatic hydrolysis step is carried out at 40 °C with an Onozuka R10 cellulase solution (1 mg mL<sup>-1</sup>) for 24 h (Fig. 1b).

This protocol is innovative on several points compared to the reference protocol of Aufrère and Doreau [7]: the reduction of the dry matter sampling necessary at the

start (30 mg versus 500 mg) as well as the neutralization step between the first and the second step, which reduces handling time and improves ease of handling (Fig. 1a, b). This protocol 2 is neither more nor less than the protocol developed by Aufrère and Doreau in 1983 [7] in which the dry matter sampling is reduced to 30 mg, the rinsing replaced by a neutralization step and the glass filtering crucibles replaced by tubes. This allows us to perform experiments with a very large number of samples and reduce volumes of enzymatic solution without hampering the accuracy of the IVDMD quantification.

This protocol is reliable and can be implemented in any laboratory without any specific equipment. It makes it possible to simultaneously characterize a large number of samples, with a small amount of dry matter, with low volumes of solution and without tedious rinsing and filtration steps.

## Methods

### Plant materials

Plants of maize hybrids were cultivated in open field trial in summer 2018. 80 genotypes were grown in two 7 m rows with 0.80 m between rows for 11.2 m<sup>2</sup> by genotypes and planting density of 90,000 plants/ha. At the silage stage, plants were harvested, dried in an oven (55 °C–72 h) and grind with a hammer mill (1 mm grid). From the 80 harvested samples (one sample per genotype), we selected 6 contrasting samples that cover the range of dry matter digestibility based on results obtained using protocol 1 (Table 2). This set of 6 samples has been used for the analyses carried out in this paper.

### Reference values for IVDMD estimation

Estimation of the IVDMD of the 6 selected samples was performed by the reference laboratory LANO (Laboratoire Agronomique de Normandie <http://www.lano.asso.fr/web/index.php>) following the initial reference protocol [6, 10]. Briefly, 50 mL of HCl 0.1 N solution with 2% of pepsin was applied on 500 mg of maize dry matter during 24 h at 40 °C. After that, samples were placed 30 min at 80 °C (gelatinization step). Rinsing was performed before adding 50 mL of enzymatic solution of Cellulase Onozuka («Onozuka R-10 from *Trichoderma viride*»; Serva; 10 mg ref 16,419.03) at 1 mg mL<sup>-1</sup> during 24 h at 40 °C. A final rinsing was then performed before 12 h drying at 103 °C.

### Estimation of IVDM using modified Aufrère protocol

We adapted the Aufrère protocol [10] to our lab conditions and to smaller dry matter sample quantity. This adapted protocol is called Protocol 1 (Table 2) for the rest of the article. Briefly, for this Protocol 1, 30 mg of maize dry matter powder were placed in 5 mL tubes



before adding 2 mL of HCl 0.1 N solution with 2% of pepsin during 24 h at 40 °C followed. Then, gelatinization step was carried out by placing the tubes during 30 min at 80 °C in a water bath. The tubes were cooled in ice before being centrifuged at room temperature 10 min at 5000 rpm. The supernatant was discarded. Rinsing was then performed by centrifuging twice with 4 mL of water (5000 rpm—10 min at room temperature) the obtained pellet. After the first rinse centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was rinsed a second time with 4 mL of water. Similarly, the supernatant obtained after the second rinse centrifugation was discarded. 4 mL of Enzymatic solution of Cellulase («Onozuka R-10 from *Trichoderma viride*»; Serva; 10 mg ref 16,419.03) at 1 mg L<sup>-1</sup> were then added to the pellet, vortexed and agitated during 24 h at 40 °C. The pellet recovered after centrifugation (5000 rpm—10 min at room temperature) was then frozen at -80 °C and lyophilized 48 h before final weighing.

#### Protocols establishment to estimate the impact of different parameters on IVDMD estimation

We tested several protocols to study the influence of 7 parameters on the quantification of dry matter digestibility (Table 2). These 7 tested parameters are as follows:

- presence (2 g L<sup>-1</sup>) or absence of pepsin in HCl solution (0.1 N)
- temperature of incubation (40 or 50 °C) during cellulosic hydrolysis
- presence (G: 30 min at 80 °C) or absence (WG) of gelatinization step
- washing/rinsing (R) or neutralization (N) step. In the case of washing/rinsing alternative, a succession of 3 centrifugation step (5000 rpm, 10 min at room temperature) was performed. The supernatants were discarded. Afterwards, 4 mL of cellulosic solution (concentration according to the protocol) at 4.6 pH were added to the pellet and vortexed. In the case of neutralization alternative, basic solution (90 µL of NaOH solution 2 N) was added in the tube and the tubes were then vortexed.
- presence (1.5 mL L<sup>-1</sup>) or absence of α-amyl glucosidase in cellulosic solution
- duration (24 or 72 h) of cellulosic solution incubation
- concentration (1 or 8 mg mL<sup>-1</sup>) of the cellulosic solution.

All these protocol variants led to the establishment of 21 protocols presented in Table 2. The six selected dry matter samples were digested using these 21 protocols with 3 replicates per protocol.

#### Statistical analyses

Means of IVDMD for each sample and for each protocol have been calculated. The repeatability of each protocol was estimated by the mean of the percentage of error (where error = standard deviation/mean) of each sample by protocol.

We analyzed the correlation between each protocol by matrix correlation [26]. Moreover, means of IVDMD values per sample of each protocol were correlated to IVDMD estimation from the LANO laboratory (references values). This allowed us, for each protocol, to obtain a determination coefficient (R<sup>2</sup>) and a slope ("a" coefficient from the equation Y = aX + b, where Y is IVDMD (references values) value and X is IVDMD measured with one of the 21 established protocols (Table 3). R<sup>2</sup> and slope are reliable indicators to discriminate protocols according to their similarity to the IVDMD reference values from the LANO Laboratory that used the original Aufrère (1982) protocol. The more similar the protocol are and the more the R<sup>2</sup> values are high and the slope closer to 1. We use the ComplexHeatmap package Rstudio to cluster and visualize the tested protocols according to their R<sup>2</sup> slope and repeatability values (Fig. 3).

Two multiple regressions analyses were performed using R package "stats" with the "step" functions to:

- analyze main effects of each parameter using the following model:

$$Y_{lmnopqr} = \mu + Cl + Dm + Fn + Go + Hp + Iq + Jr + Elmnopqr$$

- analyze interactions between parameters using the following model:

$$Y_{lmnopqr} = \mu + Cl * Dm * Fn * Go * Hp * Iq * Jr + Elmnopqr$$

where Y<sub>lmnopqr</sub> is the R<sup>2</sup> value of the pepsin concentration "l", the presence of the gelatinization step "m", the rinsing or neutralization modality "n", the cellulosic concentration "o", the amyloglucosidase concentration "p", the incubation times "q" and the incubation temperatures "r". Cl is the main effect of the pepsin concentration "l"; Dm is the main effect of the gelatinization step "m"; Fn is the main effect of the Rinsing or Neutralization "n"; Go is the main effect of the cellulosic concentration "o"; Hp is the main effect of the amyloglucosidase concentration "p"; Iq is the main effect of the incubation times "q"; Jr is the main effect of the incubation temperatures "r"; Elmnopqr is the random residual term.

Wilcoxon test were carried out using R package ggplot2 fonction `stat_summary` [27] to highlight significant differences between  $R^2$  values of protocols.

#### Abbreviations

IVDMD: In vitro dry matter digestibility; DM: Dry matter; UFL: Unité Fourrage Laitier.

#### Acknowledgements

Maize silage samples grinding was performed by Dominique Kermarrec INRAE—Unité Expérimentale sur les Ressources Génétiques Végétales en Conditions Océaniques.

#### Authors' contributions

VM and MR piloted the study and supervised the plant sampling; PLLM, MPJ, MR and VM sampled the maize, PLLM, SG and MPJ performed the biochemical analyses; PLLM and MR performed statistical analyses on the dataset; PLLM, MR and VM interpreted the results; PLLM, MR and VM wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

The IJPB benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). This work was financially supported by Pro-maïs and is part of the DECLIC project (<http://pro-mais.org/les-programmes-de-recherche-de-pro-mais>). Field trial was also carried out in the frame of DECLIC. This study was supported by the French Government Grant ANR-11-BTBR-0006 BIOMASS FOR THE FUTURE, managed by the French National Research Agency under an "Investments for the Future" program (Grant ANR-11-IDEX-0003-02).

#### Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Bat 2 - Route de St Cyr, 78000 Versailles, France. <sup>2</sup>Ecole Doctorale numéro 581: ABIES, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 19 av du Maine, 75732 Paris Cedex 15, France.

Received: 23 June 2021 Accepted: 31 July 2021

Published online: 11 August 2021

#### References

- Goffart A. Manuel de la culture et de l'ensilage des maïs et autres fourrages verts. 1877.
- Tilley JMA, Terry RA. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.* 1963;18:104–11.
- Van Soest PJ, Wine RH, Moore LA. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. 1966. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19670700081>. Accessed 24 Nov 2020.
- Marten GC, Barnes RF. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. IDRC, Ottawa, ON, CA; 1979. <https://hdl-bnc-idrc.dspacedirect.org/handle/10625/19412>. Accessed 5 May 2020.
- Jones DIH, Hayward MV. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *J Sci Food Agric.* 1975;26:711–8.
- Aufrère J. Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Ann Zootech.* 1982;31:111–30.
- Aufrère J, Michalet-Doreau B. In vivo digestibility and prediction of digestibility of some by-products. In: EEC Seminar. 1983.
- Andrieu J, Demarquilly C, Dardenne P, Barrière Y, Lila M, Maupetit P, et al. Composition and nutritive value of whole maize plants fed fresh to sheep. I: factors of variation. *Compos Nutr Value Whole Maize Plants Fed Fresh Sheep Factors Var.* 1993;42:221–49.
- Dardenne P, Andrieu J, Barrière Y, Biston R, Demarquilly C, Femenias N, et al. Composition and nutritive value of whole maize plants fed fresh to sheep. II. Prediction of the in vivo organic matter digestibility. *Ann Zootech.* 1993;42:251–70.
- Aufrère J, Baumont R, Delaby L, Peccatte JR, Andrieu J, Andrieu JP, et al. Prévision de la digestibilité des fourrages par la méthode pepsin-cellulase. Le point sur les équations proposées. *INRAE Prod Anim.* 2007;20:129–36.
- Aufrère J. Inra Productions Animales - Prévision de la digestibilité des fourrages. *INRA Prod Anim.* 2007;20:129–36.
- Peyrat J. Digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage chez les ruminants: conséquences sur l'évaluation de sa valeur nutritive. France: Université Blaise Pascal: Clermont-Ferrand II; 2014.
- Virlouvet L, El Hage F, Griveau Y, Jacquemot M-P, Gineau E, Baldy A, et al. Water deficit-responsive QTLs for cell wall degradability and composition in maize at silage stage. *Front Plant Sci.* 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00488/full>.
- Alexander RH, McGowan M. The routine determination of in vitro digestibility of organic matter in forages—an investigation of the problems associated with continuous large-scale operation. *Grass Forage Sci.* 1966;21:140–7.
- Barrière Y, Demarquilly C, Hebert Y, Dardenne P, Andrieu J, Maupetit P, et al. Influences de la variabilité génétique et environnementale sur la digestibilité in vitro ou in vivo du maïs fourrage. *Agronomie.* 1991;11:151–67.
- Lila M, Yves B, Rémi T. Mise au point et étude d'un test enzymatique de la digestibilité de fourrages pauvres ou riches en amidon. *Agronomie.* 1986;6:285–91.
- Damiran D, DelCurto T, Bohnert DW, Findholt SL. Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. *Anim Feed Sci Technol.* 2008;141:15–35.
- Kowalski ZM, Ludwin J, Górka P, Rinne M, Weisbjerg MR, Jagusiak W. The use of cellulase and filter bag technique to predict digestibility of forages. *Anim Feed Sci Technol.* 2014;198:49–56.
- Mabjeesh SJ, Cohen M, Arieli A. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *J Dairy Sci.* 2000;83:2289–94.
- Andrieu J. Prévision de la digestibilité et de la valeur énergétique du maïs fourrage à l'état frais. *INRA Prod Anim.* 1995;8:273–4.
- Peyrat J, Nozière P, Féraud A, Le Morvan A, Meslier E, Protin PV, et al. Digestibilité du maïs fourrage: équations et critères de prédiction. ARVALIS - Inst Végétal - INRA. 2016. <https://www.arvalis-infos.fr/de-nouve-les-references-pour-prevoir-la-valeur-alimentaire-de-l-ensilage-/view-23526-arvarticle.html>. Accessed 21 Dec 2018.
- VATE. Evaluation de la Valeur Agronomique Technologique et Environnementale (VATE) des nouvelles variétés à l'inscription au Catalogue Français. 2018.
- Tassone S, Fortina R, Peiretti PG. In vitro techniques using the Daisyll incubator for the assessment of digestibility: a review. *Animals.* 2020;10:775.
- Holden LA. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *J Dairy Sci.* 1999;82:1791–4.
- Adesogan AT. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisyll incubators. *Anim Feed Sci Technol.* 2005;119:333–44.
- Wei T, Simko V, Levy M, Xie Y, Jin Y, Zemla J, et al. Visualization of a correlation matrix. 2021. <https://github.com/taiyun/corrplot>. Accessed 26 May 2021.
- Wickham H, Chang W, Henry L, Lin Pedersen T, Takahashi K, Wilke C, et al. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. 2020.

- <https://ggplot2.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/ggplot2>. Accessed 26 May 2021.
28. Thurman RL, Wehnt EJ. Laboratory method for determining digestible nutrients. *Agron J*. 1955;47:302–3.
  29. Clark KW. The adaptation of an artificial rumen technique to the estimation of the gross digestible energy of forages. Theses Diss Available ProQuest. 1958;1–110.
  30. Donefer E, Niemann PJ, Crampton EW, Lloyd LE. Dry matter disappearance by enzyme and aqueous solutions to predict the nutritive value of forages. *J Dairy Sci*. 1963;46:965–70.
  31. Deinum B, Van Soest PJ. Prediction of forage digestibility from some laboratory procedures. *NJAS Wagening J Life Sci*. 1969;17:119–27.
  32. Jones DIH, Hayward MV. A cellulase digestion technique for predicting the dry matter digestibility of grasses. *J Sci Food Agric*. 1973;24:1419–26.
  33. Hartley RD, Jones EC, Fenlon JS. Prediction of the digestibility of forages by treatment of their cell walls with cellulolytic enzymes. *J Sci Food Agric*. 1974;25:947–54.
  34. McQueen R, Van Soest PJ. Fungal cellulase and hemicellulase prediction of forage digestibility. *J Dairy Sci*. 1975;58:1482–91.
  35. Adegbola AA, Paladines O. Prediction of the digestibility of the dry matter of tropical forages from their solubility in fungal cellulase solutions. *J Sci Food Agric*. 1977;28:775–85.
  36. Clark J, Beard J. Prediction of the digestibility of ruminant feeds from their solubility in enzyme solutions. *Anim Feed Sci Technol*. 1977;2:153–9.
  37. Dowman MG, Collins FC. The prediction of the digestibility of silages using cellulase. *J Sci Food Agric*. 1977;28:1071–4.
  38. Goto I, Minson DJ. Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsin-cellulase assay. *Anim Feed Sci Technol*. 1977;2:247–53.
  39. Roughan PG, Holland R. Predicting in-vivo digestibilities of herbage by exhaustive enzymic hydrolysis of cell walls. *J Sci Food Agric*. 1977;28:1057–64.
  40. Kellner RJ, Kirchgessner M. Estimation of forage digestibility by a cellulase method. *Z Für Tierphysiol Tierernähr Futtermittelkunde*. 1977;39:9–15.
  41. Kirchgessner M, Kellner RJ. Estimation of digestibility, metabolizable energy and net energy of forage by a cellulase method. *Livest Prod Sci*. 1978;5:373–7.
  42. McLeod MN, Minson DJ. The accuracy of the pepsin-cellulase technique for estimating the dry matter digestibility in vivo of grasses and legumes. *Anim Feed Sci Technol*. 1978;3:277–87.
  43. Adamson AH, Terry GR. The relationship between the in vivo digestibility of hay and its solubility in pepsin–hydrochloric acid and fungal cellulase solutions. *J Sci Food Agric*. 1980;31:854–6.
  44. Aufrere J, Michalet-Doreau B. Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Anim Feed Sci Technol*. 1988;20:203–18.
  45. De Boever JL, Cottyn BG, Andries JJ, Buysse FX, Vanacker JM. The use of a cellulase technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of forages. *Anim Feed Sci Technol*. 1988;19:247–60.
  46. Ferret A, Gasa J, Plaixats J, Casañas F, Bosch L, Nuez F. Prediction of voluntary intake and digestibility of maize silages given to sheep from morphological and chemical composition, in vitro digestibility or rumen degradation characteristics. *Anim Sci*. 1997;64:493–501.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)









## Chapitre 2 :

### **A robust and efficient automatic method to segment maize FASGA stained stem cross section images to accurately identify histological variation**

*Les travaux dans ce second chapitre de la thèse concernent le développement d'une nouvelle méthode de segmentation d'images de coupes transversales d'entrenœuds de maïs colorées au FASGA.*

*Nous avons pu voir dans l'introduction que l'automatisation de la segmentation (et les des quantifications qui sont inhérentes) d'une image de coupe transversale d'entrenœud de maïs reste compliquée. La coloration FASGA permet de faciliter l'identification de différents tissus plus ou moins lignifiés au sein de la coupe. Des méthodes (workflow) avaient été développées avant le début de ma thèse par différentes personnes au sein de l'équipe et (au-delà de l'équipe) pour identifier et caractériser différents tissus au sein d'une image de coupe d'entrenœud de maïs colorée au FASGA. En utilisant ces workflows, je n'obtenais pas entière satisfaction quant à la fidélité de la segmentation par rapport aux observations visuelles des coupes colorées et aussi quant à l'automatisation/répétabilité des workflows proposés. J'ai donc pris l'initiative de développer une nouvelle méthode de segmentation d'images de coupe transversale d'entrenœud de maïs colorées au FASGA. Ce nouveau workflow m'a permis de rendre compte plus finement et plus fidèlement des profils histologiques observés, notamment en identifiant 44 types de tissus au sein des coupes. Par ailleurs, le débit et la répétabilité des analyses d'images sont amplement améliorés puisqu'aucun besoin de paramétrisation n'est requis en entrée du workflow pour analyser les images. Ce niveau de segmentation tissulaire a été éprouvé par des expérimentations de digestions enzymatiques sur coupe, rendant bien compte de cette diversité tissulaire au sein d'une coupe.*

*Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique en cours de soumission dans le journal « Plants Methods », intitulé “ A robust and efficient automatic method to segment maize FASGA stained stem cross section images to accurately identify histological variation », et pour lequel je suis le « corresponding » auteur. C'est cet article qui est présenté dans le chapitre 2 de la thèse.*

*Mais avant de vous laisser découvrir ce chapitre 2, je vous propose de scanner les QRcodes et télécharger les fichiers pour découvrir une reconstitution 3D d'entrenœuds faite à partir de coupes successives au sein d'un entrenœud de deux lignées de maïs (F4 et F7), lignées que vous retrouverez dans le chapitre 4 de ma thèse.*



1           **A robust and efficient automatic method to segment maize FASGA stained**  
2           **stem cross section images to accurately identify histological variation**

3  
4

5 P-L. Lopez-Marnet<sup>1, 2\*</sup>, S. Guillaume<sup>1</sup>, V. Méchin<sup>1</sup> and M. Reymond<sup>1</sup>

6  
7

8 <sup>1</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78000,  
9 Versailles, France

10 <sup>2</sup>Ecole Doctorale numéro 581 : ABIES, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 19 av du  
11 Maine, 75732, PARIS CEDEX 15, France

12

13 **\*Corresponding author**

14

15 **Author email addresses:**

16 matthieu.reymond@inrae.fr

17 sophie.guillaume@inrae.fr

18 valerie.mechin@inrae.fr

19 paullouislopez@gmail.com

20

21 **Running Title:**

22 Automatic and subtle segmentation of 44 tissues in maize stem cross section images

23

24

25



### 1 **ABSTRACT**

2

3 **Background:** Grasses internodes are made of separated tissues such as bundles, rind and pith.  
4 Biochemical differences have been highlighted between rind and pith and link between tissue  
5 type and tissue digestibility has been reported. Histology of grasses stem was largely revisited  
6 recently taking advantages of the development of microscopy, computer and automatization by  
7 workflow development. However, the diversity and complexity of the histological profile  
8 complicates quantification. Accurate and automatized analyze of histological profile thus  
9 remains challenging.

10 **Results:** Herein, we present a workflow that automatically segment maize internode cross  
11 section images into 44 distinct tissues: 29 tissues in the rind, 10 tissues in the pith and 5 tissues  
12 in the bundles. This level of segmentation is achieved by combining both the FASGA staining,  
13 the Hue, Saturation and Value properties of each pixel and the location of each pixel in the  
14 cross section. This workflow is likewise able to highlight significant and subtle histological  
15 genotypic variations between maize internodes. The grain of precision provided by the  
16 workflow also makes it possible to demonstrate different levels of sensitivity to digestion by  
17 enzymatic cocktails of the tissues in the pith. At last, thanks to correlative approaches, this  
18 workflow is also able to pinpoint tissues in link with variation of biochemical properties.

19 **Conclusions:** The fidelity of this tool, its capacity to automatically identify variations of a large  
20 number of histological profiles among different genotypes pave the way for its use to identify  
21 genotypes of interest and to study the underlying genetic bases of variations in histological  
22 profiles in maize.

23

### 24 **KEYWORDS:**

25 Image analysis

26 Automatic workflow

27 Segmentation

28 Fasga stained cross section

29 Plant tissues

30 Quantitative histology

31 H, S and V dimensions

32 Digestibility

33 Maize

34

### 1 BACKGROUND

2 Histologically, temperate grasses internodes are made of separated tissues such as tissue  
3 bundle, rind and pith [1–6]. The localization of each tissue is well defined and 2 regions are  
4 generally physically identified: (i) the rind (outer region) which includes epidermis,  
5 sclerenchyma, mesophyll, bundle tissues and parenchyma and (ii) the pith (inner region) which  
6 includes parenchyma and bundle tissues [7–9,1,10]. Biochemical differences have been  
7 reported between rind and pith [8,3,2,10,11] and link between tissue type and tissue  
8 digestibility has also been reported [8,1,12,2]. In all these studies, the rind is described as  
9 having a higher cell wall density, lignin and *p*-coumaric acid contents and being less digestible  
10 than the pith [13–15,10]. Moreover, digestion of maize internode cross section shown variation  
11 in tissues digestibility in rind, pith and bundle [2,16].

12 Histology of maize stem was also largely revisited recently taking advantages of the  
13 development of microscopy, computer and automatization by workflow development. To  
14 analyze histological traits, a lot of strategies were developed using dark background with  
15 specific fluorescence filters [5,17], fluorescence on stem safranin stained sections [18], mass  
16 spectrometry imaging [19], X-ray microcomputed tomography [20–24], light background with  
17 flatbed document scanner [25], maïle staining [26,12], phloroglucinol staining [27,28], or  
18 FASGA (Fucsina, Alcian blue, Safranina, Glicerina and Aqua) staining [12,29–31].

19 These methods allowed to explore large sets of samples; however, the diversity and  
20 complexity of the histological profile complicates quantification. Event though, the use of  
21 spectral characterization in maize was deployed to study tissue organization [5], variation of  
22 histological profile over time [24] or biochemical composition estimated by mass spectrometry  
23 imaging on maize cross sections [19]. Moreover, histological parameters were used to explain  
24 phenotypes such as silage digestibility [12], stalk flexibility or facture resistance [22,23], cell  
25 wall lignification [18], bundle number and rind thickness [32] and the impact of reduction of  
26 water supply [30,31]. In some case, list of potential genes or QTL positions responsible for the  
27 variation of histological pattern were proposed [32,23,31].

28 All of these results have been obtained thanks to the development of quantification  
29 methods describing the histological profile of maize internodes in a more or less precise way.  
30 The quantification of an acquired image of maize internode cross section generally involves  
31 problems of segmentation precision and automation of procedures, among other things.

32 Among the different tissue types, bundles in the pith are rather easy to segment and to  
33 automatically quantified [24,25,33]. Density of bundles in the rind is increased and bundles  
34 are smaller than in the pith, making identification of these bundles less easy. The use of



1 computed tomography methods allows to accurately identify bundles in the rind [20–22]. The  
2 identification of the border between the rind and the pith is not straightforward and the  
3 segmentation between these two regions is often roughly carried out [25,33]. Staining  
4 facilitates the identification of the border between pith and rind. In addition, FASGA staining  
5 [34] allows the identification of lignified tissues in both regions. Indeed, this staining is  
6 composed of two dyes: Alcian blue (acidic, anionic dye) and Safranin O (basic, cationic dye  
7 stains). As lignins with their phenolic hydroxyl groups are acidic, Safranin O stains highly  
8 lignified tissues in red whereas the tissues not or poorly lignified are stained in blue by Alcian  
9 blue [34]. Using this staining, this allowed the segmentation of lignified and non-lignified  
10 tissues, especially in the parenchyma of the pith [12,29,4,33]. Legland et al. (2017)[33] used  
11 H, S and V (i.e. Hue, Saturation and Value) dimensions of each pixel from FASGA stained  
12 maize cross section images in a workflow to automatically segment the images into 4 regions:  
13 bundles, rind, lignified parenchyma of the pith and non-lignified parenchyma of the pith.

14 Accurate and automatized analyze of histological profile of maize internodes from  
15 stained cross section images remains challenging. This analysis precisely and automatically  
16 identifies the different types of tissues in each region: sclerenchyma, bundles, parenchyma in  
17 the rind, lignified and non-lignified parenchyma in the pith and sclerenchyma, sclerenchyma  
18 perivascular tissues, phloem, bundle parenchyma in the bundles. Herein, we present an  
19 ImageJ/Fiji plugin that segments fasga stained maize internode cross section images by  
20 sorting/classifying each pixel according to their H, S and V values and their position in the  
21 cross section image. We also show that the workflow precisely segments the cross section into  
22 different tissue types in an automatic and robust manner, and this segmentation reflects the  
23 wide variation of tissue types present in maize internode, having contrasting biochemical  
24 proprieties and ability to be easily digestible when subject to enzymatic attack. In addition, the  
25 workflow allows the identification of subtle variations in bundles, pith and rind present  
26 between cross sections images from different genotypes. This pave the way to the study of  
27 large series of samples and in particular to the description of the genetic determinism of  
28 anatomical variations in maize stem and the identification of histological parameters involved  
29 in the variation of biomass end uses such as digestibility of maize silage.

30

### 1 RESULTS

2

#### 3 **Description of the workflow that automatically segment maize internode cross section** 4 **images into 44 tissue types**

5 FASGA stained maize internode cross section images (Figure 1B) are converted in H,  
6 S and V dimensions and split into H, S and V images (Figure 1C, 1D and 1E, respectively).  
7 The pixels from image in Figure 1D are divided according to their S value: pixels with S values  
8 between 0.05 and 0.26, between 0.26 and 0.78 and between 0.78 and 1 are extracted in images  
9 presented in Figures 1F, 1G and 1H, respectively. Similarly, 3 ranges of V values (between  
10 0.42 and 0.65, between 0.66 and 0.93 and between 0.95 and 1) enables the extraction of 3  
11 images presented in Figures 1I, 1J and 1K. The ranges of variation defined for the S and V  
12 values of the pixels have been identified empirically and are identical regardless of the FASGA  
13 stained maize internode cross section image analyzed.

14 Filtering the pixels according to these ranges of S and V values enables the  
15 identification of 15 pixels types (the 6 pixels types according to the S and V values individually  
16 and 9 pixels types resulting from the combination of these S and V filters). These 15 pixels  
17 types are presented in Figures 1L and 1M. The pixel types thus obtained do not coincide with  
18 the desired segmentation resolution since a pixel type can correspond to different tissues  
19 localized either in the rind or in the pith or in the bundles. In order to remedy this inconsistency,  
20 the workflow makes it possible to allocate a pixel type previously defined in different tissue  
21 types. To do so, cross section regions (namely the rind, the pith and the bundles) are defined  
22 thanks to the use of masks from filtered image with S values between 0.05 and 0.26 (Figure  
23 1F). These masks enable the separation tissues in the bundles mask (Figure 1N), in the mask of  
24 dark rind (Figure 1P) and in the mask including both medullary and rind tissues (Figure 1O).  
25 Every pixels, whatever their H, S and V values, located within the dark rind mask (Figure P)  
26 are considered to belong to a Dark Rind Tissue (DRT) type or to an Epidermal Tissues type  
27 (ET). Pixels in this dark region have been segmented into 9 DRT and to 2 ET according to their  
28 S and V values (Figure 1Q, 1R and 1Z). Pixels, whatever their H, S and V values located in the  
29 bundle mask (Figure 1N) belong to a Bundle Tissue (BT) type. These pixels have been  
30 segmented into 5 BT types according to their S and V values (Figure 1Q, 1R and 1Z). Pixels  
31 located in the mask presented in Figure 1O are located either in Medullary Tissues (MT) or in  
32 Rind Tissue considered as Light (LRT). Pixels in this mask have been segmented into 10 LRT  
33 and 10 MT type according to their S and V values (Figure 1Q, 1R and 1Z). Thus, Combining  
34 the different pixel types presented in Figure 1L and the localization of the pixels in the cross



1 section image (Figures 1N, 1O and 1P) allowed the segmentation of the image into 36 tissue  
2 types (Figure 1Q, 1R and 1Z).

3 In the end, the tissues of the different regions of the section are grouped together by the  
4 workflow according to two different approaches: (i) according to the tissue belonging to  
5 regions of the cross section defined according to the regions defined in Figures 1N, 1O and 1P  
6 by distinguishing the tissue types allocated to these regions (Figure 1S) or (ii) by using the  
7 grouping of the tissues of the section as presented in Legland et al, 2017, with lignified  
8 medullary tissue gathering MT1 and MT4 segmented tissues and low lignified medullary tissue  
9 gathering MT2 and MT5 tissues (Figure 1T).

10 On the medullary tissues MT1, MT2, MT4 and MT5, the supplemental use of filter  
11 values on the H dimension extracted image (Figure 1C), also allows a more defined  
12 segmentation of these tissue types (Figure 1U and 1V). For the pixels located in lignified  
13 medullary tissues (MT1 and MT4), pixels bearing a H values from 0.005 and 0.09 form the  
14 tissue types MT1a and MT4a and the others form the tissues types MT1b and MT4b (Figure  
15 1X and 1Z). Similarly, for the pixels located in poorly lignified medullary tissues (MT2 and  
16 MT5), pixels bearing H values between 0.51 and 0.91 form the tissue types MT2a and MT5b  
17 whereas the others pixels form the MT2b and MT5b tissue types (Figure 1Y and 1Z). In the  
18 end, the developed workflow allows the identification of 48 tissue types in FASGA stained  
19 maize internode cross section (Figure 1Z).

20

### 21 **Cross section digestion and segmented tissue types**

22 Two highly contrasting maize internode cross sections (Figure 2A and 2B) were chosen,  
23 with a section from a hybrid (Figure 2A) and a section from an inbred line (Figure 2B). The  
24 hybrid section exhibits a high bundle density in the rind compared to the cross section from the  
25 inbred line (Figure 2A, 2B, 2C and 2D). In addition, the lignified medullary parenchyma  
26 (stained in red with FASGA) of the inbred line is more colored than that of the hybrid (Figure  
27 2A, 2B, 2C and 2D), reflecting more lignified walls in this tissue in the inbred line. The  
28 intensity of the poorly lignified parenchyma (stained in blue with FASGA around the pith) is  
29 more intense in the inbred line than in the hybrid. The workflow was used to segment the  
30 different tissues present within these two internode cross sections stained with FASGA. This  
31 made it possible to highlight differences between the histological profiles of the two sections:  
32 within the rind, the DRT6 tissue colored in orange (Figure 1Z) is proportionally more present  
33 in the rind of the inbred line than in that of the hybrid (Figures 2E, 2F, 2G and 2H). TRD8 and  
34 TRD9 tissues which underline the presence of bundles in the rind are more present in the rind

1 of the hybrid than in that of the inbred line (Figures 2E, 2F, 2G and 2H). Within the pith, the  
2 lignified medullary tissues (MT1a, MT1b, MT4a and MT4b) are more present in the pith of the  
3 inbred line compared to one of the hybrids (Figures 2E, 2F, 2G and 2H). Note that MT1a and  
4 MT4a tissues are almost non-existent in the cross section of the hybrid (Figure 2E and 2F). It  
5 is found that the tissues that make up the pith of the hybrid are not very lignified compared to  
6 those of the inbred line.

7 The impact of 0.1M NaOH treatment for one hour resulted in wall modifications  
8 reflected by post-treatment FASGA color modifications. Notably, the lignified medullary  
9 tissues turn blue in both the hybrid and the inbred line (Figure 2I, 2J, 2K and 2L). The images  
10 of sections treated with NaOH and stained with FASGA were analyzed with the workflow and  
11 the output of this analysis clearly underlines a bluing of the tissues in the pith with in particular  
12 a predominance of the appearance of tissue type MT2b and MT5b in the inbred line (Figure  
13 2M and 2N) and especially in the hybrid (Figure 2O and 2P).

14 Digestion on a non NaOH treated cross section (Figure 2Q and 2R) for one hour also  
15 underlines differences in the behavior of the tissues within a section but also differences  
16 between the hybrid (Figure 2Q) and the inbred line (Figure 2R). In the inbred line (Figure 2R),  
17 the blue staining with FASGA after enzymatic treatment shows a reduced intensity of blue for  
18 the lowly lignified pith tissues at the periphery of the pith (MT2b, MT5b, Figure 2H and Figure  
19 1Z). In the hybrid, these lowly lignified pith tissues were digested (Figure 2Q) while the MT2a  
20 and MT5a tissues located mainly in the center of the parenchyma in the hybrid were not fully  
21 digested during the enzymatic treatment.

22 Selected cross sections were also subjected to 0.1M NaOH treatment followed by  
23 enzymatic digestion. Again, differences between tissues in a cross section and between cross  
24 sections were underlined: in the inbred line, the poorly lignified MT2b and MT5b tissues at the  
25 periphery of the pith were fully digested (Figure 2H, 2N and 2T). The initially lignified tissues  
26 (MT1b and MT4b) turned blue as during the NaOH treatment without enzymatic digestion, but  
27 also had a reduced blue intensity, underlining a partial digestibility of these tissues (Figure 2F,  
28 2P, 2S, 2H, 2N and 2T). The initially lignified MT1a and MT4a medullary tissues turned blue  
29 as during the NaOH treatment alone, but showed no signs of digestibility (Figure 2H, 2N and  
30 2T). In the hybrid, the NaOH treatment followed by an enzymatic digestion resulted in a more  
31 substantial bluing over the entire surface of the section with a high proportion of medullary  
32 tissue digested at the periphery and in the center (Figure 2I, 2K and 2S), corroborating as for  
33 the inbred line with a strong presence MT2b and MT5b tissues (Figures 2O and 2P).

1            Segmentation of these treated and untreated cross sections has been carried out using  
2 the proposed workflow without further parametrizations, allowing us to automatically highlight  
3 histological differences between the selected hybrid and inbred line but also between  
4 treatments.

5

### 6 **The workflow is able to highlight significant and subtle histological genotypic variations** 7 **between maize internodes**

8            Nowadays, cultivated maize are mostly hybrids, which were selected by crossing  
9 selected inbred lines. A relevant histological characterization tool for breeders must take into  
10 account the differences between hybrids but also between inbred lines in order to be able to  
11 offer the desired hybrids and parents. FASGA staining on inbred lines can present ranges of  
12 histological profile different from those of the hybrids (Figure 3). The internode sections of  
13 maize inbred lines stained with FAGSA (Figure 3A) show more intense contrast staining in the  
14 pith than in the hybrids (Figure 3B). There are also variations in histological profiles within the  
15 lines (Figure 3A) with very contrasting thicknesses of rind and tissue compositions of rind and  
16 pith. This variation in inbred lines has already been reported in the literature [30]. The  
17 workflow is able to highlight all of these differences faithfully and exhaustively (Figure 3C).  
18 In hybrids, sections stained with FASGA showed more subtle variations in histological  
19 profiles. Nevertheless, the workflow is also capable of identifying variations in tissue type  
20 between these hybrid sections (Figure 3D).

21            The workflow was also used to account for the histological differences between two  
22 maize flint inbred lines F4 and F7. It has been reported in the literature that F4 presented a very  
23 poorly lignified pith [35,12,36,30]. This result is again confirmed in our study (Figure 4A),  
24 with F4 showing a pith stained blue with FASGA. Conversely, the F7 line presented a  
25 histological profile more typical of a maize inbred line, with a predominantly red parenchyma  
26 in the pith and with the tissues at the periphery of the pith stained in blue (Figure 4B). Again,  
27 the use of the workflow captures these obvious differences at the cross section level (Figures  
28 4C and 4D). The quantification of the area of the different tissue types in the workflow  
29 clearly indicates that the F7 line had significantly more MT1a, MT4a, MT1b and MT4b tissues  
30 in its pith (Figure 4E and 4F) while the F4 line had significantly more MT2b and MT5b (Figure  
31 4H). On the other hand, the workflow indicates that the F7 line has more MT5a tissues (tissue  
32 stained blue by FASGA) than the F4 line (Figure 4G). This suggests that the pith of the F4 line  
33 is overwhelmingly composed of a non-lignified parenchyma that is very easily degradable.

1           The workflow is also able to highlight the differences in the presence of different tissues  
2 within the bundles, these differences being very difficult to identify with the naked eye. The  
3 workflow demonstrated that the F7 line has significantly more BT1 and BT4 tissues than the  
4 F4 line (Figure 4M). BT1 and BT4 tissues are localized at the sclerenchyma poles of the  
5 bundles with BT1 surrounding and also connecting the meta-xylem bundles forming the xylem  
6 fiber (Figure 4I, 4J, 4K and 4L). BT1 and BT4 tissues are therefore strongly lignified. In  
7 contrast, the F4 line possessed significantly more BT2 and BT5 tissues than the F7 line (Figure  
8 4M). BT2 is the most extensive tissue in the bundles and represents the bundle parenchyma  
9 which sometimes extends over the first parenchymal cell layer surrounding the bundle (Figure  
10 4I, 4J, 4K and 4L). Finally, BT5 represents the phloem of bundles. BT2 and BT5 are therefore  
11 poorly lignified tissues (Figure 4I, 4J, 4K, and 4L). F4 therefore has bundles composed more  
12 predominantly of easily degradable tissues than the F7 line.

13           Along with the rind, the epidermis of F7 has significantly more ET1 tissue (Figure 4N,  
14 4O, 4P, 4Q and 4T). Remarkably, the workflow was also able to point out that F7 had more  
15 DRT8 and DRT9 tissue types (Figure 4R, 4R and 4U). These two tissues are included in the  
16 dark rind region and specifically represent sclerenchyma of bundles located in the rind. Thus,  
17 the F7 line has more sclerenchymatous bundles in the rind and in the pith. The high level of  
18 degradability of F4 may come from the fact that it has a parenchyma in the pith that is poorly  
19 lignified (as reported in [12,36,30]) but the fact that its bundles are less sclerenchymatous can  
20 also support strong degradability of F4. It is essential to reach this level of segmentation of the  
21 cross section images in order to be able to demonstrate these histological differences. The  
22 proposed workflow is capable of achieving this level of precision.

23

### 24 **Tissues segmentation and variation of biochemical properties**

25           We used the workflow to test its ability to identify tissue types in relation to biochemical  
26 properties at the level of the whole plant. Note that at the silage stage, the stem represents about  
27 half the weight of the whole plant without ear and it has been shown that the cell wall  
28 digestibility of the whole plant is significantly correlated with that of the stem [37,31]. A  
29 population of 42 images of internode cross sections stained with FASGA originating from lines  
30 resulting from a cross between F4 and F7 (Figure 4) were selected for this study. An example  
31 of a section is shown in Figure 5. The proposed workflow was used to segment (Figure 5B) the  
32 different tissues of the cross section image (Figure 5A). Furthermore, the pixels of each of these  
33 images have been classified according to their H, S and V values (with the values of H, S and  
34 V divided into 10 uniform classes each, which resulted in 1000 classes of pixels). The number

1 of pixels in each class was obtained per image. At the level of the whole plant, the biomass  
2 (without the ears) was collected and analyzed to quantify the lignin and *para*-coumaric acid  
3 contents as well as the cell wall digestibility (see methods). Correlation coefficients between  
4 the percentage of pixels in the sections for each of the classes of pixels with the biochemical  
5 characters were determined. This approach then allowed us to construct an image of the section  
6 by coding each pixel with the value of these correlation coefficients which is assigned to it.

7 Figure 5C shows the distribution in the image of pixel-scale correlations with cell wall  
8 digestibility. This distribution clearly underlines that the variation in the presence of certain  
9 tissues is linked to cell wall digestibility. In particular, in the pith, the tissues positively  
10 correlated with parietal digestibility (in green) are the tissues stained in blue with FASGA  
11 (Figure 5A) and located in the peripheral region of the pith and around the bundles. These  
12 regions correspond to the MT2b and MT5b tissues segmented by the workflow (Figure 5B).  
13 Conversely, the tissues stained in red with FASGA in the pith (Figure 5A) are negatively  
14 correlated with the cell wall digestibility (represented in red in Figure 5C) and correspond to  
15 the tissues MT1a, MT1b, MT4a and MT4b. This corroborates with the results presented in  
16 Figure 2, for an enzymatic digestion directly applied to the cross section and it validates the  
17 approach used. At the level of the rind, the epidermis and the LRTs are negatively correlated  
18 with the digestibility of the cell wall (Figures 5B and 5C). The DRTs in this section are mainly  
19 blue and remain non-significantly involved in cell wall digestibility.

20 Figure 5D shows the distribution in the image of the pixel-scale correlations with the  
21 lignin content in the cell wall. In the pith, the tissues mostly positively correlated with lignin  
22 content (represented in green) are MT1a, MT1b, MT4a and MT4b and those least correlated  
23 are MT2b and MT5b. In the rind, the tissues of the epidermis are strongly positively correlated  
24 with lignin content.

25 Figure 5E shows the distribution in the image of the pixel-scale correlations with the  
26 *para*-coumaric acid content in the cell wall. Overall, the correlations are along the same lines  
27 as those observed for lignin content. Notable differences are nevertheless to be mentioned: The  
28 positive correlation (in green on Figure 5E) of the content of *para*-coumaric acid with the  
29 tissues MT1a MT1b, MT4a and MT4b are less strong than in the case of the lignin content. In  
30 contrast, within the rind, the tissues that make up the LRT are more strongly positively  
31 correlated than within the pith.

32  
33

### 1 DISCUSSION

2

#### 3 **A faithful and automatic workflow**

4         The internode of maize is made up of different tissue types [7]. These tissues are  
5 precisely distributed in different regions of the internode. So, there are tissues in and around  
6 the bundles that are distributed loosely in the medullary region and more densely in the rind  
7 region. The medullary region is mainly comprised of parenchyma [2]. The FASGA staining  
8 highlights parenchyma colored in red, signing lignified cell walls while some parenchyma are  
9 colored blue, signing low lignified parenchyma in maize [12,29] and in sorghum [4]. In  
10 particular, this staining makes it possible to highlight in maize lowly lignified cell walls of the  
11 parenchyma located on the periphery of the parenchyma and near the rind and also sometimes  
12 the cell walls around the bundles [29,6]. These poorly lignified regions coincide with the easily  
13 enzymatically digestible regions [2]. In the rind, beyond the presence of bundles, parenchyma  
14 (lignified or poorly lignified revealed by different types of staining including FASGA) and  
15 sclerenchyma are present. The rind is surrounded by cell layers that make up the epidermis.  
16 Different cross section image analysis workflows allow to distinguish the presence of the  
17 different tissue types described above. Briefly, on freshly harvested and manually truncated  
18 internodes, Heckwolf et al, (2015) [25] offers a workflow that roughly quantifies the thickness  
19 of the rind as well as the presence (number and area) of bundles in the pith. The rind is delimited  
20 by considering a visual difference in texture between the outer and inner part of the cross  
21 section. Zhang et al, (2013) [29] workflow uses for the first time FASGA stained cross section  
22 images and accounts for variation in lignification in different tissue types (between rind and  
23 pith but also within the pith). Du et al, (2016)[20] and Zhang et al, (2020)[24] proposed to  
24 segment an internode cross section using micro-computed tomography. These authors focused  
25 mainly on the bundles by quantifying parameters relating to their number, area and geometry.  
26 Remarkably, Zhang et al, (2020) [24] also proposed to segment precisely the cross section into  
27 an inner zone (pith), a periphery zone (rind) and an epidermis zone. FASGA staining has also  
28 made it possible to segment maize internode cross section images [33,38] or sorghum images  
29 [4]. This allows in particular to roughly delimit the pith of the rind and to offer workflows that  
30 automatically separate lignified medullary tissues from poorly lignified medullary tissues.  
31 Segmentation using the presented workflow herein makes it possible to separate 44 tissue types  
32 within a maize internode cross section by allocating them to different regions of the cross  
33 section (epidermis, dark rind, light rind, lignified medullary, low lignified medullary tissues  
34 and bundles). This exhaustive segmentation is the result of a characterization of the pixels



1 according to their H, S and V values and their location in the cross section. Corcel et al,  
2 (2017)[17] notably report multispectral characteristics specific to each tissue type in maize  
3 internode cross section. The proposed workflow faithfully reflects the tissue diversity present  
4 in maize internode. Furthermore, this workflow reaches a satisfactory level of precision for  
5 separating different regions of the cross section as proposed by Zhang et al (2020) [24]. It  
6 points in particular to different cell types in these different regions, which is an improvement  
7 compared to the workflow proposed by Legland et al. (2017)[33] and brings a great level of  
8 precision to tissue identification within each region. Tomography remains the technique of  
9 choice for individualizing bundles in the rind [20], but the proposed workflow still allows the  
10 identification of many different tissue types in this region. The important advantage to note  
11 with the proposed workflow is that it is completely automatable and does not require any  
12 parameterization for all the cross section images. This makes it possible to avoid workflow  
13 quantification differences due to a parameterization of each image, which is not the case with  
14 Perrier et al, (2017)[4] or in Legland et al, (2017)[33].

15 In conclusion, the developed workflow enables users to efficiently analyze fasga  
16 stained maize internode cross section images in an automated manner (i.e. without manual  
17 intervention/or parameter tuning), providing quantitative plant scientists with a powerful and  
18 precise analytical tool.

19

### 20 **An exhaustive segmentation which faithfully reflects variations in tissue type**

21 Enzymatic attack on sections of maize internodes not treated with 0.1M NaOH digests  
22 non-lignified pith tissue, especially on the periphery of the pith, around the bundles and the  
23 phloem in the bundles. Similar observations have already been reported using rumen juice to  
24 digest sections of maize internodes [39,8,40,41,13,2,16]. The surfaces of the digested section  
25 coincide with the presence of poorly lignified tissues colored blue by FASGA and segmented  
26 precisely by the proposed workflow (MT2b, MT5b, BT2 and BT5) emphasizing the fact that  
27 the segmentation of the workflow is relevant. In particular, we note the presence of medullary  
28 tissues that are not very lignified (colored blue with FASGA) but which remain poorly digested  
29 during the enzymatic attack. These tissues are identified and segmented by the workflow  
30 (MT2a and MT5a). In addition, the use of an NaOH treatment made it possible to break the  
31 ester bonds and thus released the esterified ferulic and diferulic acids (involved in the bonds  
32 between lignin and hemicellulose or between hemicelluloses chains; [42–47]) and the esterified  
33 *para*-coumaric acids (mainly present in the cell wall of grasses;[47,48]). These modifications  
34 caused a relaxation of the parietal mesh and facilitate the accessibility of enzymes to the wall



1 [14,41]. The 0.1M NaOH treatment increased the surface area of MT2b and MT5b tissues  
2 within the pith, corroborating with the increase in digestibility after this treatment. This  
3 indicates that the FASGA staining highlighted the wall modifications generated by the NaOH  
4 treatment and that the workflow is sensitive to identify these modifications. Taken together,  
5 these results underscored that the differences in segmented tissue within the pith reflect real  
6 variation in tissue type.

7 In conclusion, the fine and precise segmentation accounts for property variation  
8 between tissue types. Some of the properties are evidenced with the variation in the ease of  
9 being enzymatically digested. The grain of precision provided by the workflow translates a  
10 biological reality.

11 Over all and again, the presented workflow allowed to faithfully and automatically  
12 segmented FASGA stained maize internode cross section from hybrids and lines, underlying  
13 the fact that this analytical tool is therefore efficient and ideal for its use in selection and  
14 genetics as in several studies [32,23,31]. Indeed, using this workflow allowed us to pinpoint  
15 obvious variation between histological profiles of F4 and F7 previously reported (Barrière et  
16 al., 2017) but it also allowed us to highlight more subtle variations such as the presence of more  
17 sclerenchymatous tissues of F7 bundles compared to the bundles of F4.

18

### 19 **The workflow is able to pinpoint tissues in link with variation of biochemical properties**

20 Using the segmentation at the internode level to identify which tissues are positively or  
21 negatively correlated to biochemical characteristics at the whole plant level shed light on tissue  
22 type's specificities. Overall, the fact that correlations with lignin content was the opposite of  
23 that observed for digestibility underlines the negative correlation between lignin content and  
24 cell wall digestibility in the data set used ( $r = -0.63$ ; not shown). This negative correlation is  
25 often reported in the literature [49,50,35,12,30]. More interestingly, it has been reported that  
26 the *para*-coumaric acid content is higher in the rind than in the pith [15,51,52]. Our results also  
27 suggest a stronger *p*-coumaroylation of the tissues of the rind than those of the pith. Note that  
28 the tissues positively correlated to the lignin and *para*-coumaric acid contents (MT1a, MT1b,  
29 MT4a, MT4b, LRT2 and LRT4) correspond to the tissues that have been predominantly  
30 impacted by the NaOH treatment of the cross sections. NaOH treatment is commonly used to  
31 break ester links in cell wall polymers. Hence, with this treatment, lignin chains are detached  
32 from hemicellulosic chains and *para*-coumaric are released. This support the pertinence of the  
33 correlative approach used and that biochemical characteristics at the whole plant level are



1 supported by histological patterns at the internode level. Histological traits highlighted by the  
2 presented workflow can be proposed as selection targets to improve maize digestibility.

3

### 4 **CONCLUSIONS**

5         Among the set of workflows developed to characterize histological profiles of maize  
6 internodes the workflow proposed herein provides a precise level of segmentation within the  
7 entire section by segmenting 44 tissue types including: 29 tissues in the rind, 10 tissues in the  
8 pith and 5 tissues in the bundles. This level of segmentation is achieved by combining both the  
9 FASGA staining, the H, S and V properties of each pixel and the location of each pixel in the  
10 cross section. This level of segmentation reflects differences in the cell wall properties of each  
11 tissue. In particular, the variation in the ability to be easily digested is accounted for by the  
12 segmentation of tissues in the pith. The fidelity of this tool, its capacity to automatically identify  
13 variations of a large number of histological profiles among different genotypes pave the way  
14 for its use to identify genotypes of interest and to study the underlying genetic bases of  
15 variations in histological profiles in maize.

16

### 1 METHODS

2

#### 3 Plant materials

4 Analyzed maize internodes below the main ear were harvested from different field trials and  
5 on different lines at silage stage:

6 Internodes from a set of inbred lines were cultivated in an open field trial during  
7 summer 2020 at Versailles (France). Among the inbred lines, the 2 flint lines F4 and F7 as well  
8 as a set of inbred lines derived from a cross between these two inbred lines (obtained following  
9 a single seed descent scheme during 7 generations) were cultivated in this field trial. Lines were  
10 grown in two 3m rows with 0.50m between rows leading to a planting density of 130,000  
11 plants.ha<sup>-1</sup>. At silage stage, (i) two internodes under the main ear from two plants of a row were  
12 cut and stored in ethanol 70% for further histological analyses, (ii) three plants were harvested  
13 without cob, chopped and dried in an oven (55°C – 72h) and grind with a hammer mill (1mm  
14 grid) for further biochemical analyses.

15 Internodes from 6 hybrids were harvested from plants cultivated in open field trials in  
16 summer 2018 and 2019 at Hédé and Villampuy respectively (France) in two 7m rows with  
17 0.80m between rows for 11.2m<sup>2</sup> per hybrid leading to a plant density of 90,000 plants.ha<sup>-1</sup>. At  
18 silage stage, internodes below the main ear from two plants were cut and stored in ethanol 70%  
19 for further histological analyses.

20

#### 21 Cross section staining and image acquisition

22 Similarly of what is described in Legland et al, (2017)[33], internode cross section of  
23 150µm was cut at one centimeter under the upper node with a microtome [53] and stained with  
24 FASGA solution (for more details of the staining protocol, see Legland et al., (2017)[33] or  
25 El Hage et al., (2018)[30] ). Briefly, the cross sections were soaked in FASGA solution diluted  
26 in distilled water (1:8, v/v) during 24 h under agitation and then rinsed with distilled water  
27 during 24 h under agitation. Images with resolution of 5.17µm per pixel of stained stem cross-  
28 section were acquired (an example of obtained image is presented in Figure 1A) using the same  
29 procedure as the one described in Legland et al., (2017) [33] (slide scanner piloted by the  
30 Metafer scanning, imaging platform (MetaSystems GmbH, Altlusheim, Germany)).

31

#### 32 Image segmentation

33 The different steps of the workflow are described in the result section. A multiplication  
34 by 2 of RGB pixel values and a Gaussian smoothing was applied to increased contrast and

1 reduce acquisition noise, respectively (Figure 1B). The images obtained were transformed from  
2 Red, Green and Blue (RGB) channels to H, S and V dimensions using a color transform  
3 workflow [54]. Three images were extracted according to their H, S and V values (Figure 1C,  
4 1D and 1E). 3 ranges of S ([0.05:0.26]; [0.26:0.78]; [0.78:1]) and V ([0.42:0.65]; [0.66:0.93];  
5 [0.95:1]) values were empirically defined in order to better segment image using the following  
6 steps. Images with pixels S or V values included in each range mentioned above were extracted  
7 (Figure 1F, 1G and 1H for the 3 ranges of S values and 1I, 1J and 1K for the 3 ranges of V  
8 values). Combining pixels from these different filters allowed the identification of 15 pixels  
9 types (the 6 pixels types according to the S and V values individually and 9 pixels types  
10 resulting from the combination of these S and V filters; Figure 1L and 1M). In order to segment  
11 the images at the level of tissue types, masks identifying cross section regions (the rind; bundles  
12 and the pith including partially the rind) were define using filtered pixels with S values between  
13 0.05 and 0.26 (Figure 1N, 1O and 1P for the 3 masks). Combining the different pixel types  
14 with their position in a mask region lead to the identification of 36 tissue types (Figure 1Q and  
15 1R). On the tissues belonging to the pith masks, the use of filter values on the H dimension  
16 extracted image (Figure 1C), also allows a more defined segmentation of these tissue types  
17 (Figure 1U and 1V). At the end, 44 tissue types are segmented from a FASGA stained cross  
18 section image using this workflow. H, S and V values used to filter the images and to produce  
19 masks do not depend on the analyzed image allowing automatization of the workflow.  
20 The automatic segmentation imaging workflow described above was developed using the  
21 ImageJ/Fiji platform [55], using H, S and Vsegmentation [54]. The whole workflow will be  
22 freely downloadable (delivered in proof version) and easily implementable as an ImageJ/Fiji  
23 plugin.

24

### 25 **Enzymatic digestion of internode cross sections**

26 Ten successive internode cross sections of 8 selected genotypes (4 hybrids and 4 inbred lines)  
27 were used to test two different digestion procedures followed by FASGA staining in order to  
28 use the developed workflow. Only images from one hybrid and one inbred line are presented  
29 in the result section. The first digestion procedure is the application of 3 mL of a cellulase  
30 solution 1g/L (« Onozuka R-10 from *Trichoderma viride* »; Serva; 10mg ref 16419.03) at 40°C  
31 on previously water rinsed cross sections (H<sub>2</sub>O during 3h at room temperature). The second  
32 digestion procedure is the application of the cellulase solution mentioned above 1g/L 3mL at  
33 40°C on previously NaOH (0.1M) treated cross sections during 1h and rinsed (H<sub>2</sub>O during 3h

1 at room temperature). NaOH (0.1M) treated and rinsed (H<sub>2</sub>O during 3h) at room temperature  
2 cross sections were also FASGA stained and analyzed using the workflow.

### 4 **Biochemical analyses**

5 Biochemical cell wall analyses were performed on of 42 whole plant (without cob) grinded  
6 samples from the inbreed lines derived from the cross between F4 and F7 lines including F4  
7 and F7 lines themselves (see section plant materials). These samples were characterized for  
8 their: (1) *In vitro* cell wall digestibility (IVCWRD) as described on dry matter samples in  
9 Lopez-Marnet et al., (2021) and adapted here on cell wall residues. Briefly an acidic  
10 pretreatment was firstly applied (2g.L<sup>-1</sup> pepsin in HCl solution 0.1N, 24h at 40°C) and  
11 followed by a neutralization step before an enzymatic digestion (« Onozuka R-10 from  
12 *Trichoderma viride* »; Serva; 10mg ref 16419.03 at 1mg.L<sup>-1</sup> 24h at 40°C) ; (2) esterified PCA  
13 content was obtained by mild alkaline hydrolysis [56,57]; (3) lignin content in the cell wall was  
14 estimated by lignin spectroscopic method (acetyl bromide lignin methods) [58,59].

### 16 **Statistical analyses**

17 Wilcoxon test were carried out using R package ggplot2 function stat\_summary [60] to  
18 highlight significant differences between F4 and F7 lines. Correlation analyses where carried  
19 out using stats R package [61]

## 22 **LIST OF ABBREVIATIONS**

23 FASGA: Fucsina, Alcian blue, Safranina, Glicerina and Aqua

24 H: Hue

25 S: Saturation

26 V: Value

27 DRT: Dark Rind Tissue

28 ET: Epidermal Tissues

29 BT: Bundle Tissue

30 MT: Medullary Tissues

31 LRT: Light Rind Tissue

32

33

34



### 1 **DECLARATIONS**

2 **Ethics approval and consent to participate:** Not applicable.

3 **Consent for publication:** Not applicable.

4 **Availability of data and materials:** The datasets used and/or analyzed during the current study  
5 are available from the corresponding author on reasonable request.

6 **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

7 **Funding:** The IJPB benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-  
8 0007). This work was financially supported by Pro-maïs and is part of the DECLIC project  
9 (<http://pro-mais.org/les-programmes-de-recherche-de-pro-mais>). Field trial was also carried  
10 out in the frame of DECLIC. This study was supported by the French Government Grant ANR-  
11 11-BTBR-0006 BIOMASS FOR THE FUTURE, managed by the French National Research  
12 Agency under an “Investments for the Future” program (Grant ANR- 11-IDEX-0003-02).

13 **Authors’ contributions:** VM and MR piloted the study and supervised the plant sampling;  
14 PLLM, MR and VM sampled the maize, PLLM and SG performed the histological analyses;  
15 PLLM developed the presented workflow; PLLM and MR performed statistical analyses on  
16 the dataset; PLLM, MR and VM interpreted the results; PLLM, MR and VM wrote the  
17 manuscript.

18 All authors read and approved the final manuscript.

19 **Acknowledgments:** The authors acknowledge Philippe Andrey (UMR 1318, Institut Jean-  
20 Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay,) for his help in writing  
21 some small parts of the workflow code.

22

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

### REFERENCES

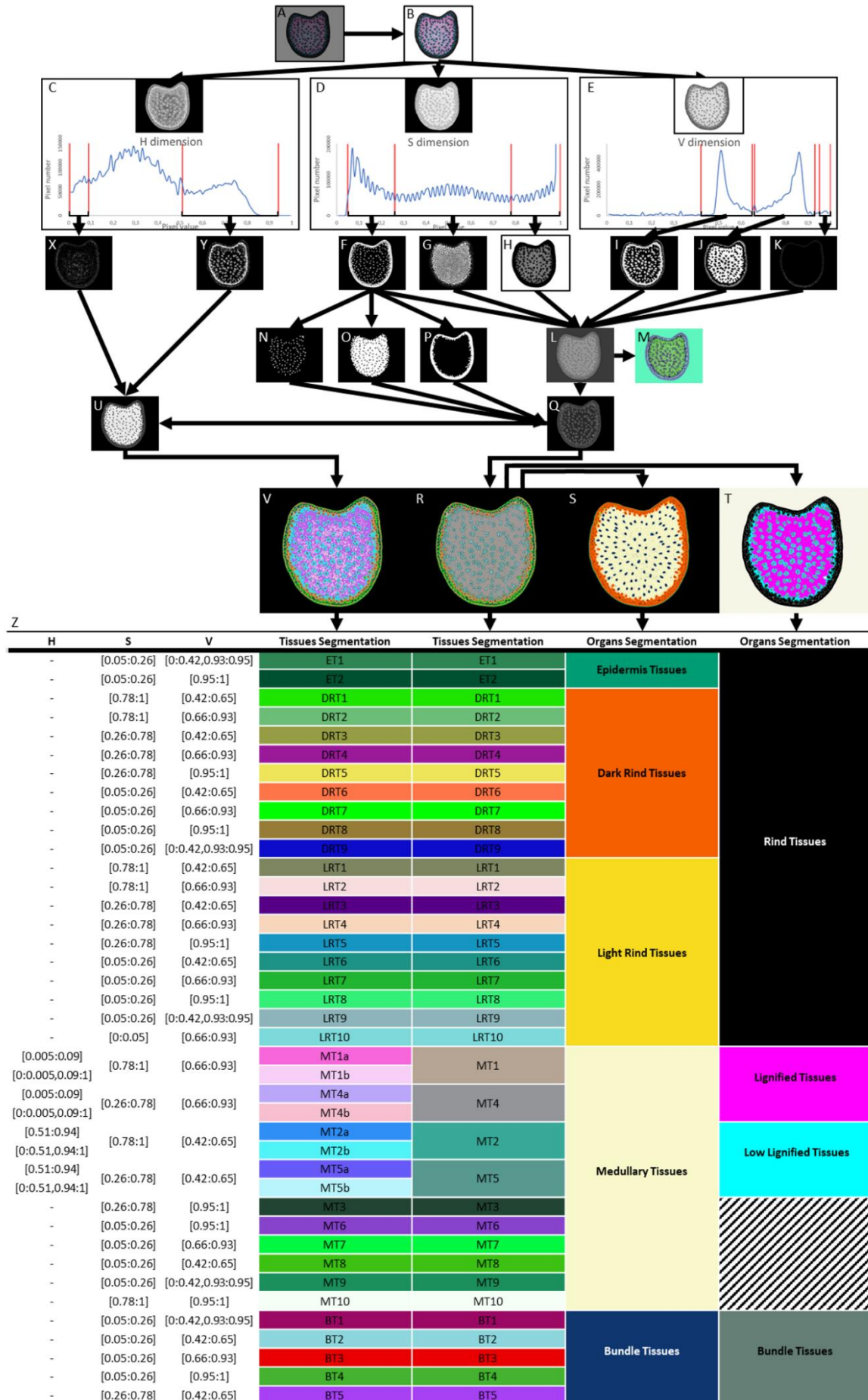
1. Wilson JR. Chapitre 1: Organization of Forage Plant Tissues. Forage Cell Wall Struct Dig [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1993 [cited 2021 Jul 8]. p. 1–32. Available from: <https://acess.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/1993.foragecellwall.c1>
2. Jung HG, Casler MD. Maize Stem Tissues: Impact of Development on Cell Wall Degradability. *Crop Sci.* 2006;46:1801–9.
3. Jung HG, Casler MD. Maize Stem Tissues: Cell Wall Concentration and Composition during Development. *Crop Sci.* 2006;46:1793–800.
4. Perrier L, Rouan L, Jaffuel S, Clément-Vidal A, Roques S, Soutiras A, et al. Plasticity of Sorghum Stem Biomass Accumulation in Response to Water Deficit: A Multiscale Analysis from Internode Tissue to Plant Level. *Front Plant Sci* [Internet]. 2017 [cited 2020 Nov 6];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01516/full>
5. Corcel M. Imagerie multispectrale en macrofluorescence en vue de la prédiction de l'origine tissulaire de particules de tiges de maïs [Internet] [These de doctorat]. Nantes, Ecole nationale vétérinaire; 2017 [cited 2021 May 26]. Available from: <https://www.theses.fr/2017ONIR095F>
6. El Hage F. Impact du déficit hydrique sur les relations entre la dégradabilité, la biochimie pariétale et la répartition des tissus lignifiés chez l'entreoeud de maïs et déterminisme génétique de ces caractères. [INRA Versailles]: l'Université Paris-Saclay; 2018.
7. Esau K. *Plant Anatomy.* Soil Sci. 1953;75:407.
8. Akin DE. Histological and Physical Factors Affecting Digestibility of Forages. *Agron J.* 1989;81:17–25.
9. Lopez S, Murison SD, Travis AJ, Chesson A. Degradability of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated at different developmental stages from a newly extended maize internode. *Acta Bot Neerlandica.* 1993;42:165–74.
10. Barros-Rios J, Santiago R, Malvar RA, Jung H-JG. Chemical composition and cell wall polysaccharide degradability of pith and rind tissues from mature maize internodes. *Anim Feed Sci Technol.* 2012;172:226–36.
11. Costa THF, Vega-Sánchez ME, Milagres AMF, Scheller HV, Ferraz A. Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance. *Biotechnol Biofuels.* 2016;9:99.
12. Méchin V, Argillier O, Rocher F, Hébert Y, Mila I, Pollet B, et al. In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *J Agric Food Chem.* 2005;53:5872–81.
13. Wilson JR, Mertens DR, Hatfield RD. Isolates of cell types from sorghum stems: Digestion, cell wall and anatomical characteristics. *J Sci Food Agric.* 1993;63:407–17.
14. Chesson A, Provan GJ, Russell W, Scobbie L, Chabbert B, Monties B. Characterisation of Lignin from Parenchyma and Sclerenchyma Cell Walls of the Maize Internode. *J Sci Food Agric.* 1997;73:10–6.
15. Morrison TA, Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD. Cell-Wall Composition of Maize Internodes of Varying Maturity. *Crop Sci.* 1998;38:cropsci1998.0011183X003800020031x.
16. Boon EJMC, Struik PC, Tamminga S, Engels FM, Cone JW. Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L.) cultivars varying in whole plant digestibility. III. Intra-stem variability in anatomy, chemical composition and in vitro rumen fermentation. *NJAS Wagening J Life Sci.* 2008;56:101–22.
17. Corcel M, Devaux MF, Guillon F, Barron C. Identification of tissular origin of particles based on autofluorescence multispectral image analysis at the macroscopic scale [Internet]. EDP Sciences; 2017 [cited 2021 Feb 25]. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01602677>

- 1 18. Baldacci-Cresp F, Spriet C, Twyffels L, Blervacq A-S, Neutelings G, Baucher M, et al. A  
2 rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell  
3 wall lignification. *Plant J.* 2020;102:1074–89.
- 4 19. Arnaud B, Durand S, Fanuel M, Guillon F, Méchin V, Rogniaux H. Imaging Study by  
5 Mass Spectrometry of the Spatial Variation of Cellulose and Hemicellulose Structures  
6 in Corn Stalks. *J Agric Food Chem.* 2020;68:4042–50.
- 7 20. Du J, Zhang Y, Guo X, Ma L, Shao M, Pan X, et al. Micron-scale phenotyping  
8 quantification and three-dimensional microstructure reconstruction of vascular  
9 bundles within maize stalks based on micro-CT scanning. *Funct Plant Biol.*  
10 2016;44:10–22.
- 11 21. Zhang Y, Ma L, Pan X, Wang J, Guo X, Du J. Micron-scale Phenotyping Techniques of  
12 Maize Vascular Bundles Based on X-ray Microcomputed Tomography. *JoVE J Vis*  
13 *Exp.* 2018;e58501.
- 14 22. Wang JP, Matthews ML, Naik PP, Williams CM, Ducoste JJ, Sederoff RR, et al. Flux  
15 modeling for monolignol biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol.* 2019;56:187–92.
- 16 23. Wang X, Shi Z, Zhang R, Sun X, Wang J, Wang S, et al. Stalk architecture, cell wall  
17 composition, and QTL underlying high stalk flexibility for improved lodging resistance  
18 in maize. *BMC Plant Biol.* 2020;20:515.
- 19 24. Zhang Y, Ma L, Wang J, Wang X, Guo X, Du J. Phenotyping analysis of maize stem  
20 using micro-computed tomography at the elongation and tasseling stages. *Plant*  
21 *Methods.* 2020;16:2.
- 22 25. Heckwolf S, Heckwolf M, Kaeppler SM, de Leon N, Spalding EP. Image analysis of  
23 anatomical traits in stalk transections of maize and other grasses. *Plant Methods.*  
24 2015;11:26.
- 25 26. Meshitsuka G, Nakano J. Studies on the mechanism of lignin colour reaction (XI). Maule  
26 colour reaction. *Mokuzai Gakkaishi J Jpn Wood Res Soc.* 1977;23:232–6.
- 27 27. Vallet C, Chabbert B, Czaninski Y, Monties B. Histochemistry of Lignin Deposition during  
28 Sclerenchyma Differentiation in Alfalfa Stems. *Ann Bot.* 1996;78:625–32.
- 29 28. Rocha S, Monjardino P, Mendonça D, da Câmara Machado A, Fernandes R, Sampaio  
30 P, et al. Lignification of developing maize (*Zea mays* L.) endosperm transfer cells and  
31 starchy endosperm cells. *Front Plant Sci [Internet].* 2014 [cited 2021 Jun 17];5.  
32 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3960489/>
- 33 29. Zhang Y, Legay S, Barrière Y, Méchin V, Legland D. Color Quantification of Stained  
34 Maize Stem Section Describes Lignin Spatial Distribution within the Whole Stem. *J*  
35 *Agric Food Chem.* 2013;61:3186–92.
- 36 30. El Hage F, Legland D, Borrega N, Jacquemot M-P, Griveau Y, Coursol S, et al. Tissue  
37 Lignification, Cell Wall p-Coumaroylation and Degradability of Maize Stems Depend  
38 on Water Status. *J Agric Food Chem.* 2018;66:4800–8.
- 39 31. El Hage F, Virlovet L, Lopez-Marnet P-L, Griveau Y, Jacquemot M-P, Coursol S, et al.  
40 Responses of Maize Internode to Water Deficit Are Different at the Biochemical and  
41 Histological Levels. *Front Plant Sci [Internet].* 2021 [cited 2021 Apr 16];12. Available  
42 from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7952650/>
- 43 32. Mazaheri M, Heckwolf M, Vaillancourt B, Gage JL, Burdo B, Heckwolf S, et al. Genome-  
44 wide association analysis of stalk biomass and anatomical traits in maize. *BMC Plant*  
45 *Biol.* 2019;19:45.
- 46 33. Legland D, El-Hage F, Méchin V, Reymond M. Histological quantification of maize stem  
47 sections from FASGA-stained images. *Plant Methods.* 2017;13:84.
- 48 34. Tolivia D, Tolivia J. Fasga: A new polychromatic method for simultaneous and differential  
49 staining of plant tissues. *J Microsc.* 1987;148:113–7.
- 50 35. Méchin V. Etude de facteurs biochimiques et génétiques explicatifs de la variabilité pour  
51 la valeur alimentaire du maïs fourrage. [INRA - Lusignan]: INSTITUT NATIONAL  
52 AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON; 2000.
- 53 36. Barrière Y, Guillaumie S, Denoue D, Pichon M, Goffner D, Martinant J-P. Investigating  
54 the unusually high cell wall digestibility of the old INRA early flint F4 maize inbred  
55 line. *Maydica.* 2018;62:21.

- 1 37. Hansey CN, Lorenz AJ, de Leon N. Cell Wall Composition and Ruminant Digestibility of  
2 Various Maize Tissues Across Development. *BioEnergy Res.* 2010;3:28–37.
- 3 38. Oduntan YA, Stubbs CJ, Robertson DJ. High Throughput Phenotyping of Cross-  
4 sectional Morphology to Assess Stalk Lodging Resistance. 2021 [cited 2021 Aug 10];  
5 Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-650790/v1>
- 6 39. Akin DE, Robinson EL, Barton FE, Himmelsbach DS. Changes with maturity in anatomy,  
7 histochemistry, chemistry, and tissue digestibility of bermudagrass plant parts. *J*  
8 *Agric Food Chem.* 1977;25:179–86.
- 9 40. Cone JW, Engels FM. Influence of growth temperature on anatomy and in vitro  
10 digestibility of maize tissues. *J Agric Sci.* 1990;114:207–12.
- 11 41. Engels FM, Schuurmans JLL. Relationship between structural development of cell walls  
12 and degradation of tissues in maize stems. *J Sci Food Agric.* 1992;59:45–51.
- 13 42. Ralph J, Hatfield RD, Quideau S, Helm RF, Grabber JH, Jung H-JG. Pathway of p-  
14 Coumaric Acid Incorporation into Maize Lignin As Revealed by NMR. *J Am Chem*  
15 *Soc.* 1994;116:9448–56.
- 16 43. Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD. Identification and synthesis of new ferulic  
17 acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J Chem Soc Perkin 1.* 1994;3485–98.
- 18 44. Grabber JH, Hatfield RD, Ralph J. Diferulate cross-links impede the enzymatic  
19 degradation of non-lignified maize walls. *J Sci Food Agric.* 1998;77:193–200.
- 20 45. Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD. Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation  
21 of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize. *J Agric Food Chem.* 1998;46:2609–  
22 14.
- 23 46. Jung H-JG. Maize stem tissues: ferulate deposition in developing internode cell walls.  
24 *Phytochemistry.* 2003;63:543–9.
- 25 47. Barros-Rios J, Malvar RA, Jung H-JG, Bunzel M, Santiago R. Divergent selection for  
26 ester-linked diferulates in maize pith stalk tissues. Effects on cell wall composition  
27 and degradability. *Phytochemistry.* 2012;83:43–50.
- 28 48. Zhang Y, Legland D, Hage FE, Devaux M-F, Guillon F, Reymond M, et al. Changes in  
29 cell walls lignification, feruloylation and p-coumaroylation throughout maize internode  
30 development. *PLOS ONE.* 2019;14:e0219923.
- 31 49. Dardenne P, Andrieu J, Barrière Y, Biston R, Demarquilly C, Femenias N, et al.  
32 Composition and nutritive value of whole maize plants fed fresh to sheep. II.  
33 Prediction of the in vivo organic matter digestibility. *Ann Zootech.* 1993;42:251–70.
- 34 50. Argillier O, Barrière Y, Hébert Y. Genetic variation and selection criterion for digestibility  
35 traits of forage maize. *Euphytica.* 1995;82:175–84.
- 36 51. Chesson A. Chapitre 14: Mechanistic Models of Forage Cell Wall Degradation. *Forage*  
37 *Cell Wall Struct Dig [Internet].* John Wiley & Sons, Ltd; 1993 [cited 2021 Jul 8]. p.  
38 347–76. Available from:  
39 <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/1993.foragecellwall.c14>
- 40 52. Santiago R, Barros-Rios J, Malvar RA. Impact of cell wall composition on maize  
41 resistance to pests and diseases. *Int J Mol Sci.* 2013;14:6960–80.
- 42 53. Gärtner H, Lucchinetti S, Schweingruber FH. New perspectives for wood anatomical  
43 analysis in dendrosciences: The GSL1-microtome. *Dendrochronologia.* 2014;32:47–  
44 51.
- 45 54. Barilla ME. Color Transformer [Internet]. The University of Birmingham, UK: Digital  
46 Systems & Vision Processing Group; 2007 [cited 2021 Jun 29]. Available from:  
47 <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/color-transforms.html>
- 48 55. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an  
49 open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:676–82.
- 50 56. Morrison TA, Kessler JR, Buxton DR. Maize Internode Elongation Patterns. *Crop Sci.*  
51 1994;34:cropsci1994.0011183X003400040040x.
- 52 57. Zhang Y, Culhaoglu T, Pollet B, Melin C, Denoue D, Barrière Y, et al. Impact of Lignin  
53 Structure and Cell Wall Reticulation on Maize Cell Wall Degradability. *J Agric Food*  
54 *Chem.* 2011;59:10129–35.

- 1 58. Fukushima RS, Hatfield RD. Extraction and Isolation of Lignin for Utilization as a  
2 Standard to Determine Lignin Concentration Using the Acetyl Bromide  
3 Spectrophotometric Method. J Agric Food Chem. 2001;49:3133–9.
- 4 59. Fukushima RS, Hatfield RD. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric  
5 method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in  
6 forage samples. J Agric Food Chem. 2004;52:3713–20.
- 7 60. Wickham H, Chang W, Henry L, Lin Pedersen T, Takahashi K, Wilke C, et al. Create  
8 Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics [Internet]. 2020 [cited  
9 2021 May 26]. Available from: <https://ggplot2.tidyverse.org>,  
10 <https://github.com/tidyverse/ggplot2>
- 11 61. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Found Stat  
12 Comput Vienna Austria. 2013;  
13  
14

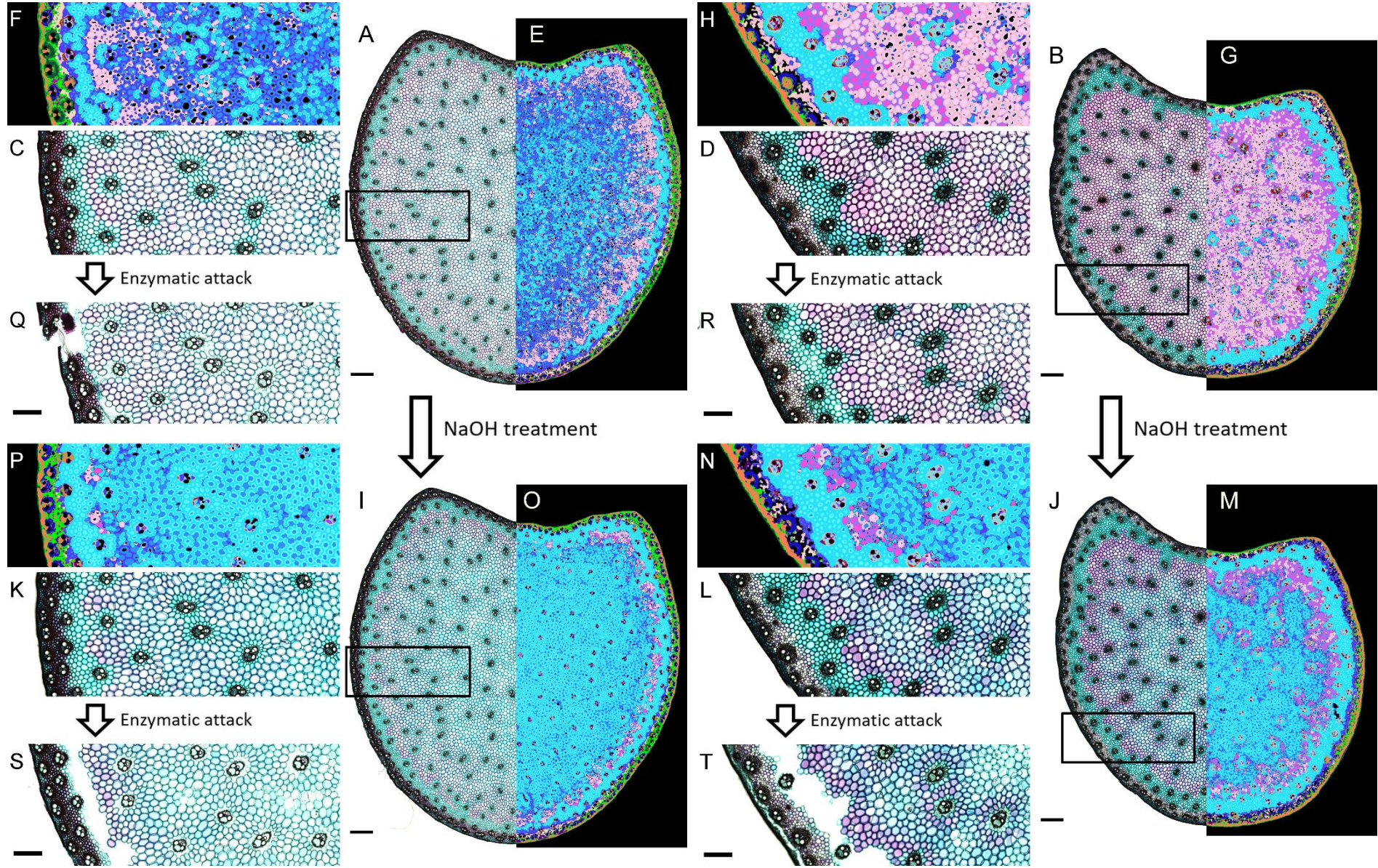






**Figure 1: Overview Workflow.** (A) Maize FASGA stained internode cross section image. (B) Maize FASGA stained internode cross sections resulting of 3 repetition of mean radius 2. (C) Image of H dimensions and the distribution of the number of pixels according to their H values. (D) Image of S dimensions and the distribution of the number of pixels according to their S values (E) Image of V dimensions and the distribution of the number of pixels according to their V values (F) Selection of pixels with S value between 0.05 and 0.26. (G) Selection of pixels with S value between 0.26 and 0.78. (H) Selection of pixels with S value between 0.78 and 1. (I) Selection of pixels with V value between 0.42 and 0.65. (J) Selection of pixels with V value between 0.66 and 0.93. (K) Selection of pixels with V value between 0.95 and 1. (L) Filter addition spectrum. (M) Color code image of image presentation in panel L. (N) Density spectrum corresponding to bundles in parenchyma. (O) Density spectrum representing pith and light rind (P) Density spectrum representing dark rind. (Q) Filter addition spectrum with spacial segmentation. (R) FASGA3, Filter addition spectrum with special segmentation colored. (S) Segmentation in 5 histological regions. (T) Segmentation of the tissues of the cross section according to Legland et al, 2017 (U) Image segmentation with H option filter colored (V) Image segmentation with H option filter colored (X) Selection of pixels according to their H value between 0.005 and 0.09 (Y) Selection of pixels according to their H value between 0.51 and 0.94 (Z) H, S and V parameters of the obtained 44 tissues segmented from maize FASGA stained cross section images. Attributed color of each segmented tissue is also reported.

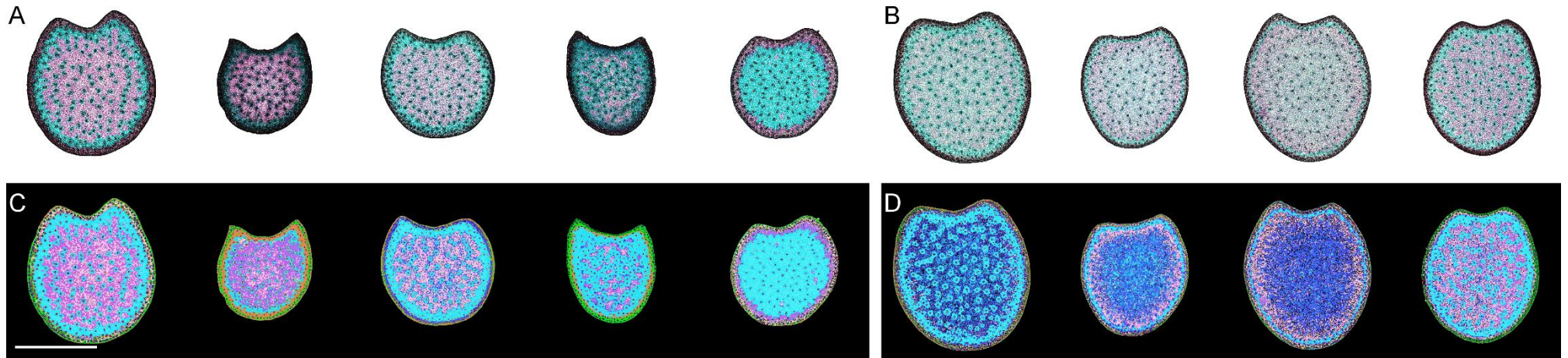






**Figure 2: Enzymatic digestion on maize cross section.** (A) Maize hybrid FASGA stained internode cross section. (B) Maize inbred line FASGA stained internode cross section. (C) Focus on part of panel A. (D) Focus on part of panel B. (E) Color segmentation images resulting from the proposed workflow on cross section presented in panel A. (F) Color segmentation image resulting from the proposed workflow of panel C. (G) Color segmentation image resulting from the proposed workflow on cross section presented in panel B. (H) Color segmentation image resulting from the proposed workflow of panel D. (I) Maize hybrid internode cross section treated with 0.1M NaOH solution and stained with FASGA solution. (J) Maize inbred line internode cross sections treated with 0.1M NaOH solution and stained with FASGA solution. (K) Focus on part of panel I. (L) Focus on part of panel J. (M) Color segmentation images resulting from the proposed method on cross section presented in panel J panel. (N) Color segmentation images resulting from the proposed method of panel L. (O) Color segmentation images resulting from the proposed method on dash point region of cross section presented in panel H panel. (P) Color segmentation images resulting from the proposed method of panel I. (Q) Maize hybrid cross sections treated with cellulase solution and stained with FASGA. (R) Maize inbred lines cross sections treated with cellulase solution and stained with FASGA. (S) Maize hybrid cross sections treated with NaOH 0.1M, cellulase solution and stained with FASGA. (T) Maize inbred lines cross sections treated with NaOH 0.1M, cellulase solution and stained with FASGA. (Q, R, S and T) Cross section treated with cellulase corresponding to focuses presented in panel C, D, K and L respectively.

(A, B, E, G, I, J, O and M) Scale bar = 1000  $\mu\text{m}$ . (C, D, F, H, K, L, N, P, Q, R, S and T) Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .

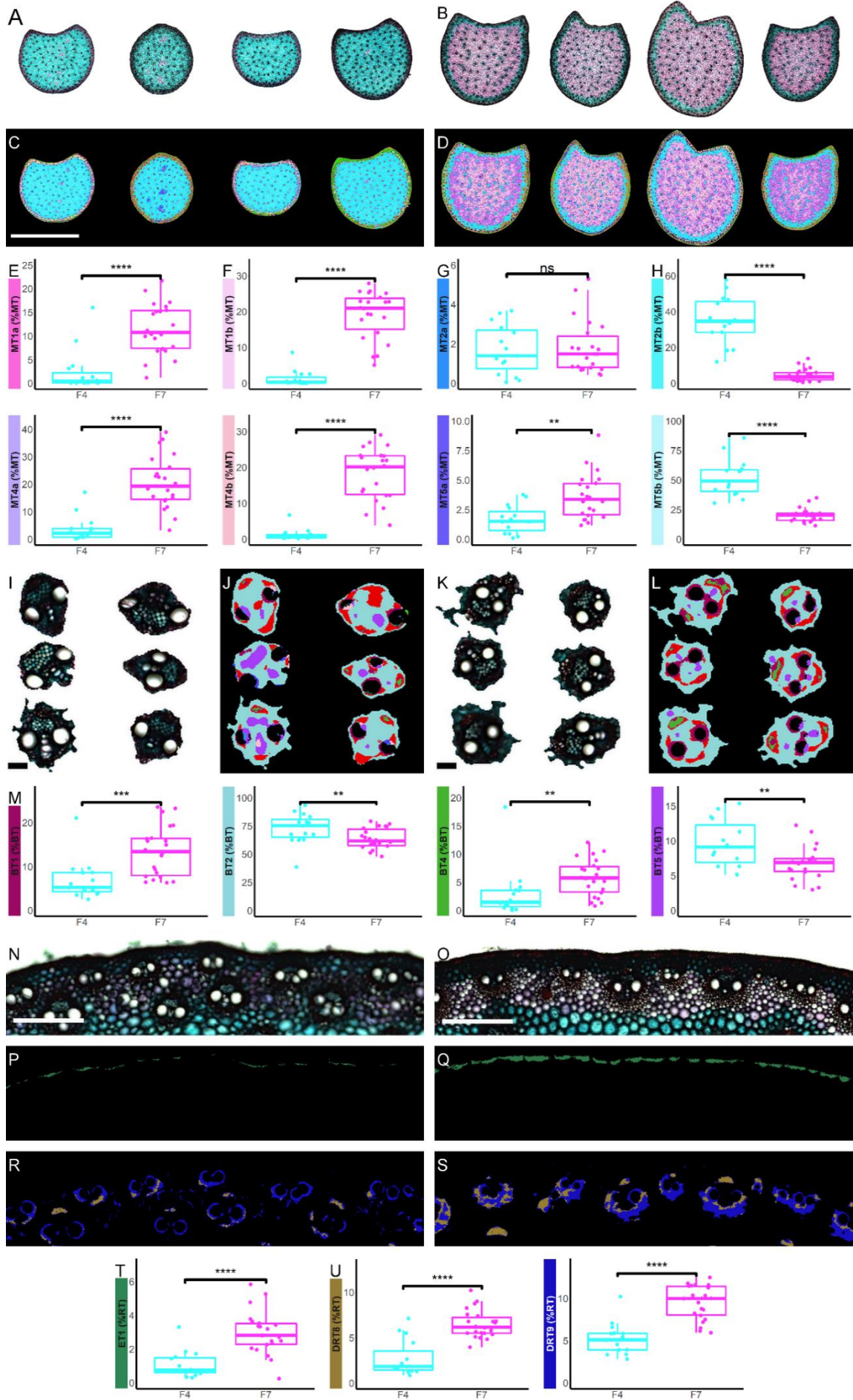


**Figure 3:** Result of the proposed workflow on 9 maize internodes cross section FASGA stained images from 9 genotypes. (A) Maize FASGA stained internode cross sections of inbred lines. (B) Maize FASGA stained internode cross sections of maize hybrids. (C and D) Color segmentation images resulting from the proposed workflow applied to each hybrid or inbred line images presented in panel A and B, respectively.

Scale bar = 1 cm.



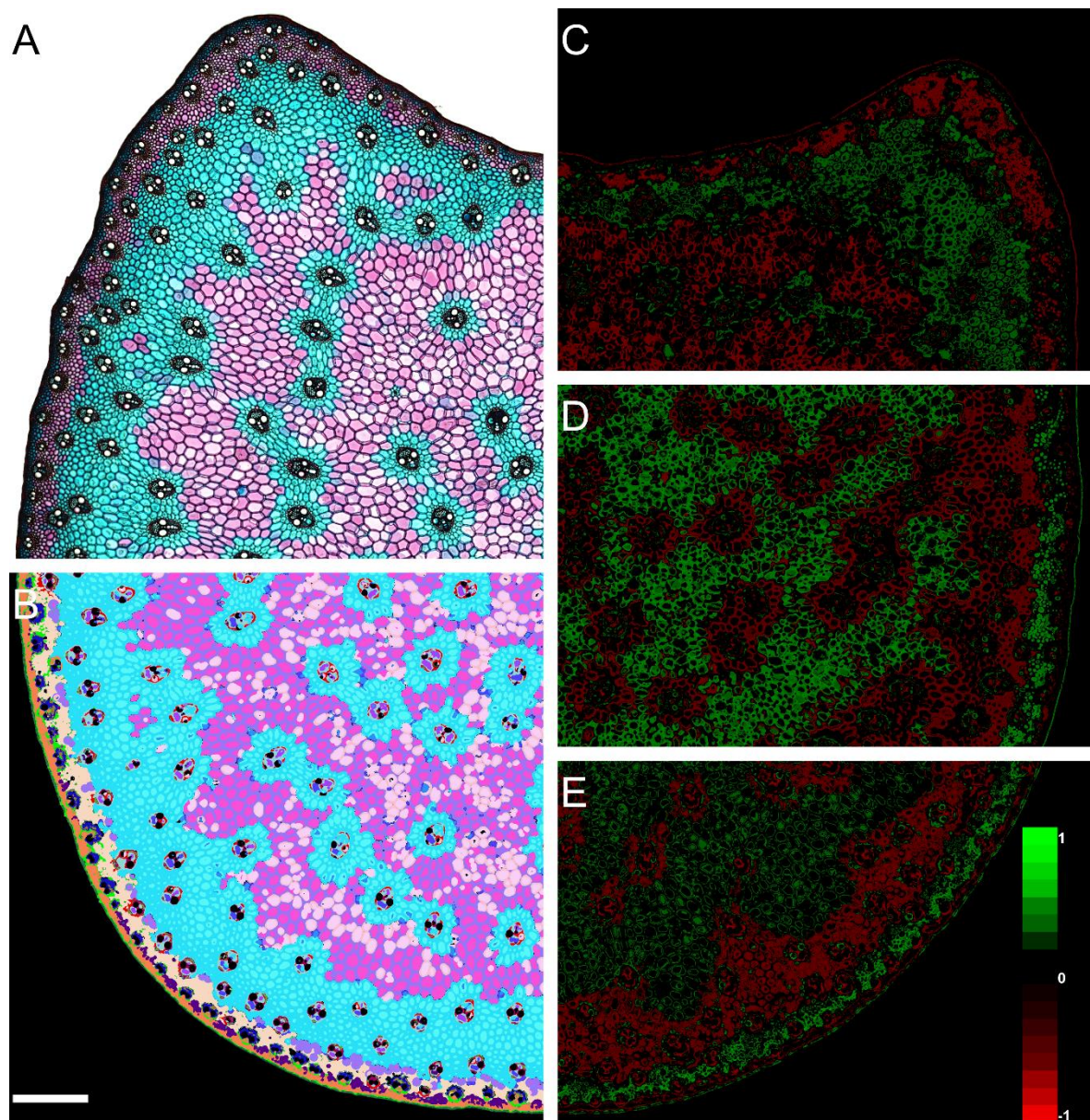
# Chapitre 2





**Figure 4: Result of the proposed workflow on F4 and F7 maize inbred lines cross section FASGA stained images.** (A) F4 inbred line FASGA stained internode cross sections images. (B) F7 inbred line FASGA stained internode cross sections images. (C) F4 segmented images resulting from the proposed workflow. (D) F7 segmented images resulting from the proposed workflow. (E) Quantified area of lignified parenchyma tissues MT1a and MT4a (on top and bottom, respectively) from F4 (in blue) and F7 (in pink) cross section, expressed in percentage of medullary tissues (%MT). (F) Quantified area of lignified parenchyma tissues MT1b and MT4b (on top and bottom, respectively) from F4 (in blue) and F7 (in pink) cross section, expressed in percentage of medullary tissues (%MT). (G) Quantified area of low lignified parenchyma tissues MT2a and MT5a (on top and bottom, respectively) from F4 (in blue) and F7 (in pink) cross section, expressed in percentage of medullary tissues (%MT). (H) Quantified area low lignified parenchyma tissues MT2b and MT5b (on top and bottom, respectively) from F4 (in blue) and F7 (in pink) cross section, expressed in percentage of medullary tissues (%MT). (I) Magnifications of bundles from F4 inbred line FASGA stained cross section images obtained in panel A. (J) Segmented images of F4 inbred lines bundles. (K) Magnification of bundles from F7 inbred line FASGA stained cross section images obtained in panel B. (L) Segmented images of F7 inbred line bundles. (M) Quantified area of bundle tissues (BT1, BT4, BT2 and BT5) from F4 (in blue) and F7 (in pink) cross section, expressed in percentage of bundle tissues (%BT). (N) Magnification of rind region of F4 inbred lines FASGA stained cross section image. (O) Magnification of rind region of F7 inbred lines FASGA stained cross section image. (P) F4 ET1 segmented images tissues from the region presented in panel N. (Q) F7 ET1 segmented tissues from the region presented in panel O. (R) F4 DRT8 and DRT9 segmented tissues from region magnified in panel N. (S) F7 DRT8 and DRT9 segmented tissues from region magnified in panel O. (T) Quantified sclerenchyma hypodermis tissues ET1 from F4 (in blue) and F7 (in pink) cross section, expressed in percentage of rind tissues (%RT).

(U) Quantified area of sclerenchyma tissues DRT8 and DRT9 (on the left and on the right, respectively) from F4 (in blue) and F7 (in pink) cross section, expressed in percentage of rind tissues (%RT). Significance: no symbol,  $p \leq 0.1$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ . (A, B, C and D) Scale bar = 1 cm. (I, J, K and L) Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . (N, O, P, Q, R and S) Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .



**Figure 5:** Mapping of correlation values between classified pixel according to their H, S and V dimensions and biochemical traits. In mapping, green and red colors represent the windows pixels positively or negatively correlated with traits, respectively. (A) Inbred line internode FASGA stained cross section image. (B) Workflow color segmented image of image presented in A. (C) Mapping of the correlation values between classified pixel and cell wall digestibility. (D) Mapping of the correlation values between classified pixel and lignin content in the cell wall. (E) Mapping of the correlation values between classified pixel and *p*-coumaric content in the cell wall. Scale bar = 1000  $\mu$ m.



## Chapitre 3 :

### **Identification des caractères biochimiques et histologiques impliqués dans la variation de digestibilité observée dans une série d'hybrides de maïs ensilage modernes.**

*Au cours de ce chapitre je vous présente les travaux qui concernent le troisième objectif de ma thèse autour de l'« identification des caractères biochimiques et histologiques impliqués dans la variation de digestibilité observée dans une série d'hybrides de maïs ensilage modernes ». Pour ce travail, les hybrides et les essais ont été fournis et assurés par les 7 partenaires privés impliqués dans le projet DECLIC (promaïs).*

*Fort des développements réalisés et présentés dans les chapitres 1 et 2 de la thèse, j'ai pu caractériser biochimiquement et histologiquement des échantillons sélectionnés d'hybrides cultivés dans un réseau d'essais et récoltés au stade ensilage. Ce travail est le fruit d'une contribution avec mes collègues de l'équipe Qualibiosec.*

*Des analyses ont permis de mettre en évidence des variations biochimiques et histologiques dues aux géotypes et aux environnements testés. Par ailleurs, des analyses corrélatives ont permis d'identifier un ensemble de caractères biochimiques ou histologiques impliqués dans la variation de la digestibilité. De plus, la combinaison des caractères biochimiques et histologiques permet d'augmenter la compréhension de la variation de digestibilité au sein du jeu de données analysées.*

*L'ensemble des analyses réalisées permettent d'identifier les cibles biochimiques et histologiques à améliorer pour proposer des hybrides ensilages à fort rendement et présentant de bonnes digestibilités.*





## I. Matériels et méthodes

### A. Présentation du matériel végétal, des échantillons récoltés et des mesures réalisées.

Chacune des 7 compagnies semencières impliquées dans le projet ProMaïs-DECLIC a fourni 10 hybrides précoces modernes censés présenter une gamme de variation pour leur digestibilité. A cette liste, s'ajoutent 9 et 7 hybrides commerciaux témoins en 2018 et 2019 respectivement. Les cultures ont été prises en charge par les partenaires privés. Ainsi, 79 hybrides, ont été cultivés dans 3 lieux en 2018 (Hédé, Roye et Réclainville) (Figure 1) et 77 hybrides en 2019 (Villampuy, Ouques et Selommes) (Figure 1).



**Figure 1 : Localisation dans la moitié nord de la France des lieux des essais en champs chez les partenaires privés en 2018 (en rouge) et 2019 (en bleu). Les pourcentages moyens de MS à la récolte sont indiqués pour chaque lieu.**

Au total, 94 hybrides dont 64 hybrides communs à 2018 et 2019 ont été cultivés. Sur chaque lieu, les hybrides étaient cultivés en deux blocs avec chaque hybride présent une fois dans chaque bloc. Chaque hybride était cultivé en parcelle de deux lignes de 11.2 m<sup>2</sup> (deux rangs de 7 m de long avec 0.80 m d'espacement entre les rangs) conduisant à une densité de plantes de 100 000 plantes.ha<sup>-1</sup>.

Au stade ensilage, la teneur en MS à la récolte et le rendement ensilage (en t de MS.ha<sup>-1</sup>) ont été obtenus pour chaque parcelle. Au stade ensilage également, les entrenœuds sous l'épi

principal de deux plantes en 2018 et 4 plantes en 2019 ont été récoltés, leur longueur mesurée et les entrenœuds ont été stockés dans de l'éthanol à 70 % en vue des analyses histologiques. Le reste de la ligne a été récolté et un échantillon représentatif de la ligne a été séché et broyé (broyeur à marteau de type Gondard, grille 1mm) afin d'obtenir de la poudre de matière sèche (MS) pour les analyses biochimiques.

Les analyses biochimiques et histologiques ont été réalisées sur des échantillons prélevés sur 1 bloc sélectionné en 2018 (Bloc 1 à Hédé) et 1 bloc sélectionné en 2019 (Bloc 2 à Villampuy).

Dans le cadre de ma thèse et des résultats présentés ci-dessous, j'utiliserai les données biochimiques et histologiques acquises sur ces deux blocs.

## B. Présentation des analyses biochimiques

Des analyses biochimiques visant à estimer la composition et les digestibilités de la matière sèche et de la paroi cellulaire ont été réalisées sur 79 échantillons en 2018 et 77 échantillons en 2019. Ces échantillons ont été caractérisés pour :

### 1. Obtention et détermination de la teneur en paroi

La détermination de la teneur en paroi a été effectuée par deux méthodes :

La méthode Soxhlet (Effland, 1977), classiquement utilisée dans les laboratoires de chimie de la paroi, a été retenue. Dans un premier temps les poudres de MS de plantes avec épis subissent un prétraitement enzymatique pour éliminer l'amidon. Pour cela, dans deux tubes Falcon de 50ml 1g de poudre de matière sèche de plantes entières pour chaque échantillon a été pesé ( $m_1$ ), 20ml d'eau et 400 $\mu$ L d' $\alpha$ -amylase (AMYLASE HTL THERMOSTABLE Ankom) ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été agités pendant 15min à 100°C. L' $\alpha$ -amylase permet de digérer l'amidon libéré par gélatinisation en rompant les liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$ glycosidiques des chaînes d'amylose et d'amylopectine. Cette digestion enzymatique se traduit par la libération de maltose, un disaccharide de  $\alpha$ -D-glucose soluble. Les poudres sont ensuite séchées au lyophilisateur et pesées ( $m_2$ ). La poudre ainsi obtenue dans les deux tubes pour chaque échantillon est mélangée et homogénéisée, pesée ( $m_3$ ) et mise en cartouche whatman (22\*80mm) pour en extraire les solubles et ainsi obtenir un résidu qui correspond à la paroi. Pour cela les cartouches sont soumises à deux extractions successives en continu durant deux fois 48h à l'eau puis à l'éthanol. Elles sont enfin séchées puis pesées ( $m_4$ ). La teneur en paroi dans la matière sèche correspond au pourcentage de masse restante, rapportée à la matière sèche de départ (cf formule ci-dessous). Ce protocole permet ainsi d'obtenir des



résidus pariétaux utilisés pour la suite dans plusieurs caractérisations biochimiques (CWR pour Cell Wall Residue; exprimé en %MS).

$$CWR (\%MS) = 100 * \left(1 - \frac{m_1 - m_2}{m_1}\right) * \left(1 - \frac{m_3 - m_4}{m_3}\right) = 100 * m_2/m_1 * m_3/m_4$$

La méthode Van Soest, classiquement utilisée dans le domaine de la digestibilité animale, a également été utilisée. Elle permet de fractionner successivement via l'utilisation de différents détergents les constituants de la matière sèche. Le premier traitement par une solution de détergent neutre permet d'extraire les solubles pour obtenir la paroi (NDF pour Neutral Detergent Fiber ; exprimé en %MS). Cette estimation a été prise en charge par prestation auprès du LANO (Laboratoire Agronomique de Normandie <http://www.lano.asso.fr/web/index.php>).

### 2. Estimation de la digestibilité de la matière sèche

La digestibilité de la matière sèche *in vitro* (IVDMD.pMS pour In Vitro Dry Matter Digestibility, exprimée en %MS) a été mesurée selon le protocole mis au point et décrit dans Lopez-Marnet et al. (2021) et présenté dans le chapitre 1 de la thèse. Brièvement, les échantillons de matière sèche sont soumis à un prétraitement acide enzymatique à 2 g.L<sup>-1</sup> de pepsine dans une solution HCl 0,1N, 24 heures à 40 °C. Une étape de gélatinisation est ensuite conduite au bain marie à 80 °C pendant 30 minutes. Enfin, après neutralisation (pour obtenir un pH final de 4.6 à 4.8), un traitement, par une attaque cellulasique « Onozuka R-10 de *Trichoderma viride* » ; Serva ; 10mg réf 16419.03 à 1 mg.L<sup>-1</sup> est appliqué pendant 24 heures à 40 °C. Le résidu est enfin séché par lyophilisation avant d'être pesé. La perte pondérale ainsi mesurée représente la digestibilité de la matière sèche et est exprimée en %MS.

### 3. Estimation de la digestibilité de la paroi

La digestibilité de paroi *in vitro* (IVCWRDm.pCWR pour In Vitro Cell Wall Residue Digestibility Measured, exprimé en %CWR) a été estimée selon le même protocole que celui décrit pour la digestibilité de la MS en remplaçant la MS de départ par du résidu pariétal (CWR) obtenu par la méthode Soxhlet.

A partir de l'IVCWRDm.pCWR et de la teneur en CWR, deux types de teneurs en parois ont été calculées : la teneur en parois non digestibles *in vitro* (CWRnd) et la teneur en parois digestibles *in vitro* (CWRd) comme suit :

$$CWRnd.pMS = \frac{(100 - IVCWRDm.pCWR) * CWR.pMS}{100} \quad (\text{exprimé en \%MS})$$

$$CWRd.pMS = \frac{IVCWRDm.pCWR * CWR.pMS}{100} \quad (\text{exprimé en \%MS})$$



Où IVCWRDm est la digestibilité *in vitro* de la paroi et CWR est la teneur en parois.

### 4. Estimation de la teneur en lignine dans la paroi

La teneur en lignine a été estimée via 3 méthodes :

La première méthode retenue est celle au bromure d'acétyl qui permet des analyses à haut débit. La méthode de quantification de la teneur en lignine dans la paroi au bromure d'acétyl (BrAc.pCWR, exprimé en %CWR) repose sur une mesure spectroscopique et a été adaptée de Fukushima et Hatfield (Fukushima and Hatfield, 2001, 2004). Dans cette méthode les lignines sont solubilisées à chaud par une solution de bromure d'acétyl dans l'acide acétique puis l'absorbance de la solution est convertie en quantité de lignine. Pour cela, pour chaque échantillon nous avons pesé 7 mg de CWR dans des vials en verre de 2 mL puis nous avons ajouté 1 ml de solution1 (1/4 de bromure d'acétyl commercial (98%, ACROS, référence 1594010000) et 3/4 d'acide acétique glacial de qualité purex pour analyses (SDS référence 0070515) pendant 2,5 heures à 53 °C sous agitation. Après retour à température ambiante des vials, nous avons effectué une dilution dans un tube à hémolyse (Sarsted Tube 5 ml 75/13 PP HT fond rond x 2000) de 50µL dans 1,5 mL de solution2 (250 mL d'acide acétique et 45 mL de soude 2 M) puis ajouté 150 µL de chlorhydrate d'hydroxylamine ( $[\text{NH}_3\text{OH}]^+\text{Cl}^-$ , Prolabo référence 24 708.18) avant de vortexer les tubes. Nous avons effectué cette dilution en duplicata pour vérifier la qualité technique des dilutions. Après une attente d'une heure nous avons réalisé la prise de l'absorbance à 280 nm puis calculé la teneur en lignine BrAC comme suit :

$$\text{BrAc. pCWR} = \frac{100 \times A_{280} \times V_{\text{solution1}} \times V_f}{\varepsilon \times M \times V_p}$$

- Où :
- $A_{280}$  : Absorbance mesurée à 280 nm ;
  - $V_{\text{solution1}}$  : volume de réactif (1 mL) ;
  - $V_f$  : volume final après dilution (1,7 mL) ;
  - $M$  : masse d'échantillon (mg) ;
  - $V_p$  : volume de réactif prélevé (50 µL).
  - $\varepsilon$  : coefficient d'absorption à 280 nm : 20 pour 1 mg.ml<sup>-1</sup> de lignine

La deuxième méthode d'estimation de la teneur en lignine retenue est la méthode Klason (KL.pCWR exprimé en %CWR) qui est classiquement utilisée dans les laboratoires de chimie des parois. Cette méthode est une méthode de suivi gravimétrique suite à la dégradation des polymères polysaccharidiques de la paroi avec de l'acide sulfurique (Dence, 1992). Pour cela, pour chaque échantillon, nous avons pesé 150 mg de CWR ( $m_1$ ) dans un bécher de 25 ml

puis ajouté 3 ml d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ , 72%) pendant 2 heures en remuant régulièrement. Puis nous avons ajouté délicatement 43 ml d'eau et transvasé dans un ballon à fond rond de 250 ml, avant de déposer le ballon dans un bain de sable à  $100^\circ C$  sous un système de refroidissement pour condenser les vapeurs pendant 3 heures. Les ballons sont agités pour homogénéiser la solution toutes les 20 minutes. Après refroidissement, la solution est filtrée sur un creuset de 50 ml muni d'un filtre Whatman de fibre de verre (GF/A 47 mm de diamètre), pesé après un passage de 15 minutes à  $100^\circ C(m_2)$  et le résidu est rincé à l'eau distillée. Les creusets sont ensuite placés dans une étuve à  $100^\circ C$  pendant une nuit avant d'être pesés ( $m_3$ ) pour déterminer le pourcentage de lignine Klason selon le calcul suivant :

$$LK. pCWR = \frac{m_3 - m_2}{m_1} * 100$$

Cette teneur en lignine est corrigée des cendres après incinération des résidus klason.

Cette mesure n'a été effectuée que sur les échantillons prélevés dans le bloc 1 à Hédé en 2018.

La troisième technique d'estimation de la teneur en lignine utilisée est la méthode Van Soest qui fait référence dans le domaine de l'alimentation animale. Pour cette estimation par la méthode Van Soest de la lignine (ADL.pNDF pour « Acid Detergent Lignin », exprimé en %NDF), suite à l'obtention du NDF, un deuxième traitement au moyen d'une solution de détergent acide est appliqué pour éliminer les hémicelluloses et obtenir le résidu ADF (pour Acid Detergent Fiber ou ADF.pNDF exprimées en %MS et en %NDF respectivement). Cette fraction ADF est alors soumise à une attaque par une solution d'acide sulfurique afin d'éliminer la cellulose et ainsi obtenir la lignine sulfurique ou « acid detergent lignin » (ADL ou ADL.pNDF exprimées en %MS et en %NDF respectivement). Ce dosage a été réalisé en prestation par le laboratoire LANO (Laboratoire Agronomique de Normandie <http://www.lano.asso.fr/web/index.php>).

### 5. Détermination de la composition monomérique et de la structure de la lignine par thioacidolyse

La méthode de thioacidolyse, développée par Lapierre et al., (1986), permet de rompre sélectivement les liaisons  $\beta O4$  et  $\alpha O4$  libérant ainsi les sous-unités constitutives des lignines liées uniquement par ces liaisons labiles. Brièvement, nous avons pesé 15 mg de résidu pariétal dans des tubes en verre avant d'y ajouter 1 mL de la solution d'étalon interne ( $C_{19}$ ,  $C_{21}$  et  $C_{22}$  à 0,5 mg/mL dans du dichlorométhane  $CH_2Cl_2$ ) à l'aide d'une seringue Hamilton et 10 mL de la solution d'éthanethiol (qui est un mélange de 87.5 mL de dioxane, 10 mL d'éthanethiol et 2.5



mL de BF<sub>3</sub> pour 100 ml de solution) avant de mettre les tubes dans un bain d'huile pendant 4 heures à 100 °C. La réaction est stoppée dans la glace au bout de 4 heures. Une fois les tubes refroidis, nous avons ajouté 5 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0.4M, 10 mL de H<sub>2</sub>O, 300 µL d'HCL 6N et 10 mL de CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>. Nous avons fermé les tubes et les avons agités vivement afin de créer une émulsion. Après décantation, à l'aide d'une pipette pasteur nous avons récupéré la phase inférieure dans un tube et ajouté du sulfate de sodium pour sécher les résidus aqueux avant de transférer dans un ballon d'évaporation. Une fois l'échantillon évaporé, nous avons récupéré le ml restant sur sulfate de sodium dans un vial. L'échantillon peut alors être conservé à 4°C.

Afin de rendre volatils en GC-MS les monomères ainsi extraits, une silylation est appliquée à chaque échantillon. Pour cela, nous avons mélangé dans un vial en verre 100 µL de BSTFA, 10 µL de pyridine, 4 µL de thioacidolysat et homogénéisé. Les échantillons ainsi silylés sont ensuite analysés en GC-MS. Leur séparation est réalisée sur une colonne capillaire de 30 mètres sous flux d'hélium (pression 7 psi) avec un gradient de température de 30 °C/min de 40 °C à 180 °C puis de 2 °C/min jusqu'à 260 °C.

Nous avons ainsi déterminé les quantités de sous-unités H, G et S liées en βO4, le rendement total de thioacidolyse (H+G+S) (exprimés en µmol.g<sup>-1</sup>.BrAc) et le rapport S/G. Le rendement total obtenu par thioacidolyse donne une image de la structure du polymère alors que le rapport S/G informe sur la composition de ce polymère.

### 6. Estimation des teneurs en cellulose et en hémicelluloses par le protocole Van Soest

Les teneurs en hémicelluloses et en cellulose ont été calculées à partir des valeurs obtenues par la méthode de Van Soest (1970) comme suit :

Teneur en hémicelluloses :

$$\text{Hémicellulose.pMS} = \text{NDF} - \text{ADF} \quad (\text{exprimé en \%MS})$$

$$\text{Hémicellulose.pNDF} = \frac{(\text{NDF} - \text{ADF})}{\text{NDF}} \quad (\text{exprimé en \%NDF})$$

Teneur en cellulose :

$$\text{Cellulose.pMS} = \text{ADF} - \text{ADL} \quad (\text{exprimé en \%MS})$$

$$\text{Cellulose.pNDF} = \frac{(\text{ADF} - \text{ADL})}{\text{NDF}} \quad (\text{exprimé en \%NDF})$$

### 7. Estimation des teneurs en acides *p*-hydroxycinnamiques par hydrolyses alcalines douces et fortes

Les teneurs en acide *p*-coumarique estérifié (Pcest.mg.g<sup>-1</sup> CWR), en acide férulique estérifié (Feest.mg.g<sup>-1</sup> CWR) et en acide férulique éthérifié (Feeth.mg.g<sup>-1</sup> CWR) ont été obtenues après hydrolyses alcalines (Morrison et al., 1994; Culhaoglu et al., 2011). L'hydrolyse alcaline douce permet de rompre uniquement les liaisons esters et libère donc uniquement les composés liés par des liaisons esters aux arabinoses ou aux sous-unités S des lignines pour l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique respectivement. L'hydrolyse alcaline forte rompt à la fois les liaisons esters et éthers permettant ainsi d'estimer la quantité d'acides féruliques impliqués dans des pontages entre hémicelluloses et lignines. Pour l'hydrolyse alcaline forte, nous avons pesé 50 mg de CWR dans une chemise en téflon puis ajouté 5 mL de soude (NaOH 4N) avant de placer les chemises dans des bombes métalliques fermées hermétiquement, contenant 3 mL d'eau osmosée et soumises pendant 2 heures et 15 minutes à 170 °C dans une étuve. Après refroidissement des bombes calorimétriques, nous avons ajouté 1 mL de solution d'étalon interne (acide anisique 1 mg.mL<sup>-1</sup>) puis acidifié la solution jusqu'à un pH=2. Pour l'hydrolyse alcaline douce, nous avons pesé 50 mg de CWR dans un bécher de 10 mL et ajouté 5 mL de soude (NaOH 2N) pendant 20 heures à l'obscurité sous agitation avant d'ajouter 1 mL de solution d'étalon interne (acide anisique 1 mg.mL<sup>-1</sup>) puis d'acidifier la solution jusqu'à un pH égal à 2 préalablement à l'extraction.

La purification des acides ainsi extraits a été réalisée selon le protocole développé par Culhaoglu et al., (2011). Brièvement, 750 µL d'échantillon acidifié sont ajoutés dans un tube Eppendorf de 2 mL contenant 1 mL d'éthanol absolu (96%) pour précipiter les polysaccharides. Ensuite nous avons ajouté 70 µL de solution d'acétate de zinc (21.9 g dans 100 ml d'eau distillée) et mélangé pendant 2 minutes afin de précipiter les protéines. Après 1 minute de repos, nous avons ajouté 70 µL de solution de ferrocyanure de potassium (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 10.6 g pour 100 ml d'eau distillée) puis mélangé 20 secondes afin de précipiter l'excédent de solution de Carrez 1. Après 10 min de centrifugation à 10 000 rpm, le surnageant a été filtré avec une seringue sur filtres Acrodisc (13 mm) avant injection en HPLC-UV pour séparer les acides *p*-hydroxycinnamiques sur une colonne Nucleoshell RP 18plus de 5 cm et de pores de 2.7 µm (Macherey-Nagel, ref 763232.20). Un pourcentage en gradient d'eau à 1 % d'acide formique et d'acétonitrile à 1% d'acide formique (de 4 à 7.5 % en 25 minutes à un débit de 250 µl/min) permet une bonne séparation des différents constituants pour déterminer les surfaces de chacun des pics élués. Après détermination des coefficients de réponses de l'acide

*p*-coumarique et de l'acide férulique grâce à l'injection d'une solution standard (0.5 mg/mL pour les acides férulique et *p*-coumarique et 1 mg/mL pour l'acide anisique), nous avons estimé les quantités de chaque composé à l'aide de l'aire relevée sur les chromatogrammes.

Les coefficients de réponses ont été calculés comme suit :

$$k(\text{PC ou Fe}) = \frac{\text{Qté}(\text{PC ou Fe}) * S(\text{a. ani})}{\text{Qté}(\text{a. ani}) * S(\text{PC ou Fe})}$$

- Où : k : Coefficient de réponse (sans unité) ;  
Qté : Masse pesée pour la solution de référence (en mg) ;  
S : Surface du pic chromatographique sur le chromatogramme ;  
PC : Acide paracoumarique ;  
Fe : Acide férulique ;  
a.ani : Acide anisique.

Les quantités d'acides férulique et *p*-coumariques ont été calculées comme suit :

$$C(\text{PC ou Fe}) = \frac{\text{Qté}(\text{a. ani}) * S(\text{PC ou Fe}) * k(\text{PC ou FE})}{S(\text{a. ani})} * \frac{1000}{m(\text{CWR})}$$

- Où : C : Concentration d'acide pour 1g de RP (en mg/g).  
Qté : Masse de solution interne de référence ajouté dans l'échantillon à analyser (mg) ;  
S : Surface du pic chromatographique résultant de la HPLC (sans unité) ;  
K : coefficient de réponse (sans unité) ;  
m(CWR) : Masse de résidus pariétaux analysés (mg) ;  
1000 : Pour ramener la quantité de PC ou Fe à 1g de RP.

### 8. La teneur en amidon

La teneur en amidon est obtenue à l'aide du kit MEGAZYME « total Starch HK » par le dosage de NADPH mesuré par l'absorbance à 340 nm. Il est formé à la suite de l'hydrolyse de l'amidon en maltodextrine, lui-même hydrolysé en D-glucose phosphorylé.

Pour cela, nous avons pesé 100 mg de MS ( $m_1$ ) dans des Falcon de 15 ml (16x100 mm), ajouté 200  $\mu$ L d'éthanol 80 % (précipitant les sucres soluble) et vortexé. Nous avons ensuite ajouté 3 mL d' $\alpha$ -amylase (à 8300 U/mL d'amidon soluble à pH 5.0 et 40 °C) et placés les tubes 6 minutes dans un bain-marie à 100 °C sous agitation. Nous avons ensuite ajouté 100  $\mu$ L d'amyloglucosidase et vortexé puis nous avons placé les tubes pendant 30 min dans un bain-marie à 50 °C sous agitation. Nous avons alors ajouté 6.7 mL d'eau distillée, vortexé puis centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm. Nous avons utilisé le surnageant pour la quantification de l'amidon au spectromètre. Pour chaque échantillon, nous avons mélangé dans une cuve de spectrophotomètre 1 ml d'eau distillée, 25  $\mu$ l d'échantillon, 50  $\mu$ l de tampon, 50

$\mu\text{l}$  de  $\text{NADP}^+$  et ATP avant de mélanger et de réaliser une première prise de DO ( $\text{DO}_1$ ) après 3 minutes avant d'ajouter 10  $\mu\text{l}$  d'hexokinase et de glucose 6 phosphate déshydrogénase et de mélanger. Puis effectuer les deuxièmes et troisièmes prises de DO après 5 minutes ( $\text{DO}_2$ ) et 7 minutes ( $\text{DO}_3$ ) respectivement (obtention de deux valeurs identiques attendue).

Calcul de la teneur en amidon dans l'échantillon :

$$A_{D\text{-glucose}} = \text{DO}_2 - \text{DO}_1$$
$$C = \frac{V * MW}{\varepsilon * d * v} * \frac{162}{180} * \Delta Ad - gluc$$

Où :	C :	Concentration en D-glucose en $\text{g.L}^{-1}$
	V :	volume final
	MW :	Masse moléculaire du D-Glucose ( $\text{g.mol}^{-1}$ ) = 180.16
	$\varepsilon$ :	coefficient d'extinction du NADPH à 340 nm = 6300 [ $\text{L} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ]
	d :	trajet optique (cm)
	v :	volume d'échantillon (mL)
	162/180 :	Ajustement pour le D-Glucose libre en anhydro D-glucose (comme observé dans l'amidon)

$$\text{Amidon.pMS} = \frac{C}{m_1} * 100$$

Où :	Amidon.pMS :	Teneur en amidon dans la MS (%)
	C :	Concentration en D-glucose en ( $\text{g.L}^{-1}$ )

## C. Présentation de l'analyse histologique

### 1. Obtention des coupes transversales des entrenœuds et coloration des coupes

De la même manière que ce qui est décrit dans Legland et al., (2017), une section transversale d'épaisseur 150  $\mu\text{m}$  des entrenœuds récoltés a été coupée à un centimètre sous le nœud supérieur de l'entrenœud portant l'épi principal avec un microtome (Gärtner et al., 2014). La coupe a été colorée avec une solution FASGA (El Hage et al., 2018) qui est une solution constituée de deux colorants (le bleu alcian et le rouge safranine (3 ml de solution de Safranine à 1 % (1 g de Safranine O (SIGMA S8884), 1 g d'acétate de sodium (SIGMA S2889), 75 ml d'éthanol 96 %, 23 ml d'eau miliQ et 2 ml de formaldéhyde (SIGMA F8775)), 11 ml de solution d'Alcian blue à 0,5 % (500 mg de bleu alcian 8GX (SIGMA S2889) dans 100 ml d'éthanol), 30 ml de glycérol, 20 ml d'eau miliQ, 1 ml d'acide acétique glacial). Brièvement, les coupes ont été trempées dans une solution de FASGA diluée dans de l'eau distillée (1:8, v/v) pendant 24 heures sous agitation à l'obscurité puis rincées à l'eau distillée pendant 24

heures sous agitation à l'obscurité. Les coupes ont ensuite été montées entre lame et lamelle et scellées avec du picodent twinsil<sup>®</sup> speed (Ref : 13001002).

### 2. Acquisition des images, analyse des images et extraction des caractères

Les images des coupes transversales colorées ont été acquises sur un microscope équipé d'un robot scanner de lame. Chaque image est acquise avec l'objectif x5 de l'Axiomager Z2 Zeiss et une caméra CoolCube 1 dont la résolution est de 1360 x 1024 pixels. La prise d'image est pilotée par le logiciel Metafer de MetaSystems qui réalise 30 points de focus par lame puis prend 4 photos, une par canal (Rouge, Vert, Bleu et fluorescence), sur 300 zones recouvrant ainsi entièrement la surface de la lamelle (22 \* 32 mm). Les photos sont ensuite assemblées par le logiciel VSide de MetaSystems. L'image assemblée est extraite au format « .tif » avec le logiciel d'imagerie Metafer (MetaSystems GmbH, Altlußheim, Allemagne) avec une résolution d'image de 5.17 µm par pixel. Les images sont ensuite réduites à un quart de leur taille avec le logiciel Irfanview et font alors en moyenne 16 millions de pixels en sortie. Les images sont expertisées en fonction de leur qualité. Les images ont ensuite été analysées avec le workflow développé par Lopez-Marnet et al. (soumis) (Chapitre II de la thèse). Brièvement, le workflow développé et présenté dans le chapitre II permet d'extraire à partir des dimensions HSV des images, 44 types tissulaires, l'aire de ces derniers est rapportée à la surface de la coupe. De plus, pour chacun de ces 44 paramètres sont extraites les valeurs moyennes des dimensions H, S et V, la valeur moyenne des canaux R, G et B ainsi que le nombre de particules (groupe de pixels) qui caractérisent l'aire.

## D. Présentation des analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisée sous Rstudio (RStudio Team, 2020). Les analyses ont été conduites sur 3 jeux de données : les données acquises au cours de l'expérimentation en 2018, les données acquises au cours de l'expérimentation en 2019 et l'association de ces deux jeux de données.

Au sein de chaque année, nous avons relevé la valeur minimale, la moyenne ainsi que la valeur maximale pour chaque variable.

A partir du jeu de données agronomiques et biochimiques acquises au cours des expérimentations effectuées sur les deux années, nous avons pu pour chaque caractère estimer un effet que l'on nommera effet « environnement » qui regroupe plusieurs types d'effets non



dissociables comme un effet année, un effet condition climatique, un effet lieu et un effet bloc à partir d'un modèle anova analysant l'effet principal de l'environnement :

$$Y_{ie} = \mu + C_e + E_{ie}$$

Où  $Y_{ie}$  est la valeur du caractère agronomique ou biochimique étudié associé à l'observation  $i$  du niveau  $e$  de l'environnement.  $\mu$  est la moyenne.  $C_e$  est le paramètre associé au niveau  $e$  du facteur environnement.  $E_{ie}$  est la valeur résiduelle aléatoire.

Puis nous avons estimé un effet génotypique à partir des 64 hybrides communs aux deux environnements à partir d'un modèle anova analysant l'effet principal du génotype :

$$Y_{ig} = \mu + D_g + E_{ig}$$

Où  $Y_{ig}$  est la valeur du caractère agronomique ou biochimique étudié associé à l'observation  $i$  du niveau  $g$  du génotype.  $\mu$  est la moyenne.  $D_g$  est le paramètre associé au niveau  $g$  du facteur génotype.  $E_{ig}$  est la valeur résiduelle aléatoire.

A partir du jeu de données histologiques acquises sur les expérimentations des deux années, nous avons pu pour chaque caractère estimer les effets génotypiques, environnement et l'interaction entre les deux au sein d'un modèle anova analysant l'effet principal du génotype, de l'environnement et de leurs interactions :

$$Y_{ieg} = \mu + C_e + D_g + (CD)_{eg} + E_{ieg}$$

Où  $Y_{ieg}$  est la valeur du caractère histologique étudié associé à l'observation  $i$  du niveau  $e$  de l'environnement et  $g$  du génotype.  $\mu$  est la moyenne.  $C_e$  est le paramètre associé au niveau  $e$  du facteur environnement.  $D_g$  est le paramètre associé au niveau  $g$  du facteur génotype.  $(CD)_{eg}$  est le paramètre d'interaction associé au niveau  $eg$  des facteurs du génotype et de l'environnement.  $E_{ieg}$  est la valeur résiduelle aléatoire.

Les graphiques de corrélation ont été réalisés en utilisant l'application « ggplot2 » (Wickham et al., 2020) pour mettre en lumière la corrélation entre deux variables. Nous avons analysé les corrélations entre chaque paramètre grâce à des matrices de corrélations (Wei et al., 2021).

Les Tableaux de régressions multiples ont été créés à partir d'informations extraites des modèles de régressions linéaires multiples retenus par la fonction « step » du package « stat » de Rstudio. Le modèle retenu a ensuite été précisé en déterminant le poids de chaque variable intégrée dans le modèle.

Les tracés de réseaux corrélatifs ont été réalisés à partir de la fonction « network\_plot » du package « corrr » de Rstudio avec un seuil de  $r = 0.3$ .

(<https://github.com/tidymodels/corrr/blob/master/R/output.R>).

## II. Résultats et discussion

### A. Variabilité des caractères agronomiques principaux et des digestibilités– Relations entre ces caractères

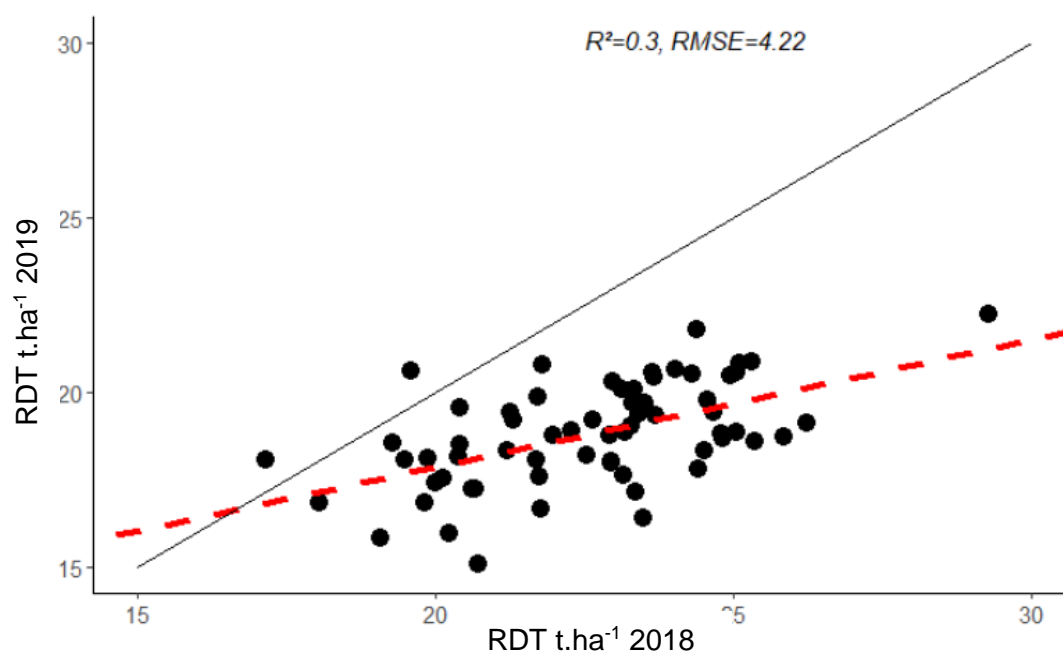
#### 1. Gamme de variation et effets du génotype et de l'environnement

La teneur en matière sèche des hybrides récoltés en 2018 et en 2019 correspond à celle préconisée pour la récolte de maïs ensilage avec une moyenne de l'ensemble des hybrides à environ 35% de matière sèche avec des minimas et maximas de 29% et 43% en fonction du génotype (Tableau 1).

**Tableau 1 : variations et effet de l'année et du génotype pour les caractères agronomiques et les digestibilités.**

Caractère	Minimum 2018	Moyenne 2018	Maximum 2018	Minimum 2019	Moyenne 2019	Maximum 2019	Effet de l'environnement	Effet du génotype	R <sup>2</sup>
MS	29.09	35.63	43.48	30.70	35.08	42.21	*	***	0.44
RDT t.ha <sup>-1</sup>	17.15	22.34	26.24	15.85	19.37	22.82	***	**	0.3
UFL	0.85	0.90	0.93	0.83	0.89	0.93	***	*	0.1
IVDMD.pMS	69.57	73.78	78.05	67.21	72.82	77.53	***	*	0.1
IVCWRDm.pCWR	33.18	38.48	44.61	31.71	36.09	40.76	***	***	0.48
CWRd.pMS	12.60	15.42	17.98	13.65	15.43	17.16		***	0.2
CWRnd.pMS	20.51	24.73	30.05	22.80	27.42	34.69	***	***	0.25
CWR.pMS	34.68	40.15	46.34	37.30	42.85	50.83	***	**	0.13
Amidon.pMS	20.47	30.83	39.62	25.87	33.3	42.94	***	*	0.11

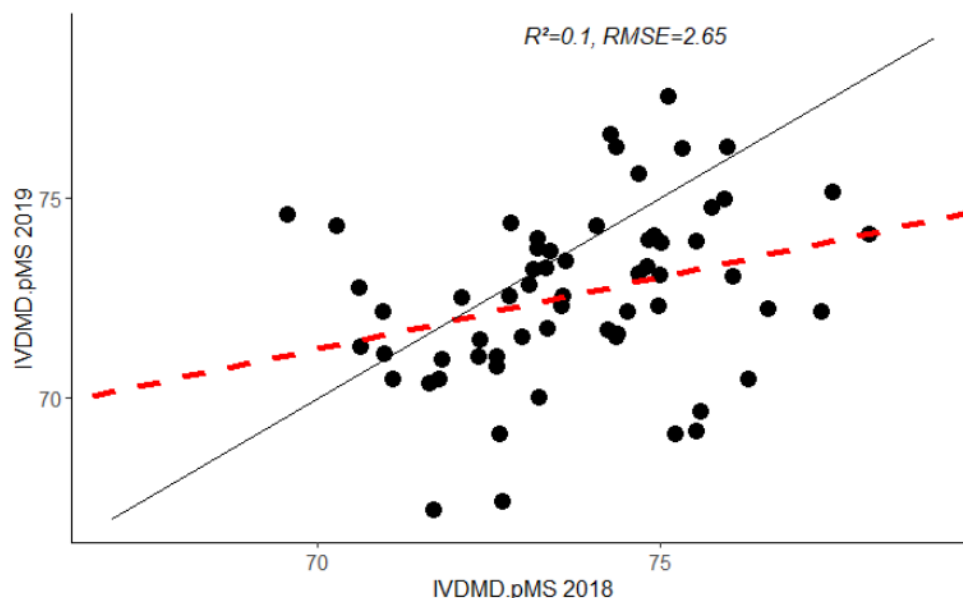
Le rendement, exprimé en tonne de matière sèche par hectare, varie entre 15 à 26 t.ha<sup>-1</sup> de MS sur les deux années. En moyenne, le rendement est plus élevé en 2018 à Hédé qu'en 2019 à Villampuy avec 22.3 et 19.37 t.ha<sup>-1</sup>, respectivement (Tableau 1). Au sein de chaque année, nous pouvons quand même noter une variation de l'ordre de presque 10 t.ha<sup>-1</sup> sur le rendement des différents hybrides modernes. Dans Baldy et al., (2017), les auteurs confirmaient le progrès génétique pour le rendement autour de 0.11 t.ha<sup>-1</sup>. Dans cette étude (communication personnelle), ils mettaient aussi en évidence cette large gamme de variation de rendement chez les hybrides modernes. En effet les hybrides modernes présents dans cette étude présentaient des rendements compris entre 16 et 22 t.ha<sup>-1</sup>. Le rendement présente un effet environnemental élevé et significatif. Il affiche aussi un effet génotypique significatif. Le coefficient de détermination (R<sup>2</sup>) entre les deux années s'élève à 0.3 (Tableau 1, Figure 2).



**Figure 2 : Relation entre les valeurs de rendement enregistrées au cours des deux années de culture.**  $R^2$  = coefficient de détermination, RMSE = erreur quadratique moyenne.

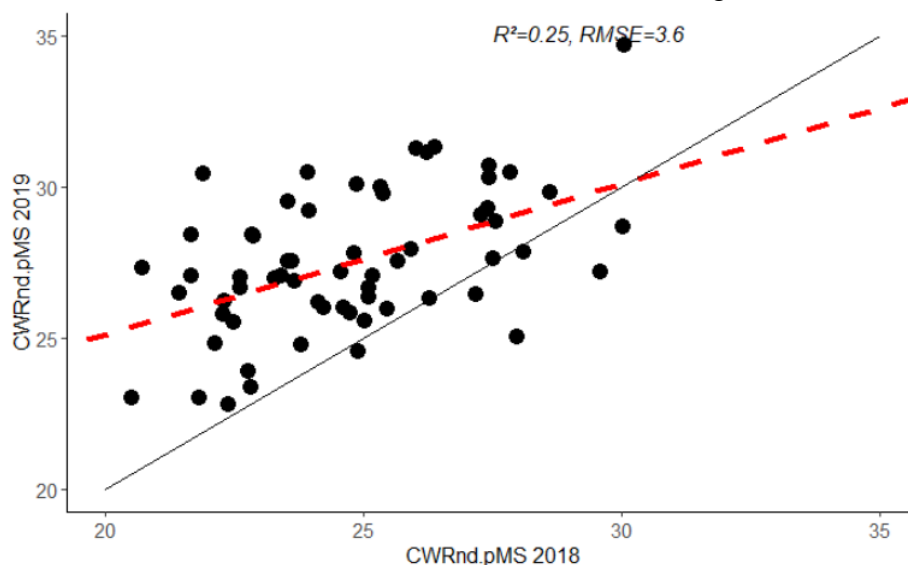
L’UFL pour les deux années est en moyenne de 0.9 et affiche une variation d’environ 0.1 point. Dans Baldy et al., (2017), les hybrides modernes présentaient des valeurs UFL qui variaient, elles aussi, entre 0.86 et 0.92. Cette gamme de variation reste très importante surtout lorsque l’on garde en mémoire que 0.05 UFL équivalent à 1.8kg de lait supplémentaire par vache et par jour (Barrière and Emile, 2000). Le modèle de Peyrat et al., (2016) présenté dans l’introduction pour estimer l’UFL via le calcul offre un rôle crucial à l’IVDMD alors que la teneur en MAT ne modifie qu’assez peu les valeurs estimées. De par ce calcul, l’UFL et la digestibilité de la MS sont corrélées à 1 entre elles. C’est la raison pour laquelle, pour la suite des analyses nous nous concentrerons sur l’IVDMD.

La variation des IVDMD obtenues en 2018 et en 2019 est d’environ 10 points (Tableau 1). Il y a un effet génotypique significatif de cette variation au sein des hybrides modernes et nous observons une corrélation entre la digestibilité de la matière sèche des hybrides de 2018 et celles de 2019 avec un coefficient de détermination ( $R^2$ ) de 0.1 (Tableau 1 et figure 3). Entre les deux années il y a un impact environnemental très significatif, l’environnement influence la digestibilité de la matière sèche qu’il faut nuancer avec une différence entre les moyennes deux années qui est de 1 point (Tableau 1). Nous reviendrons sur ce point à différentes reprises dans le manuscrit et choisissons dans la suite de ce travail de valoriser cette variabilité dans nos analyses en regardant les variations du jeu de données au sein de chaque environnement ainsi que dans le jeu de données complet.



**Figure 3 : Relation entre les deux années de culture pour le caractère de digestibilité IVDMD.**  $R^2$  = coefficient de détermination, RMSE = erreur quadratique moyenne.

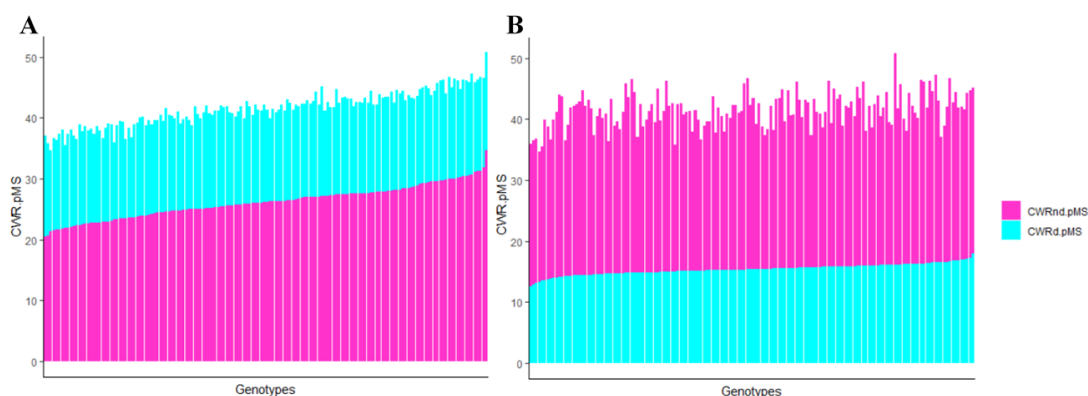
La paroi peut être divisée en deux compartiments, une paroi digestible (CWRd.pMS) et une paroi non digestible (CWRnd.pMS) dont les teneurs dans la matière sèche sont estimées par calcul à partir de la digestibilité de paroi (IVCWRDm.pCWR) et de la teneur en paroi (CWR.pMS). La teneur en CWRnd, l'IVCWRDm.pCWR ou le CWR sont sujets à un effet environnemental très significatif. La teneur en CWRnd présente une différence de 3 points entre les moyennes des hybrides de chaque année soit 24.73 et 27.42 % pour 2018 et 2019 respectivement, variant de 10 et 12 % respectivement en fonction de l'année (Tableau1, Figure 4). La teneur en CWRnd est aussi soumise à un effet génotypique important et possède un coefficient de détermination ( $R^2$ ) de 0.25 entre les deux années (Figure 4).



**Figure 4 : Relation entre les deux années de culture pour le caractère de teneur en paroi non digestible CWRnd.**  $R^2$  = coefficient de détermination, RMSE = erreur quadratique moyenne.

La teneur en paroi digestible (CWRd) est en moyenne équivalente en 2018 et 2019 (15.46 %MS). Cette valeur varie d'environ 5 % entre 12.59 et 17.97 %MS. Il y a un effet génotypique significatif avec un coefficient de détermination ( $R^2$ ) de 0.2 entre 2018 et 2019.

Sur l'ensemble des teneurs en parois de la population, j'ai retenu des modes de visualisation de la proportion de teneur en paroi digestible et non digestible en ordonnant de façon croissante la teneur en paroi non digestible (en rose, Figure 5a).

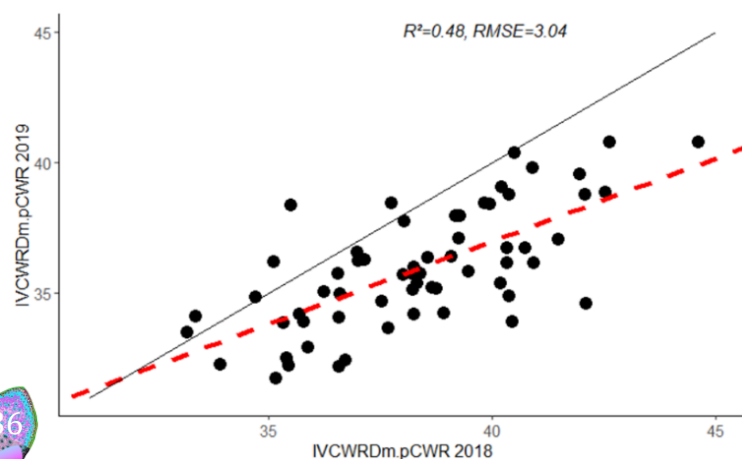


**Figure 5 : Représentation graphique des teneurs en paroi et de la répartition de teneur en paroi digestible et non digestible ordonnées (A) selon la teneur en paroi non digestible, (B) selon la teneur en paroi digestible.**

Nous remarquons que la teneur en paroi augmente très similairement à celle de la teneur en parois non digestible. Cette relation n'est pas retrouvée lorsque l'on ordonne les génotypes en fonction du CWRd (en bleu, Figure 5b). Les variations de la digestibilité de la paroi IVCWRDm.pCWR intègrent les variabilités des deux compartiments, mais dans notre situation les variations du CWRd sont moins prépondérantes que celles du CWRnd.

La digestibilité de la paroi (IVCWRDm.pCWR) affiche quant à elle une différence de 2.5 points en moyenne entre les années avec 38.48 et 36.09 %CWR en 2018 et 2019 respectivement. La digestibilité de la paroi est fortement impactée par le génotype et varie entre 31 et 44% en fonction de l'année. De plus, l'IVCWRDm présente un coefficient de détermination ( $R^2$ ) de 0.48 entre les deux années (Tableau 1 & Figure 6), indiquant que les variations apportées par les génotypes sont répétables d'une année à l'autre.

**Figure 6 : Corrélation entre la digestibilité de la paroi en 2018 et en 2019.**  $R^2$  = coefficient de détermination, RMSE = erreur quadratique moyenne.

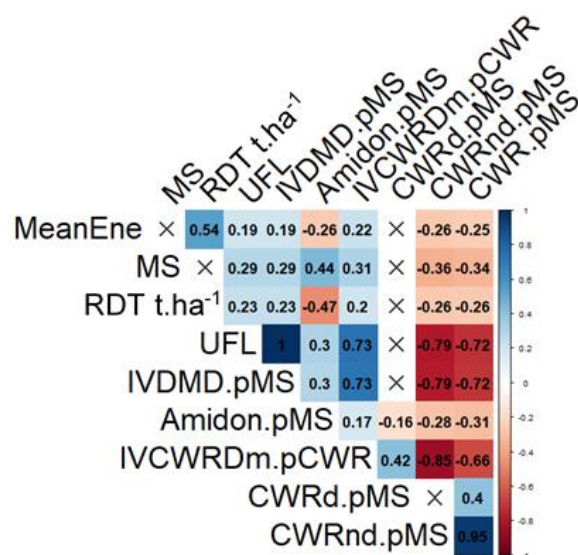




## 2. Relations entre les caractères agronomiques et les digestibilités

La digestibilité de la matière sèche et le rendement en biomasse des hybrides modernes sont significativement et positivement corrélés avec un coefficient ( $r$ ) de 0.23. Cela nous montre qu'il est possible d'avoir des hybrides combinant un bon rendement et une bonne digestibilité (Figure 7). Comme discuté dans Baldy et al., (2017), la chute de la digestibilité des hybrides de maïs liée à une sélection unidirectionnelle pour le rendement a bien été stoppée pour permettre, dans la sélection moderne, de proposer à la fois des hybrides aux rendements élevés et présentant une bonne digestibilité de la matière sèche.

La digestibilité de la MS est corrélée négativement principalement à la teneur en paroi (CWR, -0.72) et encore plus fortement à la teneur en paroi non digestible (CWRnd, -0.79). Au sein du jeu de données le CWRd est corrélé positivement à la digestibilité de la paroi et aussi à la teneur en paroi avec un  $r$  de 0.42 et 0.40, respectivement (Figure 7). De plus il n'est pas corrélé à la teneur en CWRnd (Figure7) et au rendement. CWRnd affiche des corrélations négatives et significatives avec les caractères agronomiques et avec la digestibilité. En effet, la teneur en paroi non digestible est ainsi fortement impactante sur les digestibilités et la valeur UFL par extension (Andrieu et al., 1999; Sauvart and Noziere, 2013; Peyrat et al., 2016).



**Figure 7 : Matrice de corrélation ( $r$ ) entre les paramètres agronomiques, des digestibilités et les teneurs en paroi, paroi digestible, paroi non digestible. MeanEne = longueur moyenne de l'entreœud sous épi.**

### 3. Modèles d'explication des variations de digestibilité

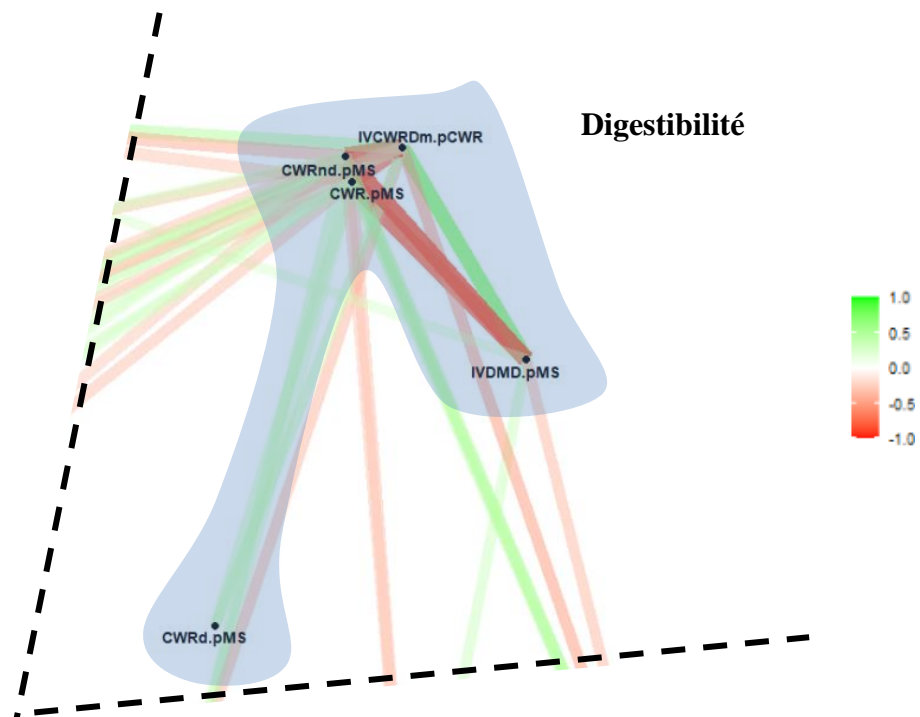
Nous avons réalisé des analyses de régressions multiples pour expliquer les variations de digestibilité de la matière sèche en considérant chaque année séparément d'une part mais aussi en analysant ensemble les deux années (Tableau 2). Les variables explicatives fournies pour la construction de ces modèles sont celles présentées au-dessus. Le meilleur modèle à un seul régresseur pour expliquer les variations d'IVDMD utilise la variable CWRnd comme le montre déjà les corrélations présentées dans la partie précédente. Cette variable permet ainsi d'expliquer entre 49 % (année 2018) et 75 % (année 2019) des variations de digestibilité de la matière sèche. Dès lors que l'on cherche à construire un modèle à 2 régresseurs, la combinaison de variables qui permet d'expliquer significativement la plus grande part des variations d'IVDMD fait appel à IVCWRDm et CWR (Tableau 2). Ce modèle à 2 régresseurs présente des R<sup>2</sup> comparables à ceux atteints par le modèle utilisant uniquement CWRnd comme variable explicative des variations de digestibilité de matière sèche.

La digestibilité de la matière sèche est donc principalement expliquée par l'association de la digestibilité de la paroi et de la teneur en parois, pouvant être synthétisée à un seul paramètre en la personne de CWRnd. L'estimation du CWRnd (%MS) combine en effet ces deux caractères (cf calcul dans le matériel et méthodes). De plus le CWRnd sur les deux années conjointes est significativement et positivement corrélé à la teneur en paroi et négativement et significativement à la digestibilité de la paroi avec un coefficient de corrélation (r) de 0.95 et -0.85 respectivement (Figure7).

**Tableau 2 : Modèles de régressions multiples pour expliquer les variations de l'IVDMD,** Pour chaque modèle sont indiqués les régresseurs, en vert le régresseur a un signe positif dans le modèle, en rouge le régresseur a un signe négatif dans le modèle, R<sup>2</sup>= coefficient de détermination, AIC = critère d'information d'Akaike.

Biochimie	2018	2019	2018/2019
IVDMD.pMS	1: IVCWRDm.pCWR + CWR.pMS R <sup>2</sup> :0.517 AIC: 42.42	1: IVCWRDm.pCWR + CWR.pMS R <sup>2</sup> :0.753 AIC:4.68	1: IVCWRDm.pCWR + CWR.pMS R <sup>2</sup> : 0.632 AIC: 64.61
	2: IVCWRDm.pCWR R <sup>2</sup> : 0.420 AIC: 54.87	2: IVCWRDm.pCWR R <sup>2</sup> :0.589 AIC:41.01	2: IVCWRDm.pCWR R <sup>2</sup> : 0.532 AIC: 99.41
	3: CWR.pMS R <sup>2</sup> :0.348 AIC: 64.08	3: CWR.pMS R <sup>2</sup> :0.637 AIC:31.57	3: CWR.pMS R <sup>2</sup> : 0.515 AIC: 105.08
	4: CWRnd.pMS R <sup>2</sup> :0.491 AIC: 44.59	4: CWRnd.pMS R <sup>2</sup> : 0.747 AIC:4.68	4: CWRnd.pMS R <sup>2</sup> :0.623 AIC: 66.02

Le réseau de corrélations entre les caractères présenté en Figure 8 montre comment la teneur en CWRd se détache complètement du regroupement de la digestibilité de la matière sèche, de la digestibilité de la paroi et des teneurs en paroi et en paroi non digestible (groupe bleu, Figure 8). Donc la variabilité de l'IVCWRDm est bien plus impactée par la variabilité de la teneur en CWRnd qu'en CWRd qui par conséquent reflète directement la teneur en parois du fait de la corrélation très forte entre le CWRnd et la teneur en CWR. Dans ce contexte, nous pourrions conclure que diminuer la teneur en paroi suffit à améliorer la digestibilité de la MS, ce qui aurait pour conséquence de réduire la teneur en paroi non digestible. Séparer les deux paramètres CWRnd et CWRd permettrait à la partie digestible de la paroi d'être mise en avant pour utiliser ses corrélations positives avec la teneur en paroi et la digestibilité de la paroi.



**Figure 8 : Réseaux des corrélations au sein des estimations de digestibilité et de teneurs en paroi.**

Les cibles d'amélioration de la digestibilité de la matière sèche sont donc très claires et dans la suite de ce manuscrit, nous allons nous consacrer à la recherche de cibles biochimiques et histologiques permettant d'améliorer IVCWRDm, CWRnd et CWRd.

L'amélioration de la digestibilité de la paroi ou de la teneur en paroi non digestible sont probablement deux visions d'une même stratégie d'amélioration de la digestibilité de la MS et sont très similaires.

## **B. Variabilité et impact des caractères biochimiques et histologiques sur les variations de digestibilité de paroi – De la variabilité à la conception d'idéotypes**

Comme nous l'avons montré dans la partie précédente, la digestibilité de la paroi, la teneur en paroi non digestible et la teneur en paroi digestible sont les cibles qui peuvent nous permettre d'améliorer la digestibilité de la matière sèche et nous allons donc nous focaliser sur leur étude.

### **1. Variabilité de la digestibilité de paroi, de la composition biochimique des parois et des paramètres histologiques**

Les 156 échantillons retenus sur un bloc des deux années d'expérimentation ont été caractérisés en chimie humide pour leurs digestibilités et la composition de leur paroi (Tableau 3) et pour leur profil histologique par analyse d'image de coupes colorées au FASGA et analysées au moyen du workflow présenté dans le chapitre 2 (Tableau 4).

La digestibilité de paroi comme la teneur en paroi non digestible varient d'environ 10 points pour chacune des deux années (de 33.18 à 44.66 %CWR à Hédé en 2018 et de 31.71 à 40.76% CWR à Villampuy en 2019 ; Tableau 3). Cette gamme de variation est assez comparable à celles rencontrées dans la littérature sur des lignées non mutées pour le gène Brown Midrib 3 (Méchin et al., 2000, 2000), sur des lignées choisies pour présenter une faible gamme de variation en teneur en lignine (Zhang et al., 2011) mais tout de même plus réduite que la gamme de variation observée pour des cultures de lignées soumises à un stress hydrique et à des conditions irriguées (El Hage et al., 2018). Les hybrides choisis pour représenter les hybrides précoces majeurs du marché français au cours de la sélection ensilage depuis les années 1960 jusqu'en 2015 représentent un matériel de choix pour maximiser les variations de digestibilité de paroi. Cependant dans le travail présenté par (Baldy et al., 2017), la gamme de variation enregistrée pour le DINAG (digestibilité de la partie non amidon et non glucides solubles, un autre type d'estimateur par le calcul de la digestibilité de paroi) n'est que de 6 points. En 2000, Barrière and Emile présentent une gamme de variation d'environ 10 points sur du matériel hybride dans lequel de bons allèles de digestibilité ont été introduits. L'analyse du jeu de données acquis sur les 2 blocs retenus montre aussi un effet génotypique très significatif pour les caractères de digestibilité pariétale (Tableau 3), indiquant que malgré le

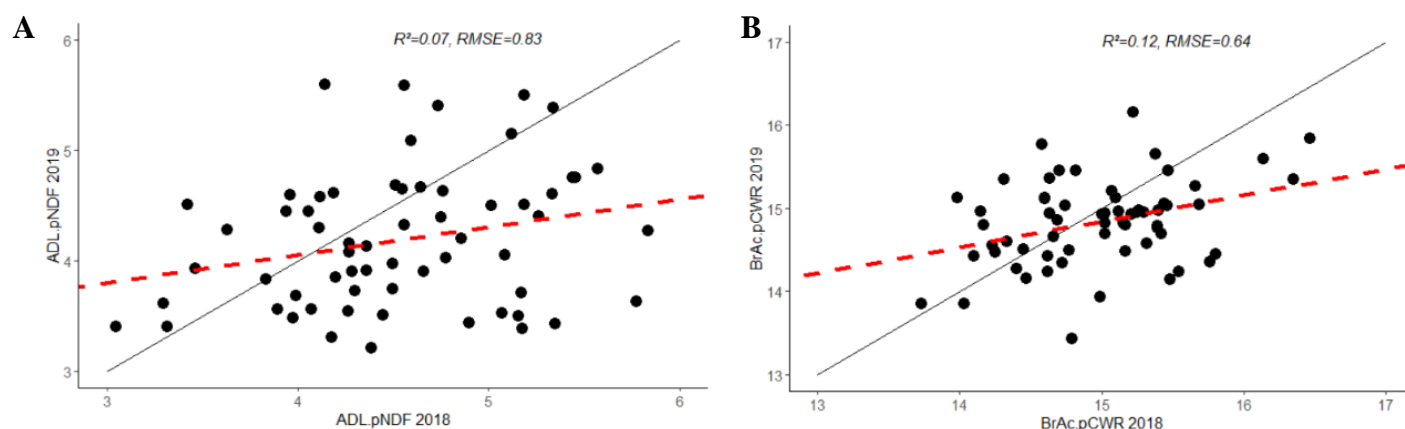
fort impact de l'environnement sur ces variables, les hybrides les plus digestibles une année le sont restés l'autre année ( $R^2 = 0.48$  ; Tableau 3 et Figure 6).

**Tableau 3 : Variabilité et effet de l'année et du génotype pour les caractères biochimiques, NA = valeurs manquante.**

Caractère	Minimum 2018	Moyenne 2018	Maximum 2018	Minimum 2019	Moyenne 2019	Maximum 2019	Effet de l'environnement	Effet du génotype	R <sup>2</sup>
IVCWRDm.pCWR	33.18	38.48	44.61	31.71	36.09	40.76	***	***	0.48
Amidon.pMS	20.47	30.83	39.62	25.87	33.30	42.94	***	*	0.11
NDF.pMS	29.60	37.32	43.30	34.00	39.11	44.70	***	*	0.11
CWR.pMS	34.68	40.15	46.34	37.30	42.85	50.83	***	**	0.13
CWRd.pMS	12.60	15.42	17.98	13.65	15.43	17.16		***	0.2
CWRnd.pMS	20.51	24.73	30.05	22.80	27.42	34.69	***	***	0.25
ADL.pNDF	3.05	4.53	5.83	3.21	4.19	5.60	***		0.07
BrAc.pCWR	13.73	14.90	16.47	13.43	14.82	16.16		*	0.12
LK.CWR	12.51	14.36	16.65	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cellulose.pNDF	44.55	47.05	49.44	42.06	46.17	48.29	***	**	0.16
Hemicellulose.pNDF	44.72	48.42	52.35	46.60	49.64	54.41	***	**	0.18
H.µmol.g.ABL	7.87	11.91	19.30	5.99	11.18	20.73	*	***	0.49
G.µmol.g.ABL	231.99	299.56	376.51	224.78	317.95	414.62	***	***	0.26
S.µmol.g.ABL	236.51	309.93	427.54	235.92	331.22	466.74	***	**	0.16
rdt.total.µmol.g.ABL	497.09	624.24	771.79	501.05	663.40	878.05	***	**	0.15
S_G.ABL	0.75	1.04	1.32	0.70	1.05	1.33		***	0.53
Pcest.mg.gCWR	12.92	15.50	20.48	12.64	14.71	18.27	***	**	0.21
Feest.mg.gCWR	7.54	9.35	10.98	7.37	9.41	11.55			0.01
Feeth.mg.gCWR	0.68	3.13	5.28	0.46	3.32	6.09			0

La teneur en amidon varie entre 20 et 40 %MS avec des moyennes proches de 30 %MS chacune des deux années (Tableau 3). Cette teneur moyenne de 30% étant celle préconisée pour permettre une bonne alimentation des troupeaux (Barrière et al., 1997) mais des variations peuvent être corrigées via les complémentations des rations. La teneur moyenne en paroi est de l'ordre de 40% et se trouve dans la gamme de teneur en parois optimum pour maintenir le pH du rumen de la vache (INRA, 2018).

Nous avons utilisé trois méthodes différentes d'estimation de la teneur en lignine. Que ce soit par l'estimation via la méthode Van Soest (lignine ADL, Tableau 3 et Figure 9a), via la méthode du bromure d'acétyle (lignine BaAc, Tableau 3 et Figure 9b) et via la méthode Klason (lignine klason, Tableau 3 uniquement pour l'année 2018), les valeurs de teneur en lignine varient d'environ 3 points chaque année (Tableau 3 et Figure 9). Les teneurs en lignine ADL et en BrAc entre les deux années restent assez faiblement corrélées ( $R^2$ ) 0.07 et 0.12 respectivement (Tableau 3, Figure 9).



**Figure 9 : Relation entre les teneurs en lignines en 2018 et 2019.** Pour la teneur en (A) lignine Van Soest (ADL.pNDF) et (B) lignine au bromure d'acétyle (BrAc.pCWR).

Cette gamme de variation est proche de celle observée par Zhang et al., (2011) alors que ces auteurs avaient choisi leur matériel végétal pour limiter les variations de teneur en lignine tout en conservant une gamme de variation importante des digestibilités. Dans les travaux développés sur les hybrides au cours des périodes de sélection, Baldy et al., (2017) avaient déjà noté cette stabilisation de la teneur en lignine (communication personnelle). Il semblerait ainsi que les hybrides modernes sélectionnés aient fixé une teneur en lignine comparable entre eux. Cette teneur en lignine a peut-être été empiriquement fixée lors des étapes de sélection pour permettre de bonnes propriétés agronomiques sans impacter négativement la digestibilité. Ces gammes de variation réduites des teneurs en lignines laissent ainsi de la place pour mettre à jour d'autres variables clés pour expliquer les variations de digestibilité de paroi et par là même pour identifier d'autres cibles d'amélioration de la digestibilité.

Le rendement total en sous-unités  $\beta$ O4 comme la teneur en acide *p*-coumarique estérifié varie quasiment du simple au double chaque année avec une amplitude de plus de 300  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de lignine pour le rendement  $\beta$ O4 et de 7  $\text{mg.g}^{-1}$  de CWR pour l'acide *p*-coumarique estérifié (Tableau 3). Ces variations sont encore plus importantes que celles observées parmi les lignées dans le travail de (Zhang et al., 2011) où la teneur en lignine variait peu. Les variations de teneurs en acide férulique estérifié ou étherifié sont aussi très importantes et bien plus que dans le travail de Zhang et al., (2011).

Pour la très grande majorité des caractères biochimiques, un effet année très significatif est observé ainsi que des effets génotypes forts et significatifs excepté pour ADL.pNDF (corroborant avec la faible gamme de variation observée pour ce caractère mentionné ci-dessus),  $\text{Fe}_{\text{est}}$  et  $\text{Fe}_{\text{eth}}$  (Tableau 3).



En 2018, pour l'ensemble des hybrides deux entrenœuds sous l'épis principal (ENE) ont été coupés, colorés, les images acquises et les analyses d'images réalisées. En 2019 l'ensemble de ces analyses ont été réalisées sur 4 ENE pour chaque hybride. Ces répétitions au sein de chaque bloc en 2018 et en 2019 nous ont permis de tester la significativité des effets de l'année, du génotype et de leurs interactions (cf matériels et méthodes). Le workflow utilisé segmente automatiquement les images de coupes transversales d'entre-nœuds de maïs colorées au FASGA en 44 tissus distincts : 29 tissus dans l'écorce, 10 tissus dans la moelle et 5 tissus dans les faisceaux (Tableau 4).

**Tableau 4 : Variabilité et effet de l'année et du génotype ainsi que de l'interaction entre le génotype et l'année pour les caractères histologiques.**

Caractère histologiques	Minimum 2018	Moyenne 2018	Maximum 2018	Minimum 2019	Moyenne 2019	Maximum 2019	Effet de l'environnement	Effet du génotype	Effet d'interaction	R <sup>2</sup>
Surface.coupe.reel.cm <sup>2</sup>	1.09	1.74	2.80	1.26	1.93	2.63	***	***	***	0.04
Faisceau.surface.reel.psection	0.85	2.94	4.97	1.48	3.05	4.71	***	***	***	0.23
Surface.tissu.“dark”.psection	4.64	9.28	15.92	6.61	11.25	16.14	***	***	*	0.11
Surface.tissu.“light”.psection	84.08	90.65	95.36	75.55	88.62	93.39	***	***	***	0.03
Surface.Moelle.psection	79.36	85.35	89.39	76.63	82.51	86.89	***	***	***	0.1
Surface.Ecorces.psection	7.75	11.18	16.51	9.54	12.91	18.55	***	***	**	0.1
Parenchyme.peu.lignifié.psection	37.13	67.23	86.30	10.06	29.51	77.38	***	***	*	0.26
Parenchyme.lignifié.psection	0.70	17.33	43.57	5.66	52.66	71.86	***	***	*	0.23
<b>Caractères associés au Rind “dark”</b>										
TRD1.psection	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	***		***	0.13
TRD2.psection	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.02	***	***	**	0.05
TRD3.psection	0.08	0.30	0.67	0.03	0.23	0.66	***	***	***	0.21
TRD4.psection	0.01	0.16	0.55	0.09	0.32	0.86	***	***	*	0.15
TRD5.psection	0.01	0.12	0.65	0.03	0.19	0.72	***	***		0.03
TRD6.psection	0.79	1.44	2.54	0.43	1.23	2.29	***	***		0.21
TRD7.psection	0.50	1.69	4.28	0.94	2.29	5.06	***	***		0.15
TRD8.psection	0.01	1.71	4.53	0.00	0.86	3.67	***	***		0.05
TRD9.psection	0.03	1.04	2.62	0.01	0.58	2.36	***	***		0.06
<b>Caractères associés au Rind “light”</b>										
TRL1.psection	0.00	0.05	0.83	0.00	0.01	0.23	***	***	***	0.13
TRL2.psection	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	***	***	***	0.08
TRL3.psection	0.00	0.31	1.51	0.03	0.15	0.56	***	***	***	0.05
TRL4.psection	0.87	2.23	4.18	0.71	1.94	3.74	***	**	**	0.24
TRL5.psection	0.05	0.39	1.33	0.02	0.43	1.60	***	**		0.18
TRL6.psection	0.00	0.01	0.08	0.00	0.00	0.05	***	***	***	0.1
TRL7.psection	0.01	0.05	0.15	0.01	0.05	0.15	***		***	0.09
TRL8.psection	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.03		*		0
TRL9.psection	0.00	0.01	0.07	0.00	0.00	0.03		**	*	0
<b>Caractères associés à l'épiderme</b>										
TE1.psection	0.00	1.03	3.85	0.07	2.78	6.15	***	***		0.04
TE2.psection	0.00	0.64	3.45	0.03	1.85	5.72	***	***		0.01

Caractère histologiques	Minimum 2018	Moyenne 2018	Maximum 2018	Minimum 2019	Moyenne 2019	Maximum 2019	Effet de l'environnement	Effet du génotypes	Effet d'interaction	R <sup>2</sup>
<b>Caractères associés à la moelle</b>										
TM1.psection	0.23	8.79	23.78	2.74	24.01	32.52	***	***	***	0.19
TM2.psection	8.19	25.28	48.76	0.73	7.85	36.69	***	***	***	0.14
TM3.psection	0.04	0.24	0.52	0.03	0.14	0.58		***		0
TM4.psection	0.47	8.53	28.98	2.92	28.65	45.67	***	***	**	0.2
TM5.psection	25.80	41.95	57.89	8.95	21.66	42.23	***	***	***	0.11
TM6.psection	0.00	0.17	0.57	0.00	0.07	0.52		***		0
TM7.psection	0.00	0.13	0.36	0.01	0.07	0.38	***	***	*	0.04
TM8.psection	0.01	0.19	0.57	0.00	0.04	0.27	***	***	***	0.07
TM9.psection	0.00	0.05	0.12	0.00	0.02	0.13		***		0.01
<b>Caractères associés aux Faisceaux</b>										
TB1.psection	0.11	0.43	1.25	0.06	0.36	1.05	***	**	*	0.15
TB2.psection	0.42	1.66	3.35	0.81	1.58	2.77	***		***	0.1
TB3.psection	0.14	0.42	0.82	0.31	0.76	1.50	***	***		0.06
TB4.psection	0.11	0.44	1.15	0.05	0.34	1.13	***	***		0.18
TB5.psection	0.01	0.28	0.84	0.07	0.32	0.68	***	**	***	0.12
<b>Distinction entre les différents degrés de digestibilité des tissus digestibles de la moelle</b>										
TM2a.psection	4.31	19.11	41.31	0.30	5.55	33.30	***	***	***	0.09
TM2b.psection	0.73	6.17	16.91	0.08	2.30	11.76	***	***	***	0.33
TM5a.psection	11.55	27.03	53.66	3.02	13.56	36.34	***	***	***	0.03
TM5b.psection	2.70	14.93	39.48	0.41	8.10	23.16	***	***	***	0.3
TM1a.psection	0.00	0.34	2.62	0.04	7.78	24.97	***	***	*	0.03
TM1b.psection	0.23	8.46	21.59	2.70	16.23	23.96	***	***	***	0
TM4a.psection	0.01	0.71	5.98	0.31	11.41	39.39	**	***		0.02
TM4b.psection	0.46	7.82	26.23	2.51	17.24	32.52	***	***	**	0.05

Les surfaces de parenchyme lignifié (coloré en rouge au FASGA) occupent en moyenne 17.33% de la section de coupe en 2018 alors qu'elles occupent 52.66% de la section en 2019 (Tableau 4). A l'inverse, les surfaces de parenchyme non-lignifié (coloré en bleu au FASGA) occupent en moyenne 67.23% de la section et seulement 29.51% de la section respectivement en 2018 et en 2019. Cela traduit une différence notable de coloration entre les deux blocs retenus en 2018 et en 2019 avec un bloc en 2018 (Hédé) qui présente des parenchymes globalement plus bleus que rouge alors que pour le bloc 2019 (Villampuy) les parenchymes apparaissent plus rouges que bleus (Tableau 4, Figure 10 et Figure 11). Cette différence entre les deux années augmente la gamme de variation des données sur l'ensemble du jeu de données sans qu'aucun artefact de manipulation n'en soit responsable, il s'agit là d'un effet environnemental réel qui apporte encore plus de richesse au jeu de données.

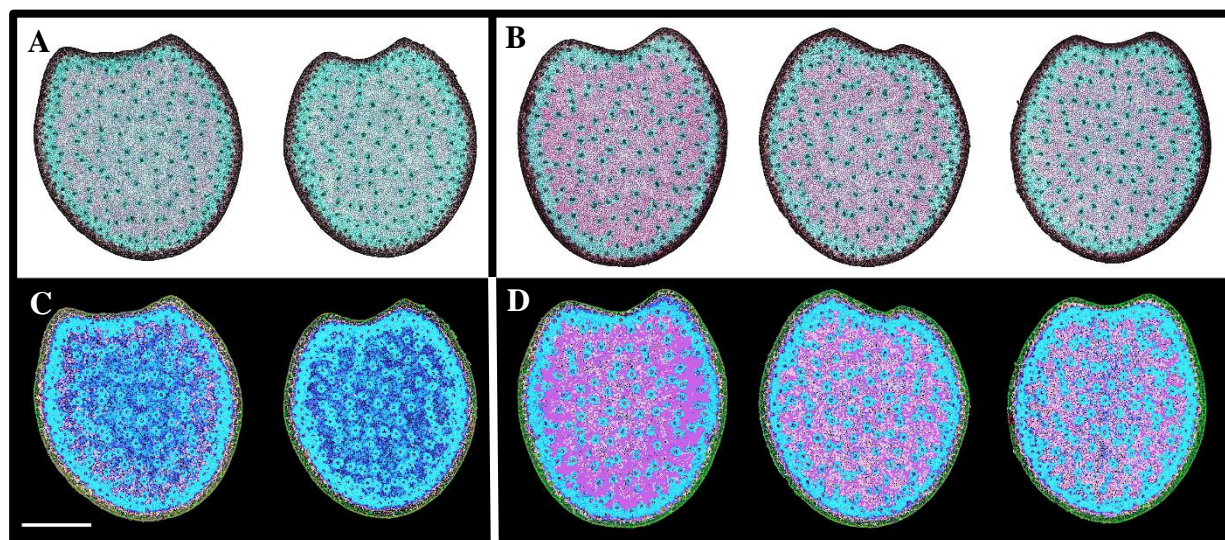


Figure 10 : Images acquises sur des coupes transversales d'entrenœud colorées au FASGA de l'hybride D025 (A) sur les 2 entrenœuds de la culture réalisée en 2018 à Hédé et (B) sur les 3 entrenœuds de la culture réalisée en 2019 à Villampuy. Profils obtenus après l'analyse de ces images avec le workflow développé par Lopez-Marnet et al. (Soumis) (C) sur les 2 entrenœuds de la culture réalisée en 2018 et (D) sur les 3 entrenœuds de la culture réalisée en 2019.

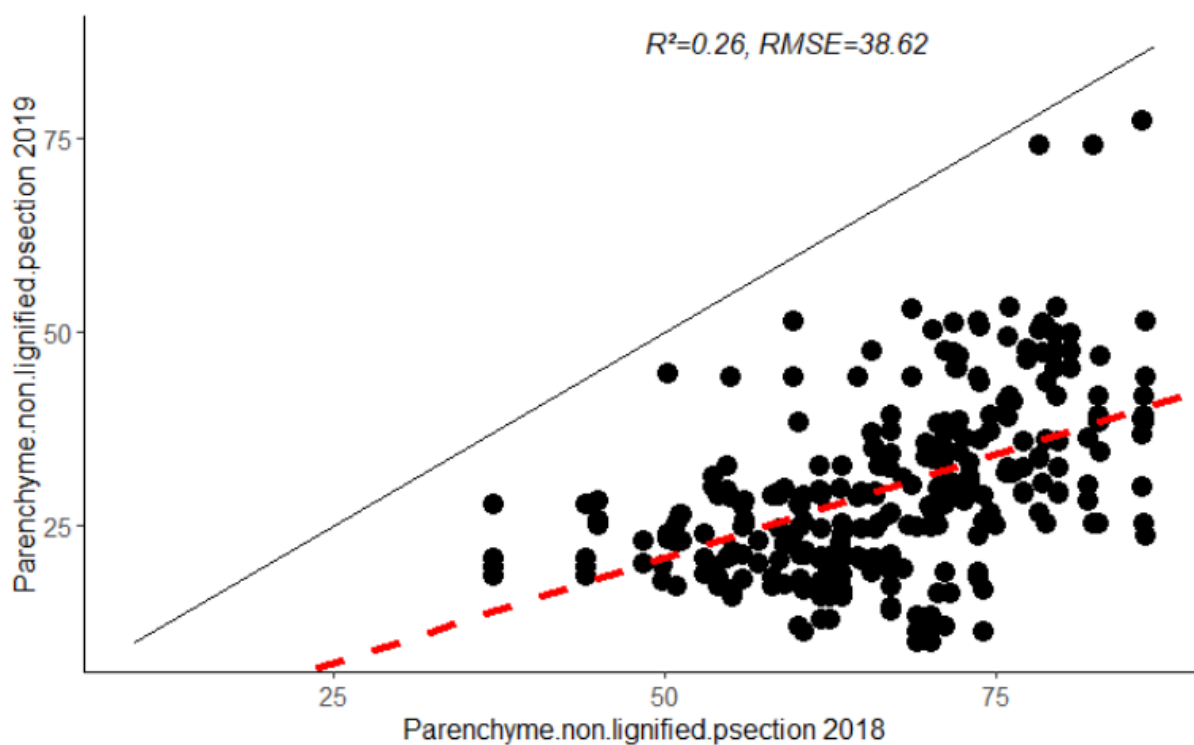


Figure 11 : Relation entre la surface de parenchyme non lignifié en 2018 et 2019.

De façon générale, des effets génotypiques significatifs forts sont observés pour la majorité des variables histologiques (excepté pour TRL 8 et 9 et TM3, 6 et 9 qui sont des tissus qui s'étendent sur moins de 0.1 % de la surface de la coupe). Les effets années sont aussi significatifs et élevés pour la plupart des caractères. Les interactions génotype x année restent plus faibles et sont absentes pour la moitié des caractères. L'effet génotype est donc prépondérant pour la majorité des caractères, suggérant que les quantifications du profil histologique d'un entrecœud d'hybride proposées sont en partie héréditaires.

Les paramètres descriptifs de l'écorce présentent une variabilité faible et représentent au maximum 5 % de la section (TRD7, Tableau 4). Cependant des effets génotypiques forts ont été observés pour ces tissus de l'écorce. Les tissus qui composent la moelle présentent également des variations importantes et occupent une part beaucoup plus élevée de la coupe avec TM1, TM2, TM4 et TM5 qui peuvent représenter jusqu'à 50 % de la section. Au sein de ces tissus de la moelle, le workflow permet également de distinguer la partie la plus digestible (b) de celle plus récalcitrante (a) (Chapitre II de la thèse). Cette décomposition des tissus de la moelle a permis de mettre en évidence des variations et des effets génotypiques importants pour ces différents tissus de la moelle (Tableau 4). Enfin, les 5 tissus descriptifs des faisceaux représentent une faible part de la section avec au maximum 3% pour TB2 (Tableau 4).

## C.Relations entre les paramètres biochimiques et la digestibilité de paroi

### 1. Corrélations

Les principales variables biochimiques corrélées à l'IVCWRDm ou inversement corrélées à la teneur CWRnd sont la teneur en paroi (-0.66 et 0.95 respectivement, Figure 12 et 14), la teneur en lignine BrAc dans la paroi (-0.47 et 0.47, Figure 12, 13A et 14), le rendement  $\beta$ O4 (-0.39 et 0.41, Figure 12, 13B et 14) et la teneur en acide *p*-coumarique (-0.27 et 0.21, Figure 12, 13C et 14). Cette corrélation entre digestibilité de paroi et teneur en paroi est régulièrement rapportée dans la littérature (Lundvall et al., 1994; Argillier et al., 1996; Méchin et al., 2000). La très forte corrélation significative entre CWR et CWRnd indique bien que l'augmentation de la teneur en paroi est fortement due à une augmentation de la teneur en paroi non digestible. Mise à part la teneur en paroi, la teneur en lignine permet d'expliquer 22 % des variations de digestibilité de paroi (Figure 13A), la quantité de sous-unité de lignine liées par

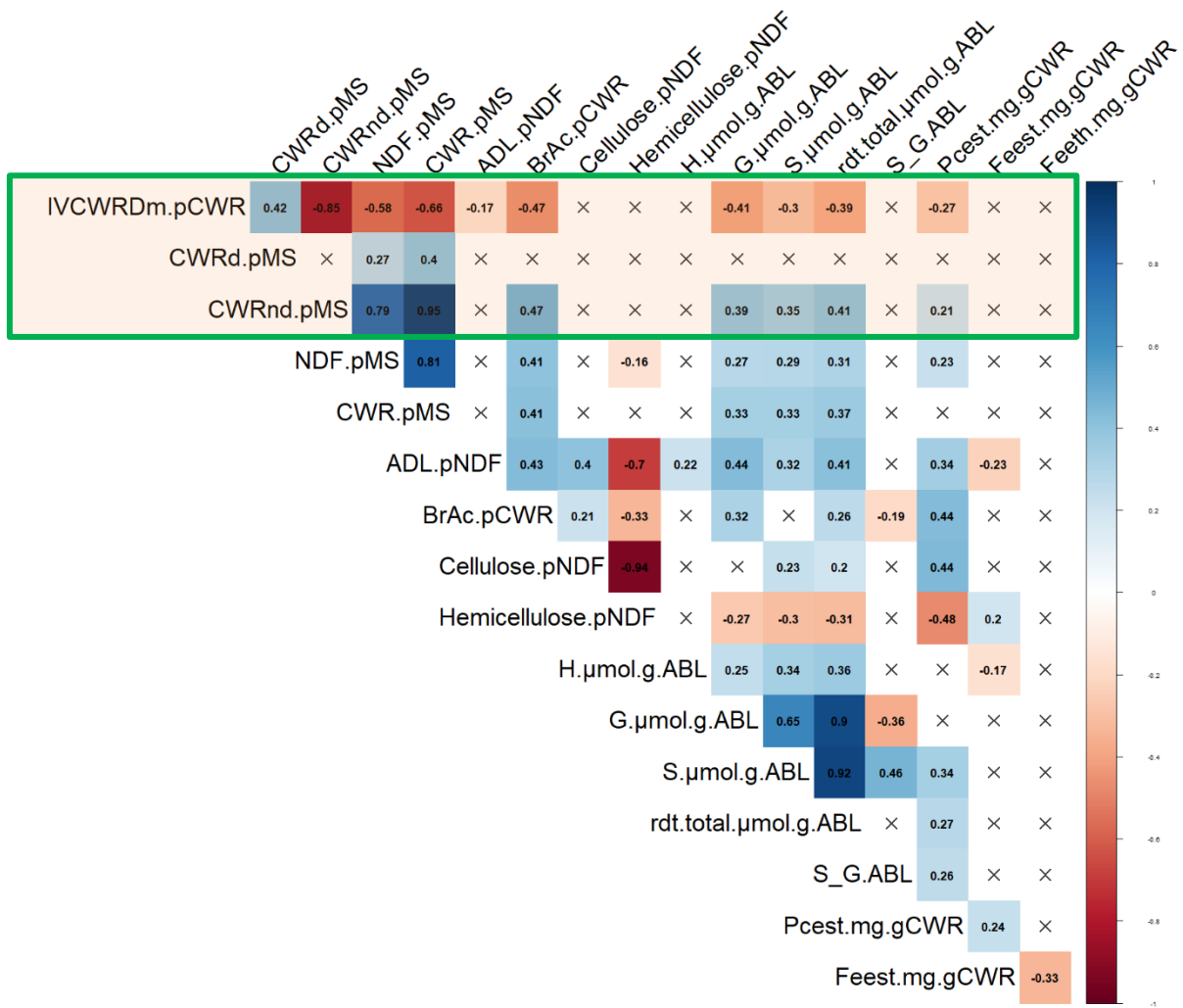


Figure 12 : Matrice de corrélations sur le jeu de données acquis sur les blocs analysés en 2018 et 2019.

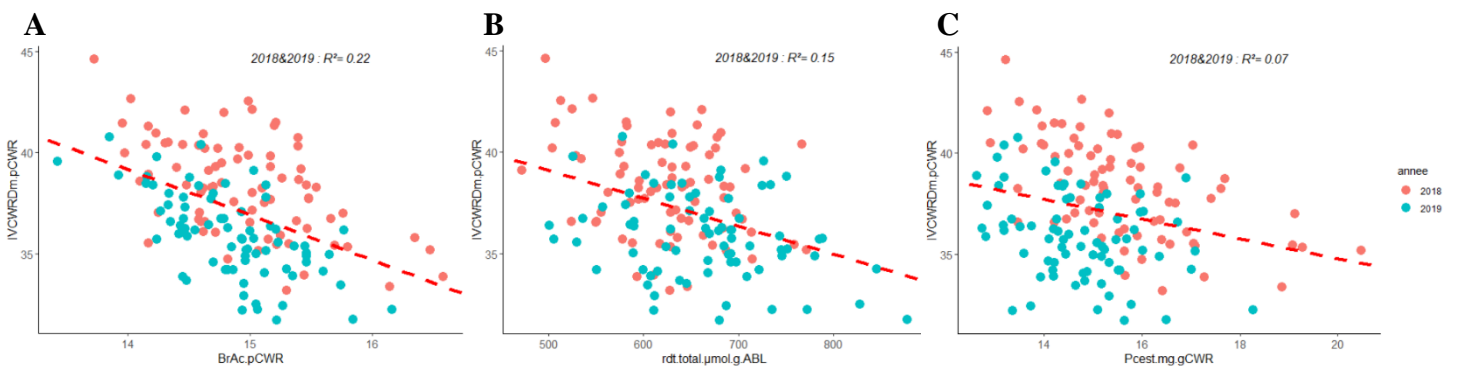
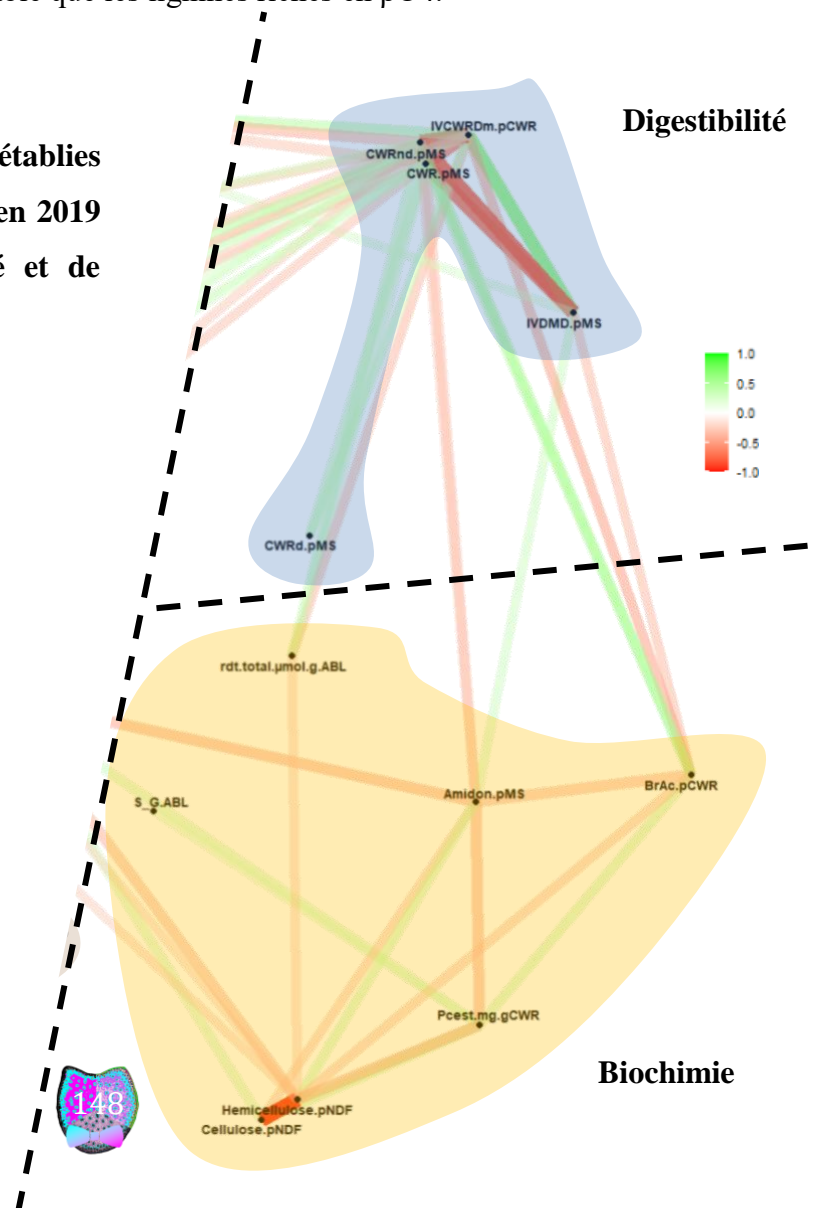


Figure 13 : Corrélation entre la digestibilité *in vitro* de la paroi et (A) la teneur en lignine BrAc, (B) le rendement de βO4et (C) la teneur en acide *p*-coumarique.



des liaisons  $\beta$ O4 15 % (Figure 13B) et la teneur en acide *p*-coumarique 7 % (Figure 13C). Même si la gamme de variation de la teneur en lignine est restreinte sur ce jeu de données, les 3 points de variation réussissent à expliquer une part importante des variations de digestibilité de paroi. Ensuite, comme dans l'étude développée par Zhang et al., (2011) où la teneur en lignine variait peu, ce sont la structure de la lignine et la teneur en acide *p*-coumarique qui apparaissent les plus corrélées à la digestibilité pariétale. Une lignine plus riche en liaisons  $\beta$ O4 est plus linéaire et limite la digestibilité. L'impact d'une lignine linéaire est très bien illustré par les études de modélisation moléculaire développées par l'équipe de Karim Mazeau (Besombes and Mazeau, 2005). Dans leurs travaux, ces auteurs ont montré qu'un oligomère de lignine contenant seulement des liaisons  $\beta$ O4 s'adsorbe à plat sur la surface pour maximiser les interactions avec la cellulose. En revanche, un oligomère contenant des liaisons 5-5 et/ou  $\beta$ -5 ne peut pas s'orienter parallèlement à la surface pour optimiser son interaction avec la cellulose. Ainsi, les lignines riches en liaisons  $\beta$ O4 auraient une forme plus étendue, susceptible de s'adsorber tout le long de la surface, alors que la forme plus globulaire des lignines condensées conduit à un taux de couverture plus faible que les lignines riches en  $\beta$ O4.

**Figure 14 : Réseau des corrélations établies sur les données acquises en 2018 et en 2019 pour les caractères de digestibilité et de composition biochimique de la paroi.**





La présence d'acide *p*-coumarique sur les sous unités S des lignines est aussi un facteur limitant de la digestibilité de paroi cité dans différentes études (Méchin et al., 2000b; Zhang et al., 2011; El Hage et al., 2018).

En ce qui concerne le CWRd, aucune corrélation significative n'est observée avec les variables biochimiques, justifiant probablement le fait que cette estimation de la digestibilité est peu retenue dans la littérature.

### **2. Meilleurs modèles explicatifs des variations de digestibilités de paroi obtenus par régression multiple à partir des données biochimiques**

La matrice de corrélation présentée dans la partie précédente (Figure 12) a été réalisée sur l'ensemble des données acquises sur les deux années. Si l'on regarde année par année, les corrélations principales sont un peu différentes. En 2018 notamment, la part d'explication des variations de digestibilité de paroi prise en charge par les variations de teneur en acide *p*-coumarique est d'un peu plus de 30 % comme pour les variations de teneur en lignine (Tableau 5). Par contre, en 2019 la variation de teneur en lignine est la principale source d'explication de la variation de digestibilité soit près de 43 % (Tableau 5). Ainsi, même si les variables explicatives simples restent les mêmes, leur degré d'implication est variable selon l'environnement considéré. Dans le jeu de données analysé, l'environnement réduit la part de variabilité de l'IVCWRD ou du CWRnd expliquée par la teneur en lignine (BrAc) (Figure 13A). Effectivement, la variation de la digestibilité pariétale expliquée par la teneur en lignine atteint 30 ou 40 % chaque année alors que sur les deux années elle n'atteint que 20 % sur l'ensemble des deux années (Tableau 5). Il y a donc d'autres facteurs que cette teneur en lignine qui sont impliqués dans la variation de la digestibilité pariétale observée sur les 2 années analysées. En revanche, la part de variation de la digestibilité pariétale expliquée par les caractères biochimiques ne diminue pas lorsqu'on analyse les années séparément ou conjointement ( $R^2$  des modèles toujours au-delà de 30 %).

Si l'on cherche maintenant à expliquer les variations de digestibilité de paroi en combinant plusieurs variables biochimiques, deux paramètres ressortent en 2018 : les teneurs en acide *p*-coumarique estérifié (PCest) et en lignine (Brac) pour les données de 2018 ( $R^2 = 0.433$  modèle 3, Tableau 5) et uniquement la teneur en lignine (BrAc) pour les données de 2019 ( $R^2 = 0.429$  modèle 4 Tableau 5).

**Tableau 5 : Modèles de régressions pour expliquer les variations de teneur en CWRnd.pMS et d'IVCWRDm.pCWR en fonction de caractères biochimiques de composition de la paroi.** Pour chaque modèle sont indiqués les régresseurs, en vert le régresseur a un signe positif dans le modèle, en rouge le régresseur a un signe négatif dans le modèle, R<sup>2</sup>= coefficient de détermination, AIC = critère d'information d'Akaike.

Biochimie	2018	2019	2018/2019
<b>CWRnd.pMS</b>	1: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR + ADL.pNDF + G.μmol.g.ABL + Feeth.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.483 AIC:88.02	1: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + H.μmol.g.ABL + Feest.mg.gCWR + Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.563 AIC: 68.09	1: BrAc.pCWR + rdt.total.μmol.g.ABL + ADL.pNDF R <sup>2</sup> :0.350 AIC: 239.59
	2: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR + ADL.pNDF R <sup>2</sup> :0.449 AIC:89.04	2: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + H.μmol.g.ABL + Feest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.549 AIC: 68.48	2: BrAc.pCWR + rdt.total.μmol.g.ABL R <sup>2</sup> : 0.309 AIC: 247.1
	3: BrAc.pCWR+ Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> : 0.433 AIC: 89.27	3: BrAc.pCWR+ ADF.pNDF+ H.μmol.g.ABL R <sup>2</sup> : 0.536 AIC:68.62	3: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> : 0.222 AIC: 263.34
	4: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> :0.337 AIC:99.7	5: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> : 0.429 AIC:80.15	
	5: Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> : 0.313 AIC:102.5		
<b>IVCWRDm.pCWR</b>	1: Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR + pS.ABL + Feeth.mg.gCWR + pH.ABL + pG.ABL + Cellulose.pNDF + RDT_.T_Ha R <sup>2</sup> :0.547 AIC: 93.03	1: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + pS.ABL + Pcest.mg.gCWR + Feest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.546 AIC: 64.29	1: BrAc.pCWR + rdt.total.μmol.g.ABL R <sup>2</sup> :0.295 AIC: 242.32
	2: Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR + pS.ABL + Feeth.mg.gCWR + pH.ABL + pG.ABL R <sup>2</sup> :0.519 AIC: 93.92	2: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + pS.ABL + Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.52 AIC: 66.3	2: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> :0.220 AIC:255.98
	3: Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR + pH.ABL R <sup>2</sup> :0.440 AIC: 99.85	3: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + pS.ABL R <sup>2</sup> : 0.498AIC: 67.83	
	4: Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR R <sup>2</sup> :0.425 AIC: 100.04	4: BrAc.pCWR + ADF.pNDF R <sup>2</sup> : 0.479 AIC:68.61	
	5: Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.340 AIC: 108.85	5: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> : 0.402 AIC:76.97	
	6: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> :0.295 AIC: 114.09		

En 2018, le PCest lui seul permet d'expliquer environ 30 % de la digestibilité pariétale. Ainsi l'ajout de la teneur en lignine permet d'augmenter de 10 % la part de variation de la digestibilité pariétale expliquée. Ces 2 paramètres biochimiques expliquent donc une part commune des variations de digestibilité de paroi mais néanmoins, la teneur en acide *p*-coumarique permet d'apporter des informations explicatives supplémentaires en 2018. En 2000, Méchin et al., avaient mis en avant pour la première fois le rôle prépondérant de l'acide *p*-coumarique dans les explications des variations de digestibilité de paroi au-delà de la seule teneur en lignine. Dans Zhang et al., (2011), lorsque les variations de teneur en lignine sont limitées, ces auteurs ont montré le rôle majeur de la combinaison de la teneur en lignine et en acide *p*-coumarique pour rendre compte des variations de digestibilité de paroi. En 2019 la teneur en acide *p*-coumarique n'est pas retenue par les modèles pour expliquer les variations de digestibilité de paroi et aucun autre paramètre biochimique ne permet d'augmenter le R<sup>2</sup> des

modèles explicatifs. Ainsi l'impact du profil biochimique des biomasses récoltées sur la digestibilité de leur paroi est différent entre les résultats de 2018 et ceux de 2019. L'analyse conjointes des données acquises en 2018 et en 2019 montre que le BrAc n'explique plus qu'environ 22 % de la variation du CWRnd ou de l'IVCWRDm.pCWR. Malgré la faible variabilité de la teneur en lignine dans les parois (2 % de variation seulement sur l'ensemble des deux années), c'est elle qui reste toujours identifiée en premier par les différents modèles établis. Le meilleur modèle explicatif sur les deux années à 2 régresseurs combine la teneur en lignine et la quantité de monolignols liés en  $\beta$ O4 (Tableau 5) pour expliquer ensemble 31 % des variations de CWRnd.pMS et 30 % des variations de l'IVCWRDm.pCWR. Ainsi une meilleure digestibilité de paroi serait obtenue en limitant la teneur en lignine dans la gamme déjà contrainte par les processus de sélection et en privilégiant des lignines condensées et donc pauvres en liaisons  $\beta$ O4 pour limiter l'encombrement et l'adsorption de ce polymère sur le polymère de cellulose (Besombes and Mazeau, 2005).

Si l'on tente d'ajouter une troisième variable dans le modèle sur les deux années expliquant les variations de teneur en CWRnd.pMS, la teneur en lignine Van Soest (ADL) est recrutée pour expliquer avec les deux variables précédentes 5 % supplémentaires des variations de digestibilité de paroi. Le signe de la lignine ADL dans ce modèle indique qu'une plus forte teneur permet une meilleure digestibilité, insistant ici très clairement sur le fait qu'une lignine condensée est plus propice à une meilleure digestibilité qu'une lignine riche en liaison  $\beta$ O4 et non-condensée. Ces différences entre les estimateurs des teneurs en lignine ont largement été discutées dans Zhang et al., (2011) : ces auteurs démontrent comment la core-lignine principalement dosée dans le protocole Van Soest est une lignine condensée contrairement à la lignine Klason qui est une représentation plus exhaustive de la teneur en lignine. La teneur en lignine estimée par la méthode BrAc représente aussi cette lignine « totale » plutôt que la seule lignine de cœur très condensée privilégiée par le protocole Van Soest (Fukushima and Hatfield, 2004; Zhang et al., 2011; Fukushima et al., 2015).

Sur les deux années, la combinaison de variables biochimiques pour expliquer les variations de digestibilité de paroi permet de rendre compte au maximum de 35 % de ces variations. Nous allons maintenant nous interroger sur la capacité des variables histologiques à rendre compte de ces variations de digestibilité de paroi.

## D. Relations entres les paramètres histologiques et la digestibilité de paroi

### 1. Corrélations

Comme pour les caractères biochimiques, nous retrouvons une assez grande redondance dans les corrélations affichées par l'ensemble des caractères histologiques avec l'IVCWRDm et la CWRnd (Figure 15). Les corrélations les plus notables impliquent des tissus dans toutes les régions de la coupe. Les corrélations significatives les plus élevées avec la digestibilité de paroi concernent la surface de moelle ( $r = 0.38$ , Figure 15), la surface d'écorce ( $r = -0.34$ , Figure 15), la surface de parenchyme lignifié ( $r = -0.41$ , Figure 15) et la surface de parenchyme non-lignifié ( $r = 0.42$ , Figure 15). Chacune de ces 4 variables peut expliquer à elle seule environ 15 % des variations de digestibilité de paroi. De façon rapide, cela revient à dire qu'un hybride digestible doit favoriser la proportion de moelle et/ou limiter sa proportion d'écorce et que la moelle doit être peu lignifiée. En 2005, Méchin et al., posaient pour la première fois l'hypothèse selon laquelle un idéotype de maïs ensilage de bonne digestibilité devait privilégier la lignification de son cortex et limiter celle de sa moelle. Grace au workflow que j'ai développé (Lopez-Marnet et al. soumis ; chapitre de II de la thèse), nous pouvons aller jusqu'à une échelle tissulaire très fine, pour comprendre l'importance de la répartition de la lignification dans l'entre-nœud sur la digestibilité de la plante. Ainsi, 4 des 10 tissus segmentés dans la moelle présentent de fortes corrélations avec la digestibilité de paroi : TM1 ( $r = -0.4$ , Figure 15), TM4 ( $r = -0.4$ , Figure 15), TM2 ( $r = 0.36$ , Figure 15) et TM5 ( $r = 0.42$ , Figure 15). Comme le montre le Tableau 4, ces tissus affichent tous des valeurs élevées en termes de surfaces occupées sur la section. Il ne s'agit donc pas de tissus minoritaires mais de tissus qui constituent une partie importante de l'entre-nœud.

Le workflow développé offre la possibilité d'accéder encore à une échelle supérieure de précision en différenciant, au sein des tissus de la moelle, les tissus les plus faciles à digérer des tissus les plus récalcitrants.

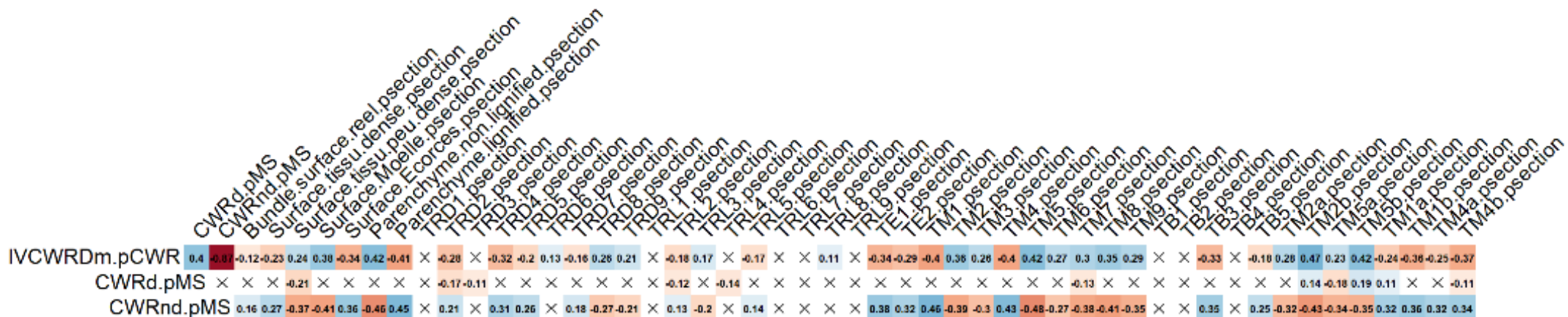


Figure 15 : Matrice de corrélations sur les 2 années entre les digestibilités et les paramètres histologiques (Annexe Figure 1).

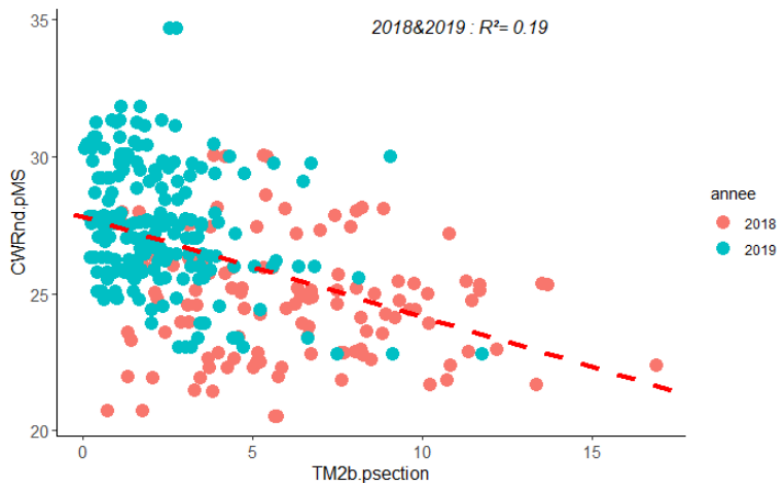


Figure 16 : Relation entre la teneur en CWRnd.pMS et la surface de TM2b.pSection en 2018 et 2019.

Ainsi, au sein des 4 tissus de la moelle évoqués au-dessus, il apparait très clairement qu'il est important au sein de TM1, 2, 4 et 5 de favoriser la présence des tissus TM2 et TM5 de type « b » (corrélation avec la digestibilité de paroi : TM2b  $r = 0.47$  et TM5b  $r = 0.42$ ) mais surtout et encore plus de limiter la présence des tissus TM1 et TM4 de type « b » (corrélation avec la digestibilité : TM1b  $r = -0.38$ , TM4b  $r = -0.37$ ) non digestibles par attaque enzymatique (Lopez-Marnet et al. (soumis ; chapitre de II de la thèse)). Comme le montre la Figure 16, l'effet de l'année de culture sur la coloration bleu/rouge de la moelle des hybrides présenté en début de chapitre et illustré par la Figure 10, reste très présent dans ce jeu de données. Nous pensons que l'impact de l'environnement sur ce caractère est important à prendre en compte et à valoriser dans la compréhension du rôle de la lignification des tissus sur la digestibilité de paroi.

## 2. Meilleurs modèles explicatifs des variations de digestibilité de paroi obtenus par régression multiple à partir des données histologiques

Si l'on cherche à combiner plusieurs variables histologiques explicatives des variations de digestibilité de paroi et que l'on pose cette question sur le jeu de données 2018, sur le jeu de données 2019 et sur le jeu de données conjoint on constate, comme pour la biochimie, des différences par année (Tableau 6).

**Tableau 6 : Modèles de régressions pour expliquer les variations de la teneur en CWRnd.pMS et d'IVCWRDm.pCWR en fonction de caractères histologiques.** Pour chaque modèle sont indiqués les régresseurs, en vert le régresseur a un signe positif dans le modèle, en rouge le régresseur a un signe négatif dans le modèle, R<sup>2</sup>= coefficient de détermination, AIC = critère d'information d'Akaike.

Histologie	2018	2019	2018/2019
CWRnd.pMS	3: TM7.psection+ TM2a.psection + TRD6.psection + TB5.psection + TRD4.psection + TRL5.psection + TM2b.psection + TM1a.psection + TM4b.psection + TRD1.psection+ TRD3.psection + TM1b.psection R <sup>2</sup> :0.516 AIC: 128.81	4: TM2b.psection + TB5.psection + TRL3.psection + TRD5.psection R <sup>2</sup> :0.246 AIC :277.49	3: TM2b.psection + TM5a.psection + TRL5.psection + TB5.psection + TM2a.psection + TE1.psection + TRD9.psection R <sup>2</sup> :0.394 AIC: 464.9
	4: TM7.psection+ TM2a.psection + TRD6.psection + TB5.psection + TRD4.psection + TRL5.psection + TM2b.psection R <sup>2</sup> : 0.376 AIC:149.88	5: TM2b.psection + TB5.psection + TRL3.psection R <sup>2</sup> : 0.222 AIC :281.7	4: TM2b.psection + TM5a.psection + TRL5.psection + TB5.psection + TM2a.psection + TE1.psection R <sup>2</sup> :0.364 AIC: 478.59
	5: TM7.psection+ TM2a.psection + TRD6.psection + TB5.psection R <sup>2</sup> : 0.278 AIC:161.67	6: TM2b.psection + TB5.psection R <sup>2</sup> :0.173 AIC :291.93	5: TM2b.psection + TM5a.psection + TRL5.psection + TB5.psection + TM2a.psection R <sup>2</sup> :0.346 AIC: 485.58
	6: TM7.psection+ TM2a.psection R <sup>2</sup> :0.164 AIC:175.67	7: TM2b.psection R <sup>2</sup> :0.080 AIC:311.29	6: TM2b.psection + TM5a.psection + TRL5.psection R <sup>2</sup> :0.294 AIC: 506.33
	7: TM7.psection R <sup>2</sup> :0.122 AIC:179.61		7: TM2b.psection + TM5a.psection R <sup>2</sup> :0.265 AIC: 517.24
			7bis: TM2b.psection+ TB5.psection R <sup>2</sup> :0.245 AIC: 525.98
			8: TM2b.psection R <sup>2</sup> :0.186 AIC:548.27



Histologie	2018	2019	2018/2019
IVCWRDm.pCWR	2: TRD3.psection + TRL2.psection + TM2b.psection + TM4b.psection + TRD6.psection + TM4a.psection R <sup>2</sup> : 0.327 AIC: 160.73	2: TM2b.psection + TB5.psection + TRL4.psection +TRD8.psection + TRL3.psection R <sup>2</sup> :0.243 AIC: 265.32	2: TM2b.psection + TM3.psection + TRD2.psection + TRL5.psection + TB5.psection + TRL1.psection + TRD3.psection + TRD4.psection R <sup>2</sup> :0.392 AIC: 441.77
	3: TRL1.psection + TM2b.psection + TRD3.psection + TRL2.psection + TM5b.psection + TM4b.psection R <sup>2</sup> :0.347 AIC: 157.01	3: TM2b.psection + TB5.psection + TRL4.psection + TRL3.psection R <sup>2</sup> :0.228 AIC: 267.27	3: TM2b.psection + TM3.psection + TRD2.psection + TRL5.psection R <sup>2</sup> :0.347 AIC:456.81
	4: TRL1.psection + TM2b.psection + TRD3.psection + TRL2.psection R <sup>2</sup> :0.248 AIC:170.35	4: TM2b.psection + TB5.psection + TRL4.psection R <sup>2</sup> :0.202 AIC:272	4: TM2b.psection + TM3.psection + TRD2.psection R <sup>2</sup> :0.291 AIC: 481.16
	5: TRL1.psection + TM2b.psection R <sup>2</sup> :0.157 AIC:180.23	5: TM2b.psection + TB5.psection R <sup>2</sup> : 0.151 AIC:282.36	5: TM2b.psection + TM3.psection R <sup>2</sup> :0.251 AIC:496.99
	6: TM2b.psection R <sup>2</sup> :0.057 AIC:191.89	6: TM2b.psection R <sup>2</sup> : 0.094 AIC: 293.2	6: TM2b.psection R <sup>2</sup> : 0.220 AIC:508.15

Au niveau histologique, pour expliquer les variations du CWRnd deux paramètres sont communs aux modèles obtenus avec les données de 2018 ou de 2019 : TM2b (tissu médullaire coloré en bleu au FASGA et très digestible ; ce paramètre diminue la teneur en paroi non digestible et augmente la digestibilité de paroi) et TB5 (tissus du phloème des faisceaux ; augmente la teneur en parois non digestible). Ces deux paramètres sont aussi identifiés lorsque les modèles sont établis sur les données cumulées de 2018 et de 2019. Alors qu’avec un seul paramètre histologique, nous expliquions environ 22% (TM2b) des variations de digestibilité de paroi, en associant plusieurs variables histologiques, nous réussissons à expliquer jusqu’à 40% des variations de digestibilité de paroi observées sur les 2 années. En 2018, ce pourcentage d’explication atteint même 52%. Ainsi à eux seuls, les paramètres histologiques peuvent expliquer plus de pourcentage de variations de la teneur en paroi non digestible que les données biochimiques seules ; néanmoins si ces modèles sont valides statistiquement, ils restent sur-paramétrés. Sur les jeux de données des deux années, TM2b est le premier paramètre qui est retenu et il est corrélé négativement au CWRnd ( $r = -0.43$ , Figure 15) et positivement à IVCWRDm ( $r = 0.47$ , Figure 15). Il explique à lui seul entre 18 et 22 % des variations de digestibilité de paroi ou de teneur en paroi non-digestible (Figure 15 et 16). L’ajout du TB5 au modèle permet d’augmenter de 6 % l’explication de la variabilité du CWRnd. Ainsi, si on veut améliorer la digestibilité il faut diminuer la teneur en CWRnd / augmenter la digestibilité de paroi et donc augmenter la surface de TM2b (bleu très digestible) et diminuer le TB5 (phloème des faisceaux). Si les paramètres TM2b et TM5b (tissus bleus très digestibles et corrélés entre eux  $r=0.84$ ) sont éliminés de l’analyse des modèles, ce sont des tissus très denses et lignifiés comme le TE1, TM1b et TM4a qui sont retenus en premier, suggérant qu’il faudrait diminuer leurs surfaces pour diminuer la teneur en CWRnd et augmenter la digestibilité de la paroi.

La teneur en paroi digestible (CWRd) est un paramètre peu ou pas présent dans la littérature (Peyrat, 2014) et pour cause il ne peut pas être expliqué de façon conséquente au moyen des paramètres biochimiques ( $R^2 = 0.23, 0.078, 0.068$  pour les modèles complets en 2018, 2019 et 2018/2019 respectivement, Tableau 7).

**Tableau 7 : Modèles de régressions pour expliquer la teneur en CWRd.pMS en fonction de caractères Biochimiques.** Pour chaque modèle sont indiqués les régresseurs, en vert le régresseur a un signe positif dans le modèle, en rouge le régresseur a un signe négatif dans le modèle,  $R^2$ = coefficient de détermination, AIC = critère d'information d'Akaike.

Biochimie	2018	2019	2018/2019
CWRd.pMS	1: LK.pCWR + Cellulose.pNDF + Feest.mg.gCWR + Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR R <sup>2</sup> : 0.234 AIC: -13.55	1: S.G.ABL + Cellulose.pNDF R <sup>2</sup> : 0.078 AIC: -44.3	1: pS.ABL + Pcest.mg.gCWR + Feest.mg.gCWR R <sup>2</sup> : 0.063 AIC: -45.31
	2: Feest.mg.gCWR + Pcest.mg.gCWR + Cellulose.pNDF R <sup>2</sup> : 0.146 AIC: -8.97	2: S.G.ABL R <sup>2</sup> : 0.047 AIC: -43.78	2: pS.ABL + Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> : 0.044 AIC: -44.14
	3: LK.pCWR + Cellulose.pNDF + Feest.mg.gCWR + Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> : 0.213 AIC: -13.55		3: pS.ABL R <sup>2</sup> : 0.018 AIC: -42.03
	4: LK.pCWR R <sup>2</sup> : 0.137 AIC: -12.16		4: Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> : 0.015 AIC: -41.5

En revanche, les modèles complets pour expliquer CWRd construits à partir de paramètres histologiques ont des  $R^2$  de 0.35, 0.19 et 0.25 en 2018, 2019 et 2018/2019 respectivement (Tableau 8). Ces derniers identifient des tissus peu ou pas digestibles TM2a et TM5a corrélés négativement alors que les tissus TM2b et TM5b sont corrélés positivement. Ce résultat suggère qu'il existe des pistes histologiques pour augmenter la teneur en paroi digestible (CWRd) de la MS.

**Tableau 8 : Modèles de régressions pour expliquer les variations de teneur en CWRd.pMS en fonction de caractères histologiques.** Pour chaque modèle sont indiqués les régresseurs, en vert le régresseur a un signe positif dans le modèle, en rouge le régresseur a un signe négatif dans le modèle,  $R^2$ = coefficient de détermination, AIC = critère d'information d'Akaike.

Histologie	2018	2019	2018/2019
CWRd.pMS	3: TM5a.psection + TRD1.psection + TM4b.psection + TRL2.psection + TM5b.psection + TM7.psection + TRL1.psection + TM3.psection R <sup>2</sup> : 0.347 AIC: -59.26	2: TRD2.psection + TM5b.psection + TM2b.psection + TRD8.psection + TE1.psection + TRD4.psection R <sup>2</sup> : 0.186 AIC: -150.45	1: TM5a.psection + TRD2.psection + TM4b.psection + TM1b.psection + TRL2.psection + TB4.psection + TM7.psection + TRD8.psection + TE1.psection + TM3.psection + TM2a.psection + TRL1.psection + TRD3.psection + TB3.psection R <sup>2</sup> : 0.248 AIC: -204.06
	4: TM5a.psection + TRD1.psection + TM4b.psection + TRL2.psection + TM5b.psection + TM7.psection + TRL1.psection R <sup>2</sup> : 0.330 AIC: -58.24	3: TRD2.psection + TM5b.psection + TM2b.psection + TRD8.psection R <sup>2</sup> : 0.138 AIC: -142.87	2: TM5a.psection + TRD2.psection + TM4b.psection + TM1b.psection + TRL2.psection + TB4.psection + TM7.psection + TRD8.psection + TE1.psection R <sup>2</sup> : 0.20 AIC: -194.52
	5: TM5a.psection + TRD1.psection + TM4b.psection + TRL2.psection + TM5b.psection R <sup>2</sup> : 0.27 AIC: -52.33	4: TRD2.psection R <sup>2</sup> : 0.048 AIC: -129.08	3: TM5a.psection + TRD2.psection + TM4b.psection + TM1b.psection + TRL2.psection + TB4.psection R <sup>2</sup> : 0.166 AIC: -186.61
	6: TM5a.psection + TRD1.psection + TM4b.psection R <sup>2</sup> : 0.181 AIC: -41.64		4: TM5a.psection + TRD2.psection + TM4b.psection R <sup>2</sup> : 0.119 AIC: -174.89
	7: TM5a.psection R <sup>2</sup> : 0.082 AIC: -31.8		

Un autre avantage du paramètre CWRd est qu'il est corrélé positivement à la digestibilité et à la teneur en paroi (Figure 7). De plus, la variation de CWRd est décorrélée de celle du rendement, indiquant que ces cibles histologiques n'affecteront peut-être pas négativement le rendement en biomasse.

Ainsi la combinaison des facteurs histologiques pour expliquer les variations de digestibilité de paroi permet de construire des modèles dont les pourcentages d'explications atteignent les 40 % où la combinaison de variables biochimiques permettrait d'arriver à 35 % de part d'explication significative. Il est intéressant de se demander maintenant si la combinaison des variables biochimiques et histologiques permettrait de rendre mieux compte des variations de digestibilité tout en offrant une meilleure compréhension de ce qui fait un hybride de maïs bien digestible.

## E. Apport de la combinaison de variables biochimiques et histologiques dans la compréhension des variations de digestibilité de paroi

### 1. Relations entre caractères biochimiques et histologiques

Avant de combiner ensemble les variables biochimiques et histologique pour expliquer au mieux les variations de digestibilité de paroi, nous avons scruté les relations entre les principales cibles biochimiques et histologiques mises en avant dans les parties précédentes (Figure 9).

Il apparait clairement que les corrélations entre les principales variables biochimiques et les principales variables histologiques sont assez faibles (Tableau 9, Figure 17 et Figure 18).

**Tableau 9 : Coefficients des corrélations entre les principales cibles biochimiques et histologiques retenues et avec IVCWRDm sur les données des 2 années prises ensemble.**

Les corrélations présentées sont significatives au seuil 5 %.

IVCWRDm		Tissus « bleus »				Tissus « rouges »			
		TM2a	TM2b	TM5a	TM5b	TM1a	TM1b	TM4a	TM4b
-0.49	BrAc	X	X	0.12	X	X	X	X	X
-0.24	PC <sub>est</sub>	0.16	X	0.19	X	-0.14	-0.17	-0.12	-0.12
-0.40	Rdt $\beta$ O4	-0.17	-0.22	-0.23	X	0.27	0.15	0.25	0.19
1	IVCWRDm	0.28	0.47	0.23	0.42	-0.24	-0.36	-0.25	-0.37

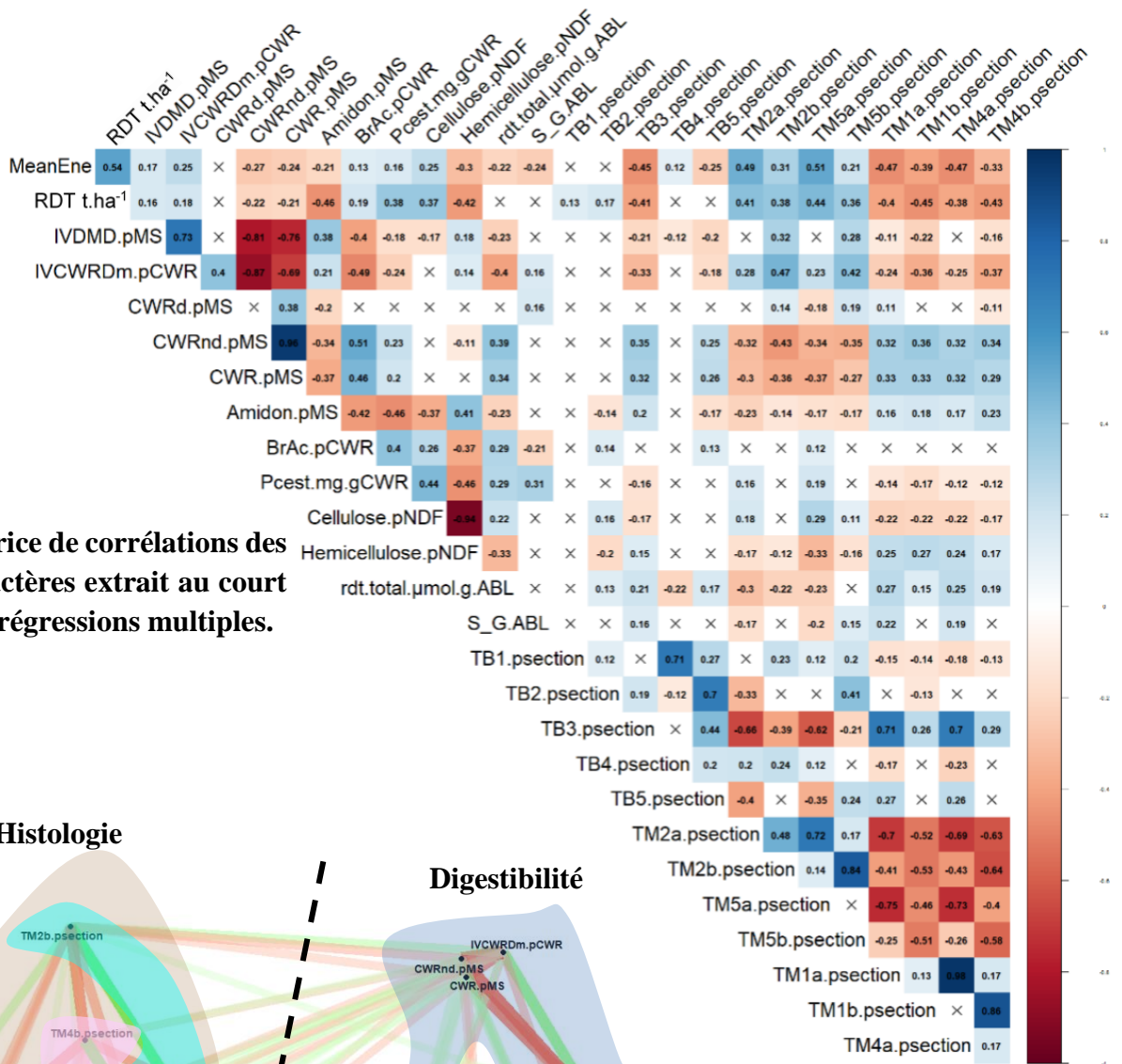


Figure 17 : Matrice de corrélations des principaux caractères extrait au court des analyses de régressions multiples.

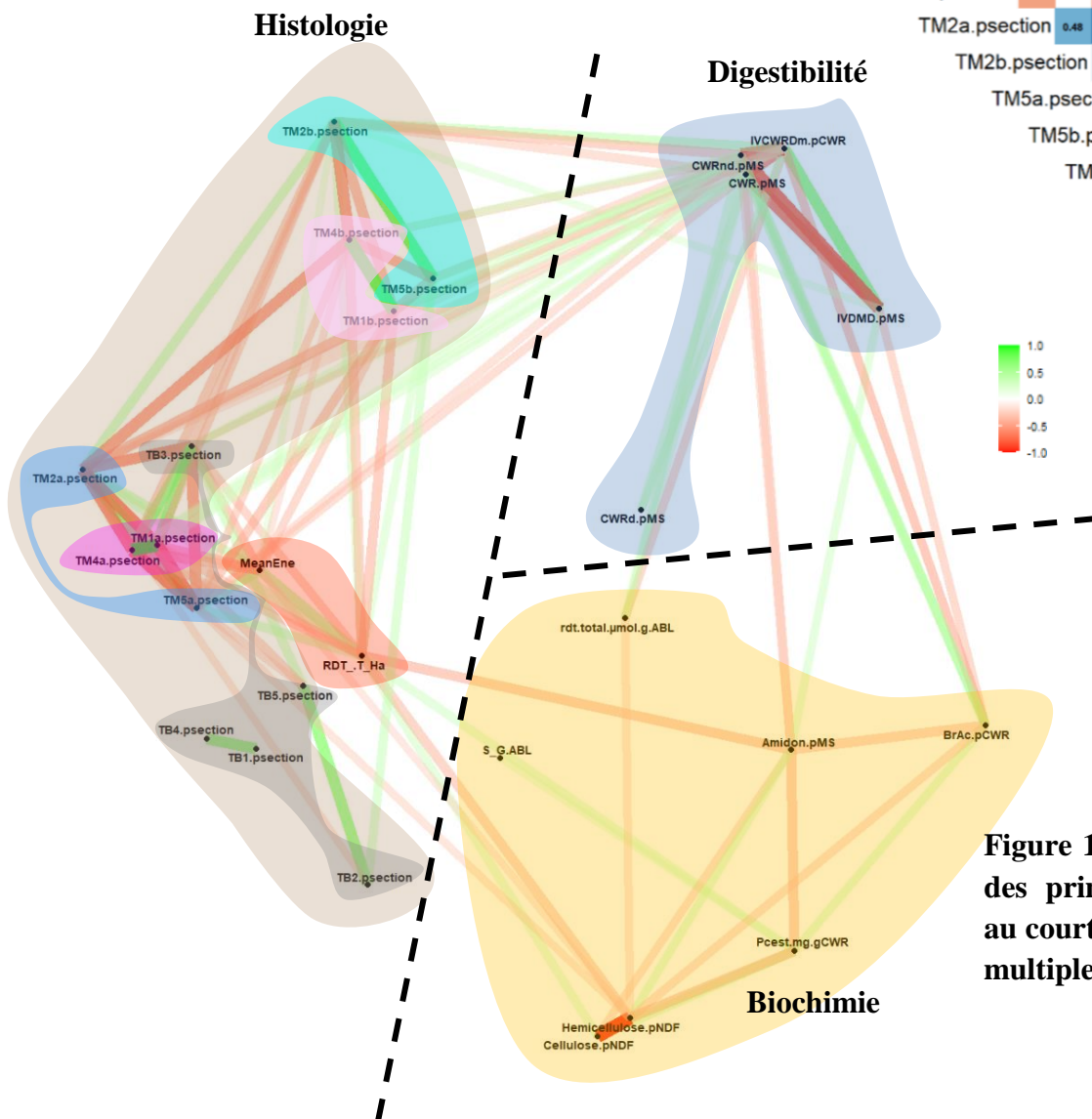


Figure 18 : Réseau des corrélations des principaux caractères extraits au court des analyses de régressions multiples.

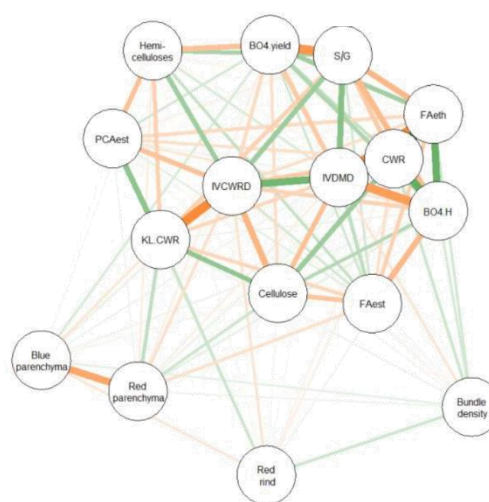
La teneur en lignine BrAc dans la paroi ne présente pas de relation avec les variables histologiques que l'on considère des tissus « rouges » (lignifiés) ou des tissus « bleus » (peu ou pas lignifiés). En ce qui concerne la teneur en acide *p*-coumarique estérifié, un maximum de 4 % des variations enregistrées pourraient être expliquées par un facteur histologique (TM5a). De façon globale, même si ces valeurs de corrélation restent faibles, il semblerait que l'augmentation de la présence des tissus « bleus » (TM2 et TM5) de type « a » va de pair avec une augmentation de la teneur en acide *p*-coumarique estérifié (corrélations positives) contrairement aux tissus « rouges » (TM1 et TM4 ; corrélations négatives dans le Tableau 9 et la Figure 17). Au contraire, et dans des mesures toujours limitées, les tissus « bleus » (TM2 et TM5) seraient associés à des lignines plus condensées (refléte par les corrélations négatives avec le rendement  $\beta O_4$ ) que les tissus « rouges » (TM1 et TM4). Il est possible que nous soyons là à un niveau de sur-interprétation des valeurs de corrélation mais en tout cas, il est certain que ces corrélations sont limitées voire absentes entre les valeurs biochimiques et histologiques. Ce réseau de relations a extrêmement bien mis en évidence sur la Figure 18 trois régions distinctes pour les digestibilités, les paramètres biochimiques et les paramètres histologiques. La région « bleu » correspond à la région en lien avec l'IVDMD, l'IVCWRDm et les CWRnd et CWRd, la région « jaune » correspond à la région dédiée aux caractères biochimiques et enfin la région « brune » correspond à la région dédiée aux paramètres histologiques. Ces trois régions sont très distinctes et nous n'observons notamment pas de chevauchement entre les régions biochimiques et histologiques. Les traits verts et rouges symbolisent les corrélations positives et négatives respectivement entre caractères et soulignent les relations avec les digestibilités des paramètres biochimiques comme histologiques.

Les études qui mêlent approches biochimiques et histologiques pour expliquer les variations de digestibilité ne sont pas nombreuses. En 2018, El Hage et al., ont étudié l'impact du stress hydrique, au sein d'une collection de lignées de maïs contrastées en termes de digestibilité, sur la digestibilité, la composition des parois, la répartition tissulaire de la lignification et sur les relations entre ces caractères. Ces auteurs ont mis en évidence en conditions irriguées une corrélation entre la teneur en lignine dans la paroi et la quantité de tissus rouges (après coloration des coupes au FASGA) de 0.7. Méchin et al., (2005) sur des lignées de maïs également, ont montré des relations fortes entre les deux types de variables. La teneur en lignine notamment était assez fortement corrélée aux aires bleues ( $r = -0.59$ ) ou rouges ( $r = 0.67$ ) quantifiées après coloration au FASGA. Dans son travail de thèse, El Hage, (2018) a étudié le lien entre la digestibilité, la composition biochimique des parois et la répartition histologique des tissus lignifiés au sein d'une population de lignées recombinantes

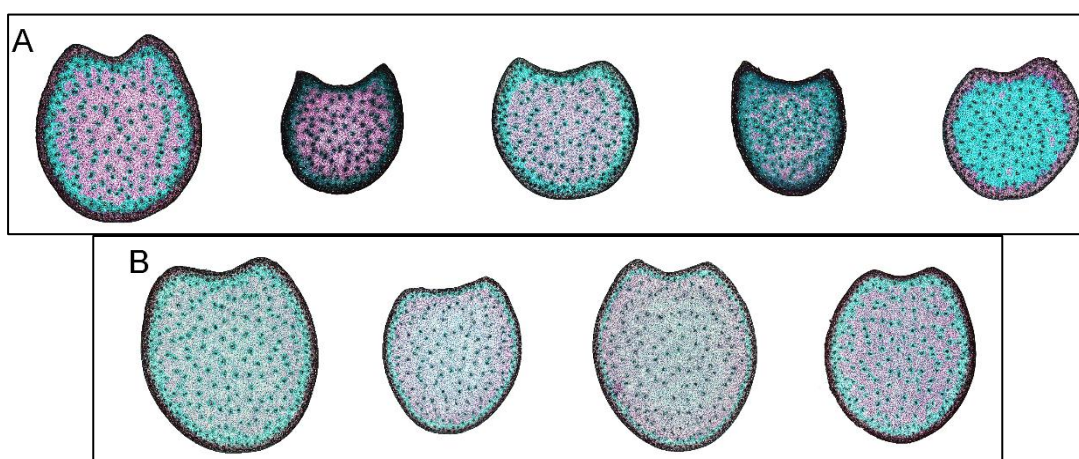


de maïs issues du croisement entre les lignées Cm484 et F271. Contrairement au réseau obtenu dans le cadre de mon travail, El Hage, (2018) met en évidence un réseau très contraint entre les estimations des digestibilités et les caractéristiques biochimiques au sein de ces lignées recombinantes (Figure 19). Les paramètres histologiques se trouvent assez éloignés des variables de digestibilité et impactent peu les variations de ces caractères d'intérêt. En outre, la teneur en lignine dans la paroi (estimée par la méthode klason dans ce travail) affiche des corrélations fortes avec les quantités de bleu (Blue Parenchyma) ou de rouge (Red Parenchyma) dans le parenchyme ou même dans l'écorce (Red Rind).

**Figure 19 : réseau de corrélations entre les digestibilités, les caractères biochimiques et histologiques obtenus au sein d'une population de RILs (Cm484 x F271) en condition irriguée en 2015 (El Hage, 2018).**



En 2017, le travail développé par Baldy et al., sur la caractérisation histologique d'hybrides de maïs représentatifs des différentes périodes de la sélection du maïs ensilage en France (données non publiées, communication personnelle) avait soulevé chez ces auteurs une première interrogation sur les profils de lignification des entrenœuds sous l'épi principal des hybrides. En effet, comme souligné dans le chapitre 2 de ma thèse les profils histologiques des hybrides sont beaucoup moins contrastés que ceux des lignées (Figure 20).



**Figure 20 : Différence des contrastes entre les profils histologiques (A) de lignées, (B) d'hybrides (Adapté de Lopez-Marnet et al., soumis).**



J'ai gardé à l'esprit dans mon travail ces différences entre lignées et hybrides notamment sur le plan des profils histologiques. Il est possible que les réseaux de corrélations entre caractères chez des lignées présentent de ce fait des différences importantes lorsqu'on les compare à ceux obtenus chez des hybrides.

### 3. Combinaison de variables biochimiques et histologiques pour expliquer les variations de digestibilité de paroi

Des modèles obtenus par régression multiple ont été établis en utilisant comme variables d'entrée à la fois les paramètres biochimiques et histologiques obtenus sur cette série d'hybrides sur les deux blocs pour expliquer les variations de la digestibilité de leur paroi ou la teneur en paroi non-digestible. Pour rappel, les corrélations simples ou les modèles basés sur des variables biochimiques font généralement appel à la teneur en lignine dans la paroi, la teneur en acide *p*-coumarique et/ou le rendement  $\beta$ O4. Seules, ces variables peuvent expliquer au maximum 22 % des variations de digestibilité de paroi et en combinaison dans des modèles, nous pouvons atteindre 40 % d'explication de ces variations. Les caractères histologiques recrutés quant à eux sont principalement les surfaces de parenchyme lignifié ou non lignifié et les tissus TM1, TM2, TM4 et TM5 de type « a » et/ou « b ». Seuls, les paramètres histologiques arrivent à expliquer jusqu'à 22 % également des variations de digestibilité de paroi et en combinaison les uns avec les autres ils atteignent, eux aussi, 50 % d'explication des variations de digestibilité obtenues sur ce panel d'hybrides.

Quel que soit le jeu de données considéré, la teneur en lignine, même si elle varie seulement sur une gamme restreinte, est utilisée comme régresseur (Tableau 9). En 2018, la teneur en acide *p*-coumarique a un poids important.

Pour les variables histologiques, selon le jeu de données considéré soit le TM2a ou le TM5a (représentant les planchers cellulaires ou les parois transversales du même tissu respectivement), qui sont tous les deux des tissus « bleus » de la moelle peu digestibles, sont utilisés comme régresseurs pour expliquer CWRnd. Sur les données des deux années, le meilleur modèle à 2 régresseurs fait intervenir une variable biochimique : la teneur en lignine dans la paroi et une variable histologique : le TM5a (tissu bleu peu digestible) (Tableau 9). Ensemble ces deux variables expliquent 42 % des variations de digestibilité de paroi (Tableau 9) et sont additives. L'ajout de TM2b comme troisième régresseur permet d'expliquer significativement 10% de variations supplémentaires (modèle 3, Tableau 9). Ce modèle est probablement le plus intéressant sur ces deux années.

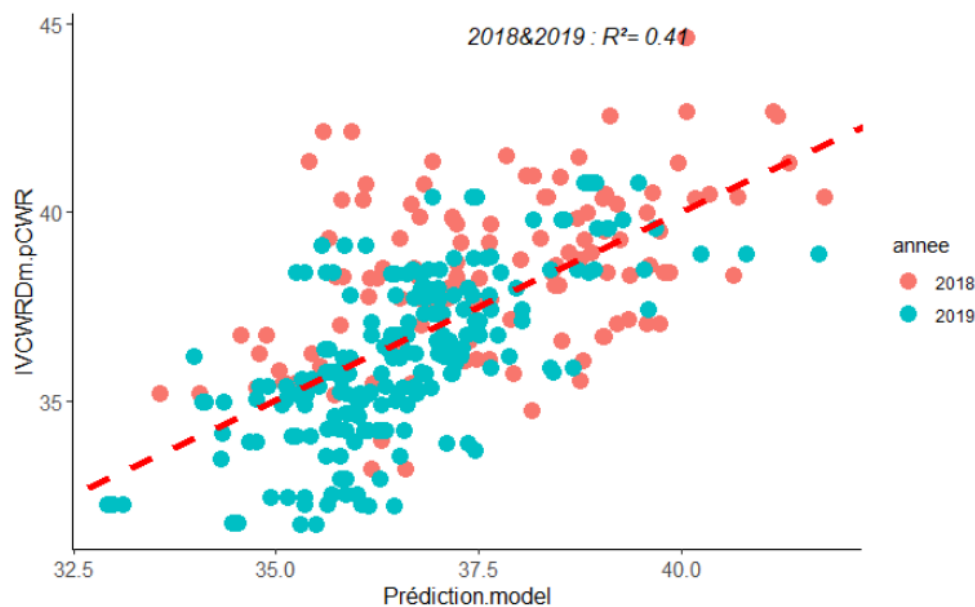
**Tableau 9 : Modèles de régressions pour expliquer les variations de teneur en CWRnd.pMS et d'IVCWRDm.pCWR en combinant des caractères biochimiques et histologiques.** Pour chaque modèle sont indiqués les régresseurs, en vert le régresseur a un signe positif dans le modèle, en rouge le régresseur a un signe négatif dans le modèle, R<sup>2</sup>= coefficient de détermination, AIC = critère d'information d'Akaike.

Combinaisons de variables biochimiques et histologiques	2018	2019	2018/2019
<b>CWRnd.pMS</b>	1: Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR + TM2a.psection + TM8.psection + TRD3.psection + TB5.psection + Feeth.mg.gCWR + TM1b.psection + TM4b.psection + TM2b.psection + TRL5.psection + TRD1.psection + TRL6.psection + TRD6.psection R <sup>2</sup> :0.723 AIC: 64.65	1: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + H.μmol.g.ABL + TB5.psection + Feest.mg.gCWR + Pcest.mg.gCWR + TRL3.psection + TE1.psection + TRD8.psection + TM2b.psection + TRD5.psection R <sup>2</sup> :0.647 AIC: 139.45	1: BrAc.pCWR + TM5a.psection + TM2b.psection + TM7.psection + TM2a.psection + rdt.total.μmol.g.ABL + TRL5.psection + TRD3.psection + TB5.psection + TE1.psection + TRD9.psection R <sup>2</sup> : 0.629 AIC: 315.23
	2: Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR + TM2a.psection + TM8.psection + TRD3.psection + TB5.psection R <sup>2</sup> :0.611 AIC: 90.35	2: BrAc.pCWR + TRD8.psection + TM2b.psection + TRD5.psection R <sup>2</sup> :0.647 AIC: 139.45	2: BrAc.pCWR + TM5a.psection + TM2b.psection + TM2a.psection R <sup>2</sup> : 0.542 AIC: 369.1
	3: Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR + TM2a.psection + TM8.psection R <sup>2</sup> :0.551 AIC: 103.82	2: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + H.μmol.g.ABL + TB5.psection R <sup>2</sup> :0.564 AIC: 167.75	3: BrAc.pCWR + TM5a.psection + TM2b.psection R <sup>2</sup> : 0.523 AIC: 379.76
	4: Pcest.mg.gCWR + BrAc.pCWR + TM2a.psection R <sup>2</sup> :0.481 AIC:119.39		4: BrAc.pCWR + TM5a.psection R <sup>2</sup> :0.422 AIC:439.98
<b>IVCWRDm.pCWR</b>	1: Pcest.mg.gCWR + pS.ABL + TRL1.psection + TM2b.psection + TRL2.psection + TRD3.psection + BrAc.pCWR + TM4b.psection + TM5b.psection + Feeth.mg.gCWR + pH.ABL + pG.ABL + TRL5.psection R <sup>2</sup> :0.633 AIC: 100.81	1: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + pS.ABL + Pcest.mg.gCWR + Feest.mg.gCWR + TRD2.psection + TRL3.psection + TB5.psection + TM2b.psection + TRD8.psection + TRD4.psection + TRL4.psection + TRL7.psection R <sup>2</sup> :0.654 AIC: 124.69	1: BrAc.pCWR + TM2b.psection + TRD2.psection + rdt.total.μmol.g.ABL + TRL5.psection + TM3.psection + TRD3.psection + Pcest.mg.gCWR + TRD4.psection + Feest.mg.gCWR + TM6.psection + TRL1.psection + TB5.psection + ADF.pNDF R <sup>2</sup> : 0.645 AIC: 280.29
	2: Pcest.mg.gCWR + pS.ABL + TRL1.psection + TM2b.psection + TRL2.psection R <sup>2</sup> : 0.493 AIC: 124.22	2: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + pS.ABL + Pcest.mg.gCWR + Feest.mg.gCWR + TRD2.psection + TRL3.psection + TB5.psection R <sup>2</sup> :0.620 AIC: 133.37	2: BrAc.pCWR + TM2b.psection + TRD2.psection + rdt.total.μmol.g.ABL + TRL5.psection + TM3.psection R <sup>2</sup> : 0.591 AIC: 310.42
	3: Pcest.mg.gCWR + pS.ABL + TRL1.psection R <sup>2</sup> :0.440 AIC: 132.36	3: BrAc.pCWR + ADF.pNDF + pS.ABL + Pcest.mg.gCWR + Feest.mg.gCWR + TRD2.psection R <sup>2</sup> :0.604 AIC: 137.52	3: BrAc.pCWR + TM2b.psection + TRD2.psection + rdt.total.μmol.g.ABL R <sup>2</sup> :0.504 AIC: 368.49
	4: Pcest.mg.gCWR + pS.ABL R <sup>2</sup> :0.381 AIC:142.57		4: BrAc.pCWR + TM2b.psection R <sup>2</sup> : 0.412 AIC:419.16

Le modèle réunissant la teneur en lignine (AcBr.pCWR) et le TM2b, qui sont les deux paramètres retenus en premier par les modèles avec des paramètres biochimiques et des paramètres histologiques, permet également d'expliquer 41.2% de la variation de la digestibilité de la paroi (Tableau 9, Figure 21). A noter que la teneur en lignine ou TM2b n'expliquaient chacun que 22% de la variation de la digestibilité. Ce résultat illustre à nouveau

le fait que les informations apportées par les caractères biochimiques ne se chevauchent pas avec les informations apportées avec les quantifications histologiques réalisées grâce au workflow développé.

Le modèle complet permettant potentiellement d'expliquer 62 % des variations de CWRnd ou 65 % de la digestibilité de la paroi sont sur-paramétrés avec 12 et 14 régresseurs respectivement.



**Figure 21 : Relation entre la digestibilité de la paroi *in vitro* (IVCWRDm.pCWR) et la digestibilité de la paroi estimée grâce au modèle 4 présenté dans le Tableau 9 pour les données 2018-2019.**

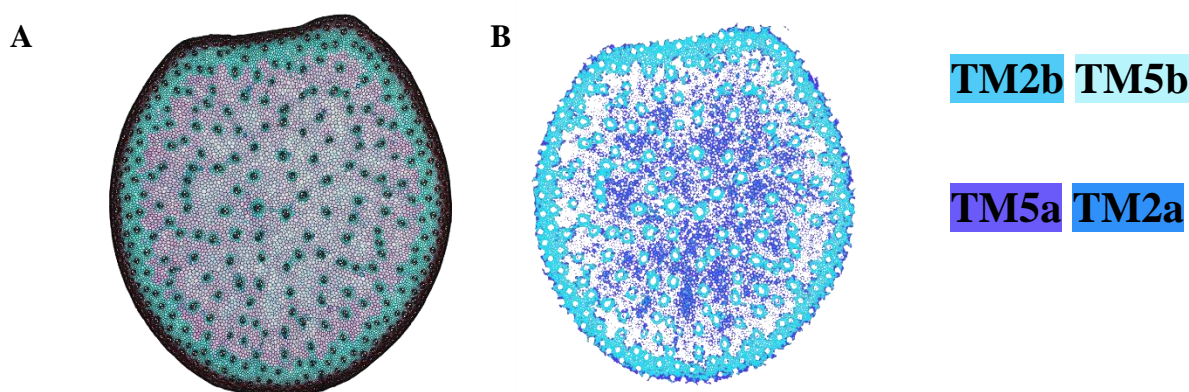
**Modèle 4 explicatif des variations de digestibilité de la paroi *in vitro* :**

$$IVCWRDm.pCWR = 67.45 - 2.14 * BrAc.pCWR + 0.34 * TM2b.pSection$$

### 4. Conception d'idéotypes

Ainsi un hybride de maïs de bonne digestibilité de paroi, tel que présenté dans mon travail, doit limiter sa teneur en lignine dans une gamme de variation déjà réduite et adaptée aux propriétés agronomiques attendues chez un hybride moderne productif. En termes de lignification tissulaire, cet hybride doit favoriser la mise en place de tissus colorés en bleu au FASGA et facilement digestibles dans la moelle (TM2b). TM2b est un tissu bleu qui occupe une proportion importante de la moelle et qui se trouve localisé dans les parois longitudinales des cellules. Son homologue direct dans les parois transversales est le tissu TM5b que nous retiendrons donc aussi comme bonne cible d'amélioration de la digestibilité. Au-delà du modèle de régression retenu pour la Figure 21 où interviennent la teneur en lignine et le TM2b, le tissu TM5a est préféré au TM2b pour expliquer la teneur en CWRnd (Tableau 9) et est donc

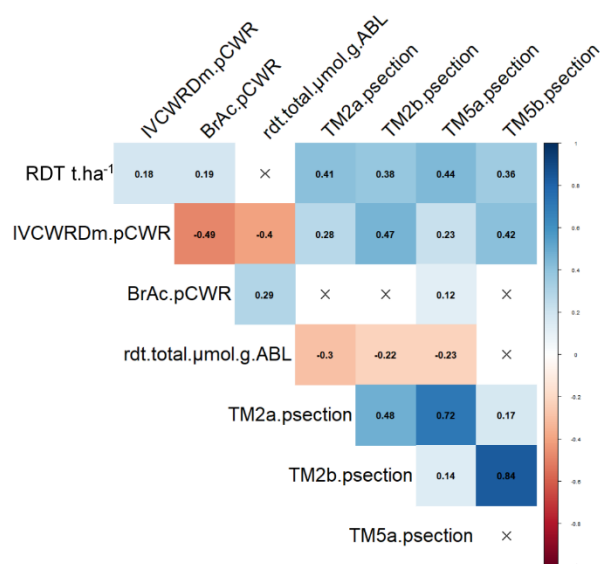
aussi une bonne cible. Pour diminuer la quantité de paroi non digestible, il faut ainsi diminuer la teneur en lignine et augmenter la quantité de ce tissu bleu du parenchyme médullaire qu'est TM5a (parois transversales). Là aussi, le tissu homologue des parois longitudinales : TM2a sera considéré ( $r = 0.72$  entre TM2a et TM5a). Enfin, comme nous l'avons vu, des lignines plus condensées (faible teneur en liaisons  $\beta O4$ ) permettent d'améliorer la digestibilité. Nos cibles principales sont donc au nombre de six : deux cibles biochimiques que sont la teneur en lignine et le rendement en liaisons  $\beta O4$  et quatre cibles histologiques centrées autour des tissus bleus du parenchyme médullaire que sont les tissus TM2b et 5b et TM5a et 2a (Figure 22). Cet idéotype pour la digestibilité de paroi rappelle celui décrit dans Méchin et al., en 2005 sur des lignées de maïs. Ces auteurs proposaient un idéotype présentant une teneur en lignine contrôlée et dont les lignines seraient principalement dans l'écorce plutôt que dans la moelle.



**Figure 22 : Illustration des tissus dont la surface doit être augmentée chez un idéotype histologique de bonne digestibilité de paroi** (A) Image d'une coupe d'entre-nœud d'hybride de maïs colorée au FASGA, (B) extractions des tissus TM2b et 5b (bleus clairs) et TM5a et 2a (bleus foncés) définissant cet idéotype histologique.

Forts de ces cibles permettant d'améliorer la digestibilité des parois, nous avons, pour finir, souhaité nous assurer de la compatibilité de ces choix avec le maintien d'un bon rendement. Pour cela nous avons regardé les corrélations, au sein de la population d'hybrides étudiés dans le cadre de ma thèse, entre ces différents caractères et le rendement (Figure 23). Nous avons pu voir précédemment que le rendement était corrélé positivement à la digestibilité de la MS ( $r = 0.23$ ) et de la digestibilité de paroi ( $r = 0.18$ , Figure 23). L'augmentation du rendement ne se fait donc pas au détriment de la digestibilité comme cela fut déjà évoqué dans l'étude de Baldy et al., (2017) où des hybrides modernes montrent de très bonnes valeurs de digestibilité et des rendements très élevés.

Le rendement est néanmoins corrélé positivement avec la teneur en lignine ( $r = 0.19$ ). Cette corrélation reste assez faible mais il faudra veiller si la gamme de variation de la teneur en lignine est encore réduite vers des teneurs plus faibles en lignine à ce que cela n'impacte pas le rendement. Il serait sûrement plus judicieux de privilégier des lignines plus condensées pour améliorer la digestibilité de paroi sans impacter négativement le rendement puisqu'il n'y a pas de corrélation significative entre le rendement et le rendement en liaisons  $\beta O4$  au sein des lignines (Figure 23).



**Figure 23 : Matrice de corrélations entre les cibles biochimiques et histologiques permettant l'augmentation de la digestibilité des parois, la digestibilité de paroi et le rendement**

En ce qui concerne les cibles histologiques, tous les feux sont au vert ! En effet les 4 tissus ciblés présentent des corrélations significatives et positives assez fortes avec le rendement ( $r$  compris entre 0.36 et 0.44, Tableau 23). Ainsi, l'augmentation des surfaces de tissus bleus au sein du parenchyme médullaire aurait pour effet d'augmenter la digestibilité des parois mais aussi de favoriser de bons rendements.

## Références Chapitre 3

- Andrieu, J., Barrière, Y., Demarquilly, C., 1999. Digestibilité et valeur énergétique des ensilages de maïs : le point sur les méthodes de prévision au laboratoire. *INRA Prod. Anim* 12, 391–396.
- Argillier, O., Barrière, Y., Lila, M., Jeanneteau, F., Gélinet, K., Ménanteau, V., 1996. Genotypic variation in phenolic components of cell-walls in relation to the digestibility of maize stalks. *Agronomie* 16, 123–130.
- Baldy, A., Jacquemot, M.P., Griveau, Y., Bauland, C., Reymond, M., Mechin, V., 2017. Energy values of registered corn forage hybrids in France over the last 20 years rose in a context of maintained yield increase. *American Journal of Plant Sciences* 08, 1449–1461. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.86099>
- Barrière, Y., Argillier, O., Emile, J.C., Michalet-Doreau, B., Champion, M., Hébert, Y., Guingo, E., Giauffret, C., 1997. Le maïs ensilage de demain, un maïs spécifique pour nourrir les ruminants. *Fourrages*.
- Barrière, Y., Emile, J.C., 2000. Le maïs fourrage III Evaluation et perspective de progrès génétique sur les caractères de valeur alimentaire. *Fourrages* 221–238.
- Besombes, S., Mazeau, K., 2005. The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 1: adsorption of a threo guaiacyl beta-O-4 dimer onto a beta cellulose whisker. *Plant Physiol Biochem* 43, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.02.005>
- Culhaoglu, T., Zheng, D., Méchin, V., Baumberger, S., 2011. Adaptation of the Carrez procedure for the purification of ferulic and p-coumaric acids released from lignocellulosic biomass prior to LC/MS analysis. *Journal of Chromatography B* 879, 3017–3022. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.08.039>
- Dence, C. W., 1992. The Determination of Lignin, in: Lin, S.Y., Dence, Carlton W. (Eds.), *Methods in Lignin Chemistry*, Springer Series in Wood Science. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 33–61. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_3)
- Effland, M.J., 1977. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi; (United States)* 60:10.
- El Hage, F., 2018. Impact du déficit hydrique sur les relations entre la dégradabilité, la biochimie pariétale et la répartition des tissus lignifiés chez l'entre-nœud de maïs et déterminisme génétique de ces caractères. l'Université Paris-Saclay, INRA Versailles.
- El Hage, F., Legland, D., Borrega, N., Jacquemot, M.-P., Griveau, Y., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2018. Tissue Lignification, Cell Wall p-Coumaroylation and Degradability of Maize Stems Depend on Water Status. *J. Agric. Food Chem.* 66, 4800–4808. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05755>
- Fukushima, R.S., Hatfield, R.D., 2004. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3713–3720. <https://doi.org/10.1021/jf0354971>
- Fukushima, R.S., Hatfield, R.D., 2001. Extraction and Isolation of Lignin for Utilization as a Standard to Determine Lignin Concentration Using the Acetyl Bromide Spectrophotometric Method. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3133–3139. <https://doi.org/10.1021/jf010449r>
- Fukushima, R.S., Kerley, M.S., Ramos, M.H., Porter, J.H., Kallenbach, R.L., 2015. Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and



- correlation with in vitro forage degradability. *Animal Feed Science and Technology* 201, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.12.007>
- Gärtner, H., Lucchinetti, S., Schweingruber, F.H., 2014. New perspectives for wood anatomical analysis in dendrosciences: The GSL1-microtome. *Dendrochronologia* 32, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2013.07.002>
- INRA, 2018. *Alimentation des ruminants*, Quae. ed. Versailles, France.
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C., 1986. Preparative Thioacidolysis of Spruce Lignin: Isolation and Identification of Main Monomeric Products 40, 47–50. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1986.40.1.47>
- Legland, D., El-Hage, F., Méchin, V., Reymond, M., 2017. Histological quantification of maize stem sections from FASGA-stained images. *Plant Methods* 13, 84. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0225-z>
- Lundvall, J.P., Buxton, D.R., Hallauer, A.R., George, J.R., 1994. Forage Quality Variation among Maize Inbreds: In Vitro Digestibility and Cell-Wall Components. *Crop Science* 34, crops1994.0011183X003400060046x. <https://doi.org/10.2135/crops1994.0011183X003400060046x>
- Méchin, V., Allerit, S., Argillier, O., Barrière, Y., Melin Decamp, C., 2000a. Estimation de la digestibilité de paroi chez des tiges de lignées de maïs. *AFPF* 83–92.
- Méchin, V., Argillier, O., Menanteau, V., Barrière, Y., Mila, I., Pollet, B., Lapierre, C., 2000b. Relationship of cell wall composition to in vitro cell wall digestibility of maize inbred line stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 574–580. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200004\)80:5<574::AID-JSFA575>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<574::AID-JSFA575>3.0.CO;2-R)
- Méchin, V., Argillier, O., Rocher, F., Hébert, Y., Mila, I., Pollet, B., Barrière, Y., Lapierre, C., 2005. In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5872–5881. <https://doi.org/10.1021/jf050722f>
- Morrison, T.A., Kessler, J.R., Buxton, D.R., 1994. Maize Internode Elongation Patterns. *Crop Science* 34, crops1994.0011183X003400040040x. <https://doi.org/10.2135/crops1994.0011183X003400040040x>
- Peyrat, J., Nozière, P., Féraud, A., Le Morvan, A., Meslier, E., Protin, P.V., Carpentier, B., Baumont, R., 2016. Digestibilité du maïs fourrage : équations et critères de prédiction. ARVALIS - Institut du végétal - INRA.
- RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Sauvant, D., Nozière, P., 2013. The quantification of the main digestive processes in ruminants: The equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Productions Animales* 26, 327–346. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002670>
- Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., Zemla, J., Freidank, M., Cai, J., Protivinsky, T., 2021. Visualization of a Correlation Matrix.
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Lin Pedersen, T., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., 2020. Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics.
- Zhang, Y., Culhaoglu, T., Pollet, B., Melin, C., Denoue, D., Barrière, Y., Baumberger, S., Méchin, V., 2011. Impact of Lignin Structure and Cell Wall Reticulation on Maize Cell Wall Degradability. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10129–10135. <https://doi.org/10.1021/jf2028279>



## Chapitre 4 :

### **Déterminisme génétique des principales cibles permettant de moduler les digestibilités au sein d'une population de lignées recombinantes dédiée.**

*Dans ce dernier chapitre, je vous présente les travaux qui concernent le dernier objectif de ma thèse s'articulant autour de « l'identification des cibles biochimiques et histologiques et génétiques impliquées dans la variation de digestibilité observée au sein d'une population de RILs issues du croisement entre les lignées F4 et F7 ».*

*Les développements réalisés et présentés dans les chapitres 1 et 2 de la thèse ont contribué à caractériser biochimiquement et histologiquement chacune des RILs cultivées à Versailles en 2020. Les résultats ainsi obtenus sont le fruit d'une large participation de mes collègues de l'équipe Qualibiosec. Le génotypage de chacune des RILs et la construction de la carte génétique est aussi le résultat de la contribution de collègues du Moulon.*

*Les analyses menées indiquent que des variations génétiques sous-tendent les variations biochimiques et histologiques observées au sein de la population de lignées recombinantes. De plus, des analyses corrélatives ont permis d'identifier des liens forts entre des caractères biochimiques et la digestibilité. En revanche, même si les variations des caractères histologiques au sein de la population ne sont que faiblement impliquées dans les variations de digestibilité, nous avons pu mettre en évidence que des lignées au parenchyme bleu coloré au FASGA sont plus digestibles que celles dont le parenchyme est coloré en rouge au FASGA. Ces différences de digestibilité ne sont pas accompagnées de différences de teneur en lignine mais plutôt des différences de teneur en acides para-hydroxycinnamiques.*

*De nombreux QTLs ont été cartographiés pour l'ensemble des caractères agronomiques, biochimiques et histologiques, dont des QTLs très significatifs. Des clusters de QTLs autour de QTLs de digestibilité sont discutés au regard des corrélations phénotypiques observées sur la population. De façon originale, nous avons également identifié trois loci impliqués dans le pourcentage de surface occupé par du parenchyme non lignifié (coloré en bleu au FASGA) au sein de cette population. Nous avons montré que les différentes combinaisons alléliques à ces trois loci permettent de rendre compte des différents histotypes représentés par F4 et F7.*

# I. Matériels et méthodes

## A. Obtention et caractérisation des lignées recombinantes issues du croisement entre F4 et F7

### 1. Obtention des lignées recombinantes

La population de lignées recombinantes (RILs pour Recombinant Inbred Lines) a été créée à partir d'un croisement entre les lignées F4 et F7. La lignée F4 a été obtenue par autofécondation de la variété « Etoile de Normandie » à l'INRA de Versailles à la fin des années 1940. F4 est une lignée cornée précoce qui a été identifiée en 1955 (Barrière et al., 2018). Elle fait partie du groupe « Northern flint » (Barrière et al., 2018). F4 a été largement caractérisée biochimiquement, depuis plus de 30 ans, et est définie comme étant une lignée faiblement lignifiée et hautement digestible (Méchin, 2000; Méchin et al., 2000; Barrière et al., 2018; El Hage, 2018; El Hage et al., 2018). C'est l'une des seules lignées capables d'atteindre les bonnes performances de digestibilité des mutants bm3 (Méchin, 2000; Méchin et al., 2000). Au niveau histologique, sa première caractérisation remonte à 2000 (Méchin, 2000) et révèle une particularité de la lignée à avoir une moelle colorée en bleu à la coloration FASGA. Cette coloration bleue est la signature de la lignée F4. En effet il s'agit de la seule lignée (lignée bm3 comprises) dont la moelle est colorée en bleu au FASGA quels que soient le lieu, l'année ou l'environnement de récolte (stress hydrique /irrigation) (Méchin, 2000; Legland et al., 2017; El Hage, 2018; Barrière et al., 2018). La lignée F7 est également une lignée cornée précoce qui provient de la variété de pays « Lacaune » et qui présente de nombreux marqueurs moléculaires signant cette appartenance (Gouesnard et al., 2017). F7 est caractérisée comme ayant une digestibilité de MS proche de celle de F4 mais une digestibilité de paroi inférieure et un taux de lignine équivalent (Barrière et al., 2018). Au niveau histologique, F7 a été caractérisée comme ayant une moelle rouge après coloration au FASGA (El Hage, 2018).

Le croisement entre F4 et F7 fut effectué en 2015 à la pépinière du Moulon afin d'obtenir la génération F1 (Tableau 1). Puis, en suivant un schéma de SSD (single Seed Descent) traditionnel, des autofécondations successives ont été réalisées en France (pépinières du Moulon et/ou de Saint Martin de Hinx) et au Chili jusqu'en 2020 pour obtenir 177 RILs en génération F7 à partir de 450 graines de la génération F2 retenues (Tableau 1).



**Tableau 1 : Historique d'obtention de la population de RILs issues du croisement entre les lignées F4 et F7.**

Année	Saison	Localisation	Génération	Hétérozygotie	Semé (K)	Récolté (K)	Commentaire
2015	Summer	Moulon	F4*F7 to F1				
2016	Summer	Chile	F1 to F2	100%			
2016	Winter	Chile	F2 to F3	50%			
2017	Summer	Moulon	F3 to F4	25%	450	286	
2017	Summer	SMH	F3 to F4	25%	450	175	
2018	Summer	Moulon	F4 to F5	12%	286	190	
2018	Summer	SMH	F4 to F5	12%	175	110	
2018	Winter	Chile	F5 to F6	6%	231 (sowing date1)	180	Leaf sampling for DNA Half lines crossed
2018	Winter	Chile	F5 to F6	6%	249 (sowing date 2)	180	Leaf sampling for DNA
2019	Summer	Moulon	F6 to F7	3%	306 (131 sowing date1, 175 sowing date 2 Chili2018)	243(101 sowing date1, 142 sowing date 2 Chili2018)	
2020	Summer	Versailles	F7	1.5%	177 RILs independent in F2		QTLs analysis

## 2. Culture et phénotypage des 177 RILs obtenues

L'ensemble des 177 RILs ont été cultivées en essai sur le domaine expérimental de l'INRAe de Versailles. 313 parcelles de 3 m de long et séparées de 50 cm ont été semées à la canne à une densité de 130 000 plantes.ha<sup>-1</sup> le 6 Mai 2020 (pendant le premier confinement lié à la pandémie du Covid19). L'ensemble du dispositif était divisé en 6 blocs comprenant chacun deux parcelles de la lignée F4 et deux parcelles de la lignées F7. Au total, 241 RILs ont été cultivées (plan de semis randomisé), dont 177 RILs sont des RILs provenant de lignées de génération F2 indépendantes (« sowing date 1 » et « sowing date 2 » dans le tableau 1). Par ailleurs, parmi ces 241 RILs, 48 RILs ont été cultivées en double.

Les dates de floraison mâle et femelle ont été notées ainsi que la hauteur finale des plantes (moyenne par ligne, depuis la base des plantes jusqu'à l'extrémité de la panicule).

La récolte des échantillons a été effectuée au stade ensilage. Les conditions de culture de cet essai (orage post semi provoquant une croute de battance ; conditions de sécheresse forte, dispositif d'irrigation avec des tuyaux percés déployé tardivement pour sauver l'essai) ont réduit la levée et la croissance de nombreuses plantes. Ainsi, l'ensemble des 313 parcelles n'ont



pas été récoltées, et 199 parcelles ont été récoltées pour obtenir de la poudre de matière sèche, et des entrenœuds ont été récoltés sur 302. Cela représente 195 parcelles pour lesquelles nous avons effectué l'ensemble des prélèvements. Nous avons effectué les analyses biochimiques et histologiques sur 170 parcelles dont les prélèvements étaient complets et pour lesquels le taux de MS était compris entre 28 et 48 %MS.

Pour la récolte des 195 parcelles récoltées en matière sèche, 3 plantes par parcelle ont été prélevées, leurs épis retirés, pour l'estimation de la matière sèche. Le poids des plantes a été mesuré ( $m_1$ ). Les plantes ont ensuite été broyées (broyeur à végétaux modèle Viking GE 355). Un échantillon de ce broyat a été prélevé, pesé, séché (étuve ventilée pendant 3 jours à 55°C) et pesé à nouveau une fois sec ( $m_2$ ). Cela nous a permis de quantifier la teneur en matière sèche (MS en %) des plantes de chaque parcelle avec la formule suivante :

$$MS = \frac{m_1}{m_2} * 100$$

Ces échantillons secs ont ensuite été broyés plus finement (broyeur à marteau de type Gondard ; Unité Expérimentale INRAe de Ploudaniel).

Seuls les 170 échantillons sélectionnés ainsi obtenus ont été caractérisés biochimiquement par les analyses suivantes :

- Teneur en paroi (CWR, exprimé en %MS)
- Digestibilité de la MS (IVDMD, exprimé en %MS)
- Digestibilité de la paroi (IVCWRDm, exprimé en %CWR)
- Teneur en lignine AcBr (AcBr, exprimé en % CWR)
- Teneur en acide *p*-coumarique (Pcest, exprimé en mg.g<sup>-1</sup> CWR)
- Composition monomérique des lignines par thioacidolyse (en cours).

Le protocole détaillé de chaque analyse est présenté dans le chapitre 3. A noter que l'étape de gélatinisation du protocole de digestibilité de la matière sèche n'a pas été effectuée puisque les épis des plantes ont été retirés avant les broyages.

Pour l'ensemble des prélèvements d'entrenœuds des 302 parcelles, 2 entrenœuds sous épis ont été récoltés par parcelle au stade ensilage. Leur longueur des entrenœuds a été mesurée et ils ont été stockés dans de l'éthanol (70%). Des coupes transversales de ces entrenœuds des 170 parcelles sélectionnées ont été réalisées et colorées au FASGA en suivant les protocoles mentionnés dans le chapitre 2 de la thèse. Des quantifications histologiques ont été menées sur les images acquises des 340 coupes (170 parcelles x 2 entrenœuds) colorées au FASGA en utilisant le workflow d'analyse développé au cours de ma thèse et présenté dans le Chapitre 2 de ma thèse.





## B. Génomage des lignées recombinantes et établissement de la carte génétique.

Le génomage des RILs a été réalisé à partir de prélèvements foliaires à la génération F5 effectués au Chili en 2018 (Tableau 1). 480 RILs non indépendantes et cultivées à deux dates de semis ont été génomées, avec 231 RILs indépendantes en F2 semées en Octobre 2018 (sowing date1) et 249 RILs indépendantes en F2 en Novembre 2018 (sowing date2). Ce génomage a été effectué par Limagrain dans le cadre du projet DECLIC avec une puce Affymetrix Axiom en format 384 sur laquelle sont présents 14619 marqueurs publics de type SNP issus de la puce commerciale 50K. L'information du génomage de 14 584 marqueurs nous a été confiée.

Sur l'ensemble de ces 14 584 marqueurs, 5218 marqueurs présentaient un polymorphisme entre les lignées F4 et F7. C'est à partir de ces 5218 marqueurs que la carte génétique a été construite avec l'aide de Matthieu Falque (INRAe – GQE Le Moulon) en suivant les cinq étapes suivantes :

- Etape 1 Sélection de «Random seed marker». Cela permet d'obtenir des marqueurs pour initier la construction de la carte. Sur la base de la carte physique, dix marqueurs « seed » ont été sélectionnés au hasard sur chaque chromosome.
- Etape 2 Etablissement du « Scaffold » (échafaudage). Le but est, à partir des marqueurs « seed » sélectionnés précédemment, de créer une carte grossière (un échafaudage). Cela se réalise en sélectionnant les marqueurs qui ont des LOD scores ((logarithm of odds = logarithme des probabilités) issus de tests pour l'agencement des groupes de liaison) le plus élevés possible avec le marqueur « seed » dans les deux sens de la carte, et à plus de 5 centiMorgan (cM) du marqueur. Puis cette opération est répétée pour chaque marqueur placé ainsi en s'éloignant du marqueur « seed ».
- Etape 3 « Assigment » (placement des marqueurs). Cette étape a pour but l'attribution de chaque marqueur à 1 des 10 chromosomes du génome du maïs. Ici, un test d'association est effectué pour déterminer la position du marqueur au chromosome. Lors de la réalisation de l'étape de placement, deux critères sont utilisés :
  - o Un test pour tester la meilleure association possible au meilleur chromosome. Un score LOD  $>4$  est couramment utilisé pour ce test. Mais comme la population de génomage était une population de lignées non indépendantes

(semis répétés : cf Tableau 1), le LOD seuil employé dans notre cas a été doublé (LOD >8).

- Un test pour tester l'association avec le deuxième meilleur chromosome LOD <3.
- Etape 4 Etablissement d'un « Framework ». Cette étape permet de remplir la carte avec les marqueurs polymorphes non placés lors de l'étape précédente avec un LOD>6 et qui ne se chevauchent pas avec les autres marqueurs.
- Etape 5 Le « Placement » (positionnement) est réalisé pour positionner tous les marqueurs polymorphes qui n'ont pas été placés avant sur la carte. Cela est fait sans compromettre les positions des marqueurs précédemment placés sur la carte.

Une fois les marqueurs positionnés et la carte génétique établie, nous distinguons les marqueurs selon 3 catégories : (i) les « Mappable » (cartographiable) qui sont les marqueurs positionnés sur la carte. Deux marqueurs différents peuvent avoir été placés à la même position génétique ; (ii) les « strict » qui font partie de la liste de marqueurs ayant tous une position génétique unique sur la carte ; (iii) les « reduced » qui font partie de la liste de marqueurs ayant un seul marqueur à une position génétique.

## C. Statistique

Les analyses statistiques ont été conduites sous Rstudio (RStudio Team, 2020).

Pour l'ensemble des caractères phénotypés sur les RILs, nous avons estimé la valeur minimale, la moyenne ainsi que la valeur maximale.

A partir du jeu de données agronomiques et biochimiques acquis, nous avons estimé un effet bloc à partir des données acquises sur les lignées parentales F4 et F7 répétées et avec des RILs répétées à partir du modèle ANOVA suivant :

$$Y_{ie} = \mu + C_e + E_{ie}$$

Où  $Y_{ie}$  est la valeur du caractère agronomique, biochimique étudié associée à l'observation  $i$  dans le bloc  $e$ .  $\mu$  est la moyenne sur l'ensemble des valeurs retenues.  $C_e$  désigne le bloc  $e$  (valeur de 1 à 6).  $E_{ie}$  est la valeur résiduelle aléatoire.

Puis nous avons estimé un effet génotypique à partir des 18 RILs répétées dans différents blocs à partir du modèle ANOVA suivant :

$$Y_{ig} = \mu + D_g + E_{ig}$$

Où  $Y_{ig}$  est la valeur du caractère agronomique, biochimique étudié associée à l'observation  $i$  du génotype  $g$ .  $\mu$  est la moyenne sur l'ensemble des valeurs retenues.  $D_g$  désigne le génotype  $g$ .  $E_{ig}$  est la valeur résiduelle aléatoire.

Les graphiques de corrélation ont été réalisés en utilisant l'application « ggplot2 » (Wickham et al., 2020) pour mettre en lumière la corrélation entre deux variables. Nous avons analysé les corrélations entre chaque paramètre grâce à des matrices de corrélations (Wei et al., 2021).

Les Tableaux de régressions multiples ont été créés à partir d'informations extraites des modèles de régressions linéaires multiples retenus par la fonction « step » du package « stat » de Rstudio. Le modèle retenu a ensuite été précisé en déterminant le poids de chaque variable intégrée dans le modèle.

Les tracés de réseaux corrélatifs ont été réalisés à partir de la fonction « network\_plot » du package « corrr » de Rstudio avec un seuil de  $r = 0.3$ .

(<https://github.com/tidymodels/corrr/blob/master/R/output.R>).

Les dendrogrammes ont été réalisés à partir des données de segmentation des images des coupes histologiques colorées au FASGA et traitées avec le workflow présenté en chapitre 2 de ma thèse. Ces dendrogrammes ont été obtenus en utilisant le package « ComplexHeatmap » de Rstudio.

Les tests de Wilcoxon ont été effectués à l'aide du package R « ggplot2 » fonction « stat\_summary » (Wickham et al., 2020) pour mettre en évidence des différences significatives entre les lignés F4 et F7 d'une part et entre les 3 groupes identifiés par le dendrogramme.

Les régions monomorphiques et en distorsions ont été déterminées par un test de  $\chi^2$ .

## D. Détection de QTL

Pour la détection de QTLs, la liste de marqueur a été réduite. A partir de cette liste de marqueurs « Reduced », nous avons utilisé la fonction « fillgeno » de R/qlt (Broman et al., 2003) pour remplacer les valeurs manquantes par l'un des allèles parentaux le plus probable. Puis, les marqueurs redondants (marqueurs proches sur la carte pour lesquelles il n'y avait pas de recombinaison entre eux au sein des RILs semées en 2020 à Versailles) ont été éliminés. Au final, 1809 marqueurs répartis sur la carte génétique et espacés de plus de 0.35 cM ont été retenus pour la détection de QTL.

Nous avons effectué trois recherches de QTL pour chaque caractère à partir de la fonction « mqmscan » du package R/qtl permettant de faire de la cartographie en multi-QTL mapping (Broman et al., 2003). La première recherche est réalisée sans utilisation de cofacteurs. Pour la deuxième et la troisième recherches, nous avons testé et ajouté des cofacteurs tous les 20 marqueurs, afin de conserver seulement ceux significatifs au seuil 5 % et 1 % respectivement pour expliquer la variation du caractère sur l'ensemble de la population. Les seuils de significativité des LOD obtenus ont été calculés par caractère grâce à des tests de permutation pour une significativité de 10 %, 5% et 0.1 % reflétant la probabilité du risque d'indiquer la présence d'un QTL à une position alors que cela serait dû au hasard.

## II. Résultats et discussion

### A. Variations des caractéristiques agronomiques et des digestibilités

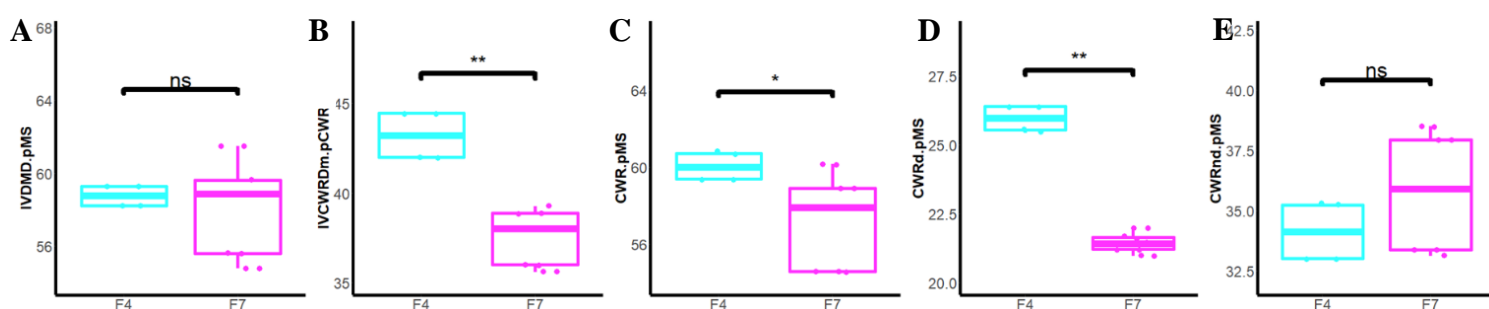
#### 1. Différences entre les parents de la population de RILs

F4 et F7 présentent des dates de floraison similaires et des hauteurs de plantes comparables (Tableau 2). Par contre, l'entrenœud de F4 est localisé plus bas sur la tige que celui de F7. Il est également plus court (Tableau 2).

Dans cette étude, il n'y a pas de différence significative pour la digestibilité de la matière sèche entre les lignées F4 et F7 avec une moyenne de 58.75 et 57.91 %MS respectivement (Tableau 2 et Figure1). En revanche, nous retrouvons comme décrit par Barrière et al., (2018) une digestibilité de paroi significativement plus importante pour la lignée F4 que pour la lignée F7. F4 a une paroi plus digestible que F7 tout en ayant une teneur en paroi significativement plus importante, 60.06 et 57.51 %MS respectivement (Tableau 2 et Figure 1). En rapportant la digestibilité de la paroi en teneur en matière sèche nous constatons que F4 a significativement plus de paroi digestible (CWRd) que F7, 25.94 et 21.46 %MS respectivement. Alors que les deux lignées ne présentent pas de différence de teneur en paroi non digestible (CWRnd) (Tableau 2 et Figure 1). La différence de digestibilité de la paroi entre F4 et F7 semble donc plutôt due à une différence de teneur en paroi digestible.

**Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques et agronomiques des lignées F4 et F7.** M = moyenne, ET = écart type, ns = non significatif, \* = 0.05, \*\* = 0.01.

Caractères	Significativité	F4 (M±ET)	F7 (M±ET)
Hauteurs.de.plantes (cm)	ns	93.75±2.5	97.22±7.12
Hauteurs.d.insertions (cm)	**	17.5±5	35±3.54
Dates.de.floraisons.femelles	ns	17.5±2.38	16.44±1.51
Longueur.Ene (cm)	**	5.46±1.34	9.67±0.86
IVDMD.pMS	ns	58.75±0.62	57.91±2.75
IVCWRDm.pCWR	**	43.2±1.42	37.36±1.54
CWRnd.pMS	ns	34.13±1.31	36.05±2.29
CWRd.pMS	**	25.94±0.52	21.46±0.4
CWR.pMS	*	60.06±0.8	57.51±2.35



**Figure1 : Représentation graphique des différentes estimations de la digestibilité et de la teneur en paroi pour les lignées F4 (n=4) et F7 (n=7)** (A) Digestibilité de la matière sèche (IVDMD), (B) Digestibilité de la paroi (IVCWRDm), (C) Teneur en paroi dans la matière sèche (CWR), (D) Teneur en paroi digestible dans la matière sèche (CWRd), (E) Teneur en paroi non digestible dans la matière sèche (CWRnd), ns = non significatif, \* = 0.05, \*\* = 0.01.

## 2. Variations au sein de la population de RILs

Les hauteurs de plantes peuvent passer du simple (50 cm) à plus du double (130 cm) avec une hauteur moyenne de 92.61 cm (Tableau 3) transgressant les valeurs parentales. La valeur d'héritabilité de la hauteur des plantes est de 0.67 (Tableau 3). La hauteur de l'insertion de l'épi sur la tige quant à elle peut passer du simple (5 cm) au décuple (50 cm) avec une moyenne de la population de 24 cm et une héritabilité de 0.51 (Tableau 3). La variation observée pour la hauteur de l'insertion de l'épi transgresse celle des parents. La longueur de l'entrenœud sous épi est le seul caractère agronomique pour lequel il n'y a pas de transgression des valeurs parentales. La valeur de l'héritabilité de la longueur de l'entrenœud sous épi est de 0.7. La première médiane (au niveau d'une parcelle) de floraison femelle d'une parcelle est observée dans la population le 9<sup>ème</sup> jour (mesurée en nombre de jours depuis le 1<sup>er</sup> juillet 2020) et la dernière le 28<sup>ème</sup> jour, la moyenne de floraison de la population est au 18<sup>ème</sup> jour. Sur cet

essai, la date de floraison a une héritabilité de 0.57 et les valeurs des RILs transgressent celles des parents.

La variation de l'IVDMD obtenue dans la population de RILs est d'environ 18 points (Tableau 3) alors que les parents ne présentent pas de différence significative pour la digestibilité de la matière sèche (Tableau 2, Figure 1). De plus, nous observons une héritabilité de 0.47 pour ce caractère (Tableau 3).

**Tableau 3 : Variation de caractères agronomiques, des digestibilités et de la teneur en paroi au sein de la population de RILs F4xF7.**

Caractere	Minimum	Moyenne	Maximum	Héritabilité
Hauteurs.de.plantes (cm)	50	92.61	130	0.67
Hauteurs.d.insertions (cm)	5	24.00	50	0.51
Dates.de.floraisons.femelles	9	18.71	28	0.57
Longueur.Ene (cm)	4	7.70	11.5	0.62
IVDMD.pMS	47.96	57.69	65.20	0.47
IVCWRDm.pCWR	33.81	41.30	50.05	0.34
CWRnd.pMS	30.29	36.64	44.73	0.47
CWRd.pMS	20.09	25.78	31.52	0.28
CWR.pMS	52.84	62.43	72.54	0.40

Cette héritabilité est inférieure à celle évaluée dans les travaux de Virlovet et al., (2019 ; 0.65 sur l'ensemble d'un dispositif irrigué et non irrigué), dans ceux de El Hage et al., (2021) sur des entrecœuds (0.65 et 50.5 en condition irrigué et non irrigué respectivement) et aussi à l'héritabilité (0.6) trouvée dans les travaux de Méchin et al., (2001). La variation de teneur en paroi au sein de la population est de 20 %MS. Ces teneurs en paroi au sein de la population de RILs transgressent la teneur en paroi des parents. L'héritabilité pour ce caractère est de 0.40. Pour les différentes estimations de la digestibilité en parois, la variation de digestibilité de la paroi *in vitro* (IVCWRDm) dans la population est d'environ 17 %CWR s'étendant de 33.81 à 50.05 %CWR avec une moyenne de 41.3 %CWR. Là encore, nous observons de la transgression positive et négative pour l'IVCWRDm. Les teneurs en paroi non digestible (CWRnd) et digestible (CWRd) évoluent dans une gamme de 30 à 45 % et 20 à 31 % respectivement. Ces teneurs en parois transgressent aussi les valeurs parentales. La gamme de variation pour CWRnd au sein de cette population est 3 fois plus réduite que celle retrouvée dans les bases de données « INRA\_URZ », « Boviding Fourrage » et « INRA Theix » par Sauvant and Noziere, (2013a, 2013b) qui présentent des valeurs de CWRnd allant de 5 à 50 %MS. Pour ces différentes estimations de la digestibilité de paroi, nous retrouvons un fort effet génétique et des héritabilités de 0.40, 0.47 et 0.28 pour l'IVCWRDm, CWRnd et CWRd



respectivement. L'héritabilité de la digestibilité de la paroi est inférieure à celle des études de Virlovet et al., (2019 ; 0.77), de El Hage et al., (2021; 0.71 en condition irriguée et 0.47 en condition de déficit hydrique) et de Méchin et al., (2001 ; 0.66). L'été 2020 à Versailles a été extrêmement sec et chaud, plaçant l'essai dans des conditions de stress hydrique fort. Les héritabilités que nous estimons sur les 18 RILs répétées sont probablement plus à mettre en regard d'héritabilités constatées en conditions de stress hydrique comme cela est le cas dans les travaux de El Hage et al., (2021).

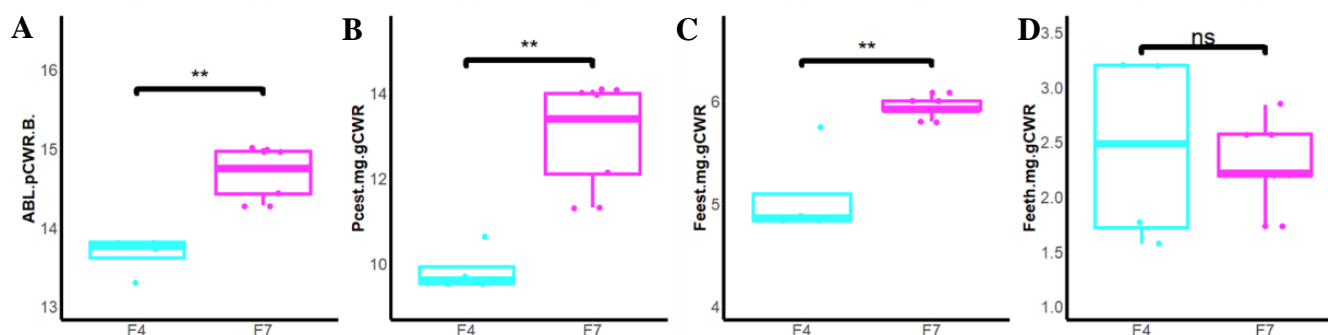
## B. Variations des caractères biochimiques pariétaux

### 1. Différences entre les parents de la population de RILs

En termes de composition des parois, F4 présente des teneurs en lignine, en acide *p*-coumarique estérifié et en acide férulique estérifié significativement plus faibles que F7. Les teneurs en acide férulique étherifié ne sont pas significativement différentes entre les deux lignées parentales (Tableau 4 et Figure 2).

**Tableau 4 : Caractéristiques biochimiques pariétales des lignées F4 et F7.** M = moyenne, ET = écart type, ns = non significatif, \* = 0.05, \*\* = 0.01.

Caractères	Significativité	F4 (M±ET)	F7 (M±ET)
BrAc.pCWR	**	13.66±0.24	14.71±0.31
Pcest.mg.gCWR	**	9.84±0.52	13.07±1.17
Feest.mg.gCWR	**	5.07±0.45	5.94±0.11
Feeth.mg.gCWR	ns	2.43±0.89	2.25±0.37



**Figure 2 : Représentation graphique des caractères biochimiques pariétaux illustrant les différences entre les lignées parentales F4 (n=4) et F7 (n=7)** (A) Teneur en lignine dans la paroi, (B) Teneur en acide *p*-coumarique dans la paroi, (C) Teneur en acide férulique

estérifié dans la paroi, (D) Teneur en acide férulique étherifié dans la paroi, ns = non significatif, \* = 0.05, \*\* = 0.01.

## 2. Variations au sein de la population de RILs

La teneur en lignine estimée par la méthode du bromure d'acétyle (lignine BrAc, Tableau 5) présente une variation de 5 points, allant de 11 à 16 %CWR avec une moyenne sur la population des RILs de 14 %CWR. Ces variations transgressent les valeurs parentales.

**Tableau 5 : Gamme de variation, moyenne et héritabilité pour les caractères biochimiques pariétaux.**

Caractère	Minimum	Moyenne	Maximum	Héritabilité
BrAc.pCWR	10.95	13.94	15.94	0.13
Pcest.mg.gCWR	5.95	11	16.82	0.31
Feest.mg.gCWR	3.06	4.46	7.68	0.44
Feeth.mg.gCWR	0	2.52	5.54	0.32

La variation de teneur en lignine dans la population de RILs est 2 fois moins importante que celle retrouvée dans les entre-nœuds de la population de RILs F271xCm484 des travaux de El Hage et al., (2021) sur des teneurs en lignine klason. Dans les travaux de Virlovet et al., (2019), sur des plantes sans épi (comme dans le cas des données présentées) issues d'une population avec les mêmes parents F271xCM484, la teneur en lignine a été estimée par la méthode Klason (lignine klason). Leur gamme de variation est équivalente à la nôtre. Dans la population de RILs F7025xF4 (Barrière et al., 2018) la variation de la teneur en lignine est estimée par deux méthodes, la méthode Van Soest (lignine ADL) et la méthode Klason (lignine klason), dont les gammes de variations sont inférieures aux nôtres (1.2 et 2.6 point respectivement). Dans la population de RILs F271xF288 (Méchin et al., 2001) la variation de teneur en lignine Van Soest (lignine ADL) est également de 3 points. L'héritabilité de la teneur en lignine dans notre étude est estimée sur 18 RILs répétées seulement et est très faible (0.13). La teneur en lignine est un caractère que l'on sait très héritable, avec des héritabilités de 0.67 pour les travaux de Méchin et al., (2001) et de 0.83 dans ceux de Virlovet et al., (2019). Dans le cas des travaux de El Hage et al., (2021), l'héritabilité de la teneur en lignine était de 0.67 en condition irriguée alors qu'elle chutait à 0.12 en condition de déficit hydrique (El Hage et al., 2021). L'héritabilité que nous avons estimée est donc très proche de celle estimée par El Hage et al., (2021) dans des conditions de stress hydrique fort, ce qui est comparable avec les conditions de culture versaillaises de l'été 2020.

La teneur en acide *p*-coumarique varie d'environ 11 %CWR dans la population de RILs F4xF7 (Tableau 5), allant de 5.95 à 16.82 %CWR. Elle dépasse la gamme de variation de

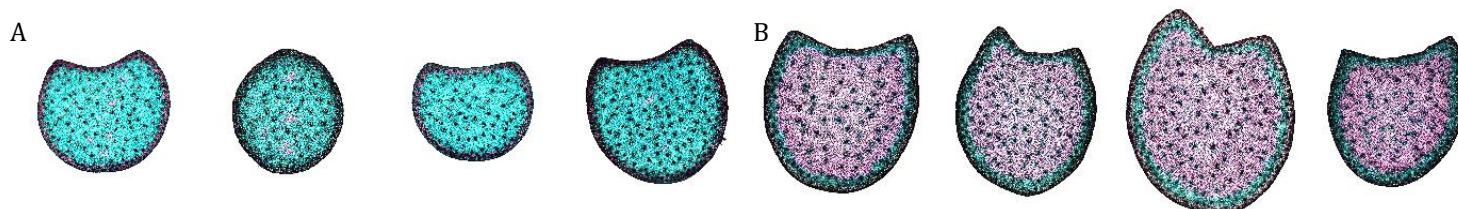
teneur en acide *p*-coumarique observée dans l'étude de Virlovet et al., (2019) dans les deux scénarios d'irrigation menés. En revanche, cette gamme de variation est quasiment deux fois moins importante que celle relevée dans l'étude de El Hage et al., (2021) sur la même population CM484xF271 et qui est d'environ 13 à 30 %CWR. F271 est un parent de moindre digestibilité par rapport à Cm484, ce qui peut expliquer en partie ces différences au niveau pariétal. L'héritabilité pour la teneur en acide *p*-coumarique dans la population F4xF7 testée à Versailles en 2020 est relativement faible (0.31). Cela est sûrement dû à l'impact environnemental, car les travaux de El Hage et al., (2021) présentent une héritabilité pour ce caractère à 0.61 en condition irriguée et à seulement 0.31 en condition de déficit hydrique.

Pour les teneurs en acides féruliques estérifiés (Feest) et étherifiés (Feeth), les teneurs moyennes sont de 4.46 et 2.52 ‰ dans la population de RILs F4xF7 respectivement (Tableau 5), avec une gamme de variation qui est de 3.06 à 5.54 et 0 à 5.54 ‰, respectivement (Tableau 5). Ces gammes de variation sont légèrement plus faibles que celles présentées sur les entrecœuds par El Hage et al., (2021) et légèrement supérieures à celle trouvées sur les plantes sans épi par Virlovet et al., (2019).

## C. Variations des caractères histologiques

### 1. Différences entre les parents de la population de RILs

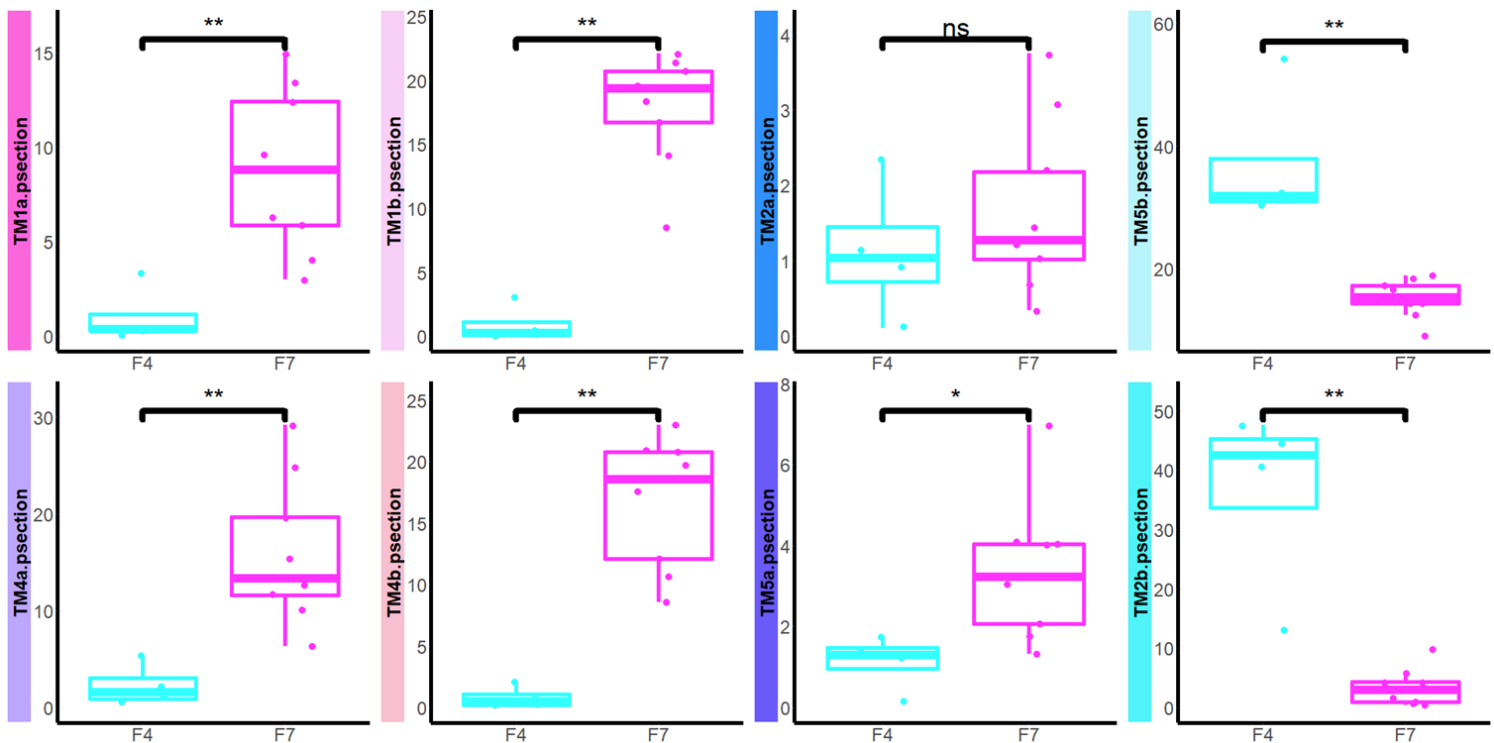
Comme retrouvé dans la littérature depuis la thèse de Méchin (2000), F4 présente une moelle bleue après coloration à la solution FASGA (Figure 2A, Lopez-Marnet et al., (soumis), Chapitre II). Contrairement à F4, la lignée F7 possède une moelle rouge une fois colorée à la solution FASGA (Figure 2B, Lopez-Marnet et al., (soumis), Chapitre II) comme présenté dans la thèse de (El Hage, 2018).



**Figure 2 : Coupes transversales d'entrecœuds de maïs colorés à la solution FASGA (A) F4 (B) F7 (Adapté de Lopez-Marnet et al., (soumis), Chapitre II).**

F4 présente une surface de coupe de 0.84 cm<sup>2</sup> qui est significativement inférieure à celle de F7 avec 1.38 cm<sup>2</sup> (Annexe 2). Néanmoins, il est retrouvé chez F4 comme chez F7 les mêmes

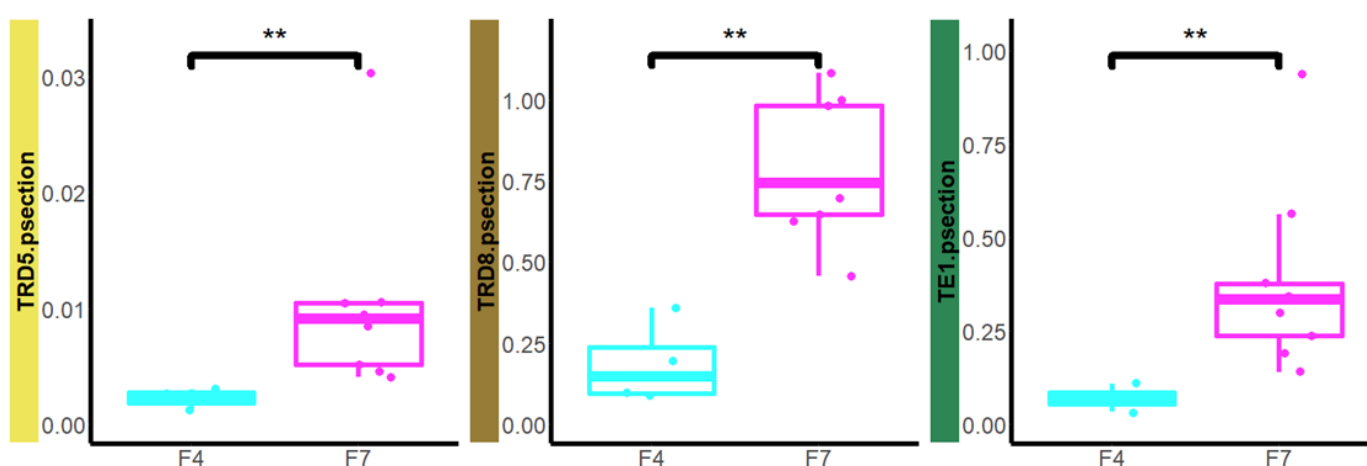
proportions de moelle (environ 83 %) et d'écorce (environ 12 %) (Annexe 2). La surface de faisceaux représente environ 5 % de la coupe et est significativement plus élevée chez F4 (environ 6 %) que chez F7 (environ 4 %) (Annexe 2). Au niveau de sa moelle colorée en bleu majoritairement, F4 a significativement, comme attendu, plus de surface de parenchyme peu lignifié que F7, 75.73 et 23.6 % de section respectivement. Inversement, F4 a significativement moins de surface lignifiée que F7, 5.04 et 59.3 % de section respectivement (Annexe 2 et, Figure 2). Au niveau d'une segmentation plus fine de la moelle, seuls les tissus de type « a » ou « b » sont significativement différents entre F4 et F7 (excepté pour le tissu TM2a) (Annexe 2 et Figure 3). F7 a plus de surface de tissus récalcitrants à la digestion (8.69 contre 1.03 % de section pour TM1a et 15.88 contre 2.31 % de section pour TM4a), de surface de tissus non digestibles (17.87 contre 0.89 % de section pour TM1b et 16.86 contre 0.8 % de section pour TM4b) et de surface de tissus peu digestibles (3.39 contre 1.12 % de section pour TM5a) alors que F4 a plus de surface de tissus digestibles (36.41 contre 3.38 % de section pour TM2b et 37.07 contre 15.17 % de section pour TM5b) (Annexe 2 et Figure 3).



Gradient de digestibilité des tissus

**Figure 3 : Représentation graphique des surfaces des tissus histologiques de la moelle de type « a » et « b » pour illustrer les différences entre les lignées de maïs F4 (n=4) et F7 (n=7), ns = non significatif, \* = 0.05, \*\* = 0.01, Echelle de digestibilité des tissus.**

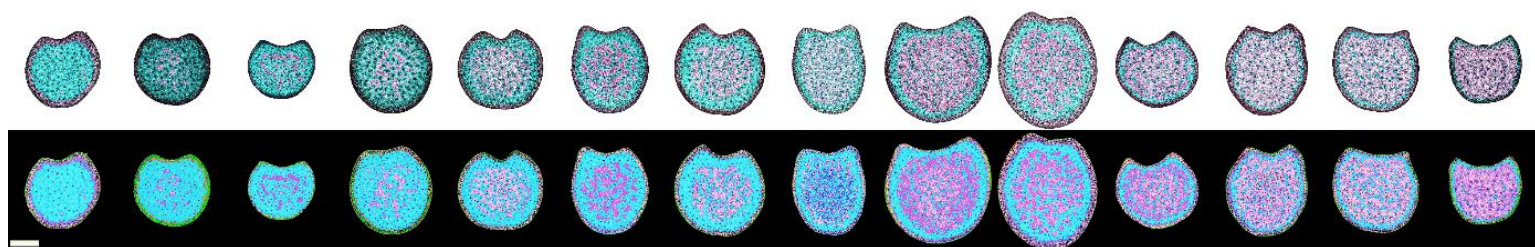
Au niveau de l'écorce, F4 et F7 sont sensiblement identiques et seuls trois tissus de l'écorce (TRD5, TRD8 et TE1) ont des surfaces significativement différentes entre les lignées parentales. Pour ces trois tissus F7 présente significativement plus de surface (0.01, 0.78 et 0.38 respectivement) que F4 (0, 0.19 et 0.07 respectivement ; Annexe 2 et Figure 4). Ces tissus représentent moins de 0.2 % de la surface de section de coupe d'un entrenœud de maïs. Les tissus TRD5 et TRD8 sont localisés dans les faisceaux de la partie « dark » ou sombre de l'écorce et TE1 est localisé au niveau de l'épiderme (Annexe 2, Lopez-Marnet et al., (soumis), Chapitre II). Les travaux de (Wilson et al., 1993) sur sorgho ont montré que les tissus présents minoritairement en surface ne sont pas à négliger pour rendre compte des différences au niveau de la composition de la biomasse.



**Figure 4 : Représentation graphique des différences de surfaces des tissus de l'écorce TRD5, TRD8 et TE1 entre les lignées parentale F4 (n=4) et F7 (n=7).**

## 2. Variations au sein de la population de RILs

Cette population de lignées recombinantes a été construite à partir de deux parents choisis pour leur contraste au niveau du profil histologique. Au sein de la population, nous retrouvons des RILs qui ont le même profil histologique global que F4 (avec une moelle peu lignifiée, colorée en bleu par la solution FASGA), et d'autres qui ont un profil histologique global semblable à F7 (avec une moelle lignifiée, colorée en rouge par la solution FASGA) et des lignées présentant des profils histologiques intermédiaires (Figure 5). Cette gamme de variation des profils histologiques est nettement supérieure à celle observée au sein des lignées recombinantes issues du croisement entre F271 et CM484 (El Hage et al., 2021). Cette population issue du croisement entre F4 et F7 est donc idéale pour identifier les déterminismes génétiques qui sous-tendent les variations de profils histologiques.



**Figure 5 : Illustration de la variation de profils histologiques au sein de la population de RILs issues du croisement entre F4 et F7. (A) Images acquises sur des coupes transversales colorées au FASGA (B) Profils de sortie d'analyse d'images avec le workflow développé par Lopez-Marnet et al., (Soumis, Chapitre II)**

Pour la plupart des caractères quantifiés au moyen du workflow que j'ai élaboré (Lopez-Marnet et al., (soumis, Chapitre II), un effet génotypique important est observé (Annexe 3, excepté pour les tissus TRD 4 et TRD5, TRL1, TRL6 et TRL9, TM6, TM7 et TM9).

Les surfaces de parenchyme lignifié (coloré en rouge par la solution FASGA) occupent en moyenne 35.5 % de la section de la coupe dans la population de RILs et varient entre 0.62 % et 69.16 % de la section de coupe. Les RILs issues du croisement entre F4 et F7 peuvent avoir plus de parenchyme rouge lignifié que F7 mais difficilement moins de parenchyme rouge que F4 qui en a déjà très peu (Annexe 2). Les surfaces de parenchyme peu lignifié (coloré en bleu par la solution FASGA) occupent en moyenne dans la population 45 % de la section de coupe variant entre 14 et 87 % de la section. Des transgressions positives et négatives sont donc observées (valeur moyenne de parenchyme peu lignifié F4  $75.73 \pm 6.09$  et F7 de  $23.6 \pm 5.35$  % de la section ; Annexe 2). Les surfaces de tissus lignifiés et peu lignifiés ont une héritabilité de 0.45 et 0.48 de la section respectivement (Annexe 3) alors que la surface de moelle a une héritabilité de 0.38.

Les tissus qui composent la moelle présentent de larges gammes de variations et occupent une forte proportion de la coupe. Les tissus principaux de la moelle sont TM1, TM2, TM4 et TM5 et peuvent représenter jusqu'à plus 50 % de la section. Le workflow permet de segmenter ces tissus de moelle en types « a » et « b » (Chapitre II de la thèse). L'héritabilité moyenne de ces tissus est d'environ 0.45 alors que les autres tissus de la moelle présentent des héritabilités plus faibles (Annexe 3).

La surface d'écorce présente une gamme de variation globale allant de 1 à 32 % de section et une héritabilité de 0.34 que nous pouvons comparer à l'héritabilité de largeur de l'écorce mesurée par Mazaheri et al., (2019) et estimée à 0.58 sur un panel de diversité comprenant 942 lignées de maïs et en utilisant le workflow proposé par Heckwolf et al., (2015).



TB2 est le principal tissu des faisceaux en surface et aussi le plus variable (entre 1 à 7 % de section) alors que la surface totale de faisceaux varie entre 2.81 à 9 % de la section (Annexe 3). L'héritabilité des tissus des faisceaux est en moyenne de 0.37 (Annexe 3) et celle de la surface de faisceaux est de 0.38. Elle est deux fois moins importante que celle rapportée par Mazaheri et al., (2019) ( $h^2 = 0.85$ ), Zheng et al., (2021) ( $h^2 = 0.61$ ) ou encore Zhang et al., (2021) ( $h^2 = 0.7$ ). Les deux derniers travaux ont utilisé de la tomographie (Du et al., 2016; Zhang et al., 2020) pour visualiser et quantifier les dimensions des faisceaux dans un entrenœud de maïs.

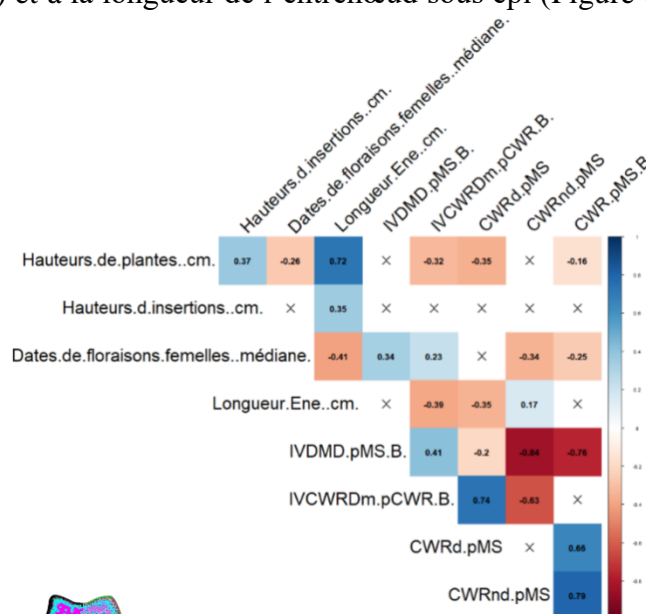
Cone and Engels, (1990) et El Hage et al., (2018) ont montré que le profil histologique d'un entrenœud de maïs répond à des variables environnementales tels le déficit hydrique ou la température. Il se peut là encore que les conditions environnementales de l'essai mené à Versailles l'été 2020 aient contribué à ces héritabilités plus faibles que celles observées dans la littérature.

## D. Variables explicatives des variations de digestibilités au sein de la population de RILs

### 1. Explication des variations de digestibilité de la matière sèche

La hauteur des plantes est significativement et positivement corrélée à la longueur de l'entrenœud sous épi (Figure 6,  $r = 0.72$ ) retenu pour les analyses histologiques et représentatif de la moyenne des variations histologiques de l'ensemble des entrenœuds d'une tige de maïs (El Hage, 2018). La hauteur d'insertion d'épi est significativement mais faiblement corrélée à la hauteur des plante (Figure 6,  $r = 0.37$ ) et à la longueur de l'entrenœud sous épi (Figure 6,  $r = 0.35$ ).

**Figure 6 : Matrice des corrélations entre les caractères agronomiques, les digestibilités et la teneur en paroi.**



La digestibilité de la MS est significativement et négativement corrélée à la teneur en paroi (Figure 6,  $r = -0.78$ ) et encore plus fortement à la teneur en paroi non digestible (Figure 6,  $r = -0.84$ ).

Pour expliquer ces variations de digestibilité de la matière sèche au sein de la population de RILs, nous avons effectué des analyses de régressions multiples. Pour la construction de ces modèles, nous utilisons les variables explicatives présentées au-dessus. Deux modèles à 1 ou 2 régresseurs apportent la même part d'explication des variations d'IVDMD. Ces modèles combinent la teneur en paroi et la digestibilité de paroi ( $R^2 = 0.73$ , Tableau 6) ou la teneur en paroi non digestible ( $R^2 = 0.71$ , Tableau 6).

**Tableau 6 : Modèles de régressions pour expliquer les variations d'IVDMD au sein de la population de RILs.** Pour chaque modèle sont indiqués les régresseurs, en vert le régresseur a un signe positif dans le modèle, en rouge le régresseur a un signe négatif dans le modèle,  $R^2$ = coefficient de détermination, AIC = critère d'information d'Akaike.

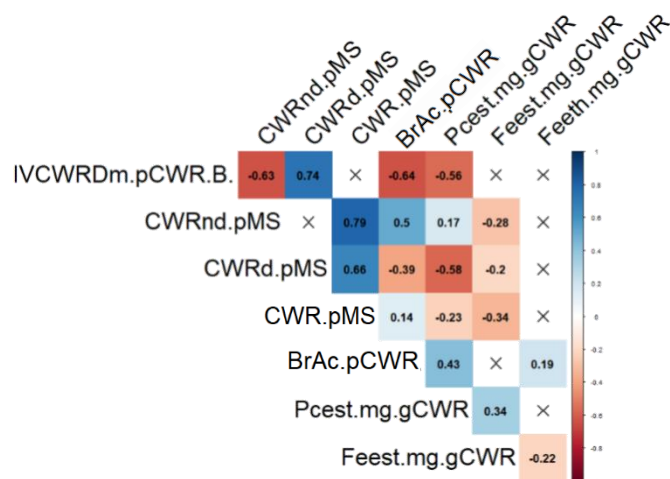
Biochimie	Population de Rils (2020)
IVDMD	1: CWR.pMS + IVCWRDm.pCWR R <sup>2</sup> :0.734 AIC: 268.88
	2: CWRnd.pMS R <sup>2</sup> :0.712 AIC: 286.8
	3: CWR.pMS R <sup>2</sup> : 0.580 AIC: 378.39
	4: IVCWRDm.pCWR R <sup>2</sup> :0.168 AIC:544.46

## 2. Explications des variations de digestibilité de la paroi

### i. Corrélations avec les variables biochimiques et histologiques

La digestibilité de la paroi et la teneur en paroi non digestible sont les deux principales cibles qui nous intéressent pour nous permettre d'améliorer la digestibilité de la matière sèche, nous allons donc nous concentrer sur elles par la suite. La digestibilité de la paroi (IVCWRDm.pCWR) est significativement corrélée négativement à la teneur en paroi non digestible (CWRnd.pMS) ( $r = -0.63$ , figure 7), à la teneur en lignine BrAc (BrAC.pCWR) ( $r = -0.64$ , figure 7) et à la teneur en acide *p*-coumarique (Pcest.mg.gCWR) ( $r = -0.56$ , figure 7) et significativement corrélée positivement à la teneur en paroi digestible ( $r = 0.74$ , figure 7).

Malgré une gamme de variation réduite (11 à 16 %CWR), la teneur en lignine BrAc (BrAc.pCWR) est toute de même un caractère bien corrélé négativement à la digestibilité de la paroi.



**Figure 7 : Matrice des corrélations sur le jeu de données des caractères biochimiques acquises sur la population de RILs F4xF7.**

La teneur en acide *p*-coumarique alors qu'elle est corrélée à IVCWRDm affiche une très faible corrélation avec CWRnd ( $r = 0.17$ , figure 7) signant là une différence entre ces deux estimateurs de la digestibilité des parois.

Lorsque nous regardons les paramètres histologiques, peu de corrélations significatives sont observées avec les différentes digestibilités au sein de la population de RILs et celles observées restent très faibles ( $r < 0.26$ , Figure 8). Pour IVCWRDm, la seule corrélation positive est avec le TM5b ( $r = 0.15$ , Figure 8). La digestibilité de la paroi est aussi corrélée négativement aux tissus colorés en rouge au FASGA de type « b » du parenchyme lignifié (TM1b et TM4b,  $r = -0.19$  et  $-0.2$ , Figure 8). D'autres tissus localisés dans l'écorce claire (TRL5, TRL7, TRL8 et TRL9) ou l'épiderme (TE1 et TE2) sont corrélés négativement à la digestibilité de paroi. Certaines de ces corrélations sont retrouvées avec la teneur en paroi non digestible (TM5b et TM4b :  $r = -0.15$  et  $0.16$  respectivement, TRL5 et TRL8 et TE1 et TE2 :  $r = 0.24$ ,  $0.16$ ,  $0.26$  et  $0.23$  respectivement).



Les tissus négativement corrélés à la teneur en paroi non digestible TRD6 et TB2 sont des tissus colorés en bleu par la solution FASGA. TRD6 localisé dans la partie sombre de l'écorce est un tissu sous épidermique qui pourrait s'apparenter à du mésophylle. Des corrélations positives sont aussi obtenues entre la teneur en paroi non digestible et les tissus TRL2, TRL4, TRL5, TRL8, TE1, TE2, TB4 et TM4b.

La teneur en paroi digestible est quant à elle corrélée positivement au TB1 et TB4 ( $r = 0.18$  et  $0.15$  respectivement) et négativement au TRD1 TRL7 TM2a TM5a et TM1b ( $r = -0.16$ ,  $-0.17$ ,  $-0.16$ ,  $-0.13$  et  $-0.15$  respectivement). Les tissus TM2a et TM5a sont des tissus du parenchyme bleu et ne sont pas digestibles et le TM1b est un tissu du parenchyme rouge non digestible. Leurs corrélations négatives avec la teneur en paroi digestible sont attendues.

Les corrélations entre les variables biochimiques et histologiques sont faibles (Figure 11). De plus le réseau de corrélations entre les caractères nous permet de visualiser clairement la séparation entre les caractères biochimiques et histologiques (Figure 12). La région « bleu » correspond à la région en lien avec l'IVDMD, l'IVCWRDm et les CWRnd et CWRd. Cette région se superpose partiellement à la région « jaune » qui correspond à la région dédiée aux caractères biochimiques. Ces deux régions sont séparées de la région « brune » qui correspond à la région dédiée aux paramètres histologiques. Nous n'observons pas de liaisons (vertes ou rouges, supérieures à un coefficient de corrélation à 0.3) entre les régions digestibilité et/ou biochimie et la région histologique. Ce type de séparation entre les caractères biochimiques et histologiques a déjà été constatée dans la thèse de El Hage (2018) au sein de la population de lignées recombinantes Cm484xF271 (Chapitre 3 : Figure 19, El Hage, 2018).

Face à ces faibles implications des paramètres histologiques dans les variations de digestibilité observées sur l'ensemble de la population des RILs analysés, nous avons choisi de diviser les RILs en fonction de leur type de profil histologique (histotype).

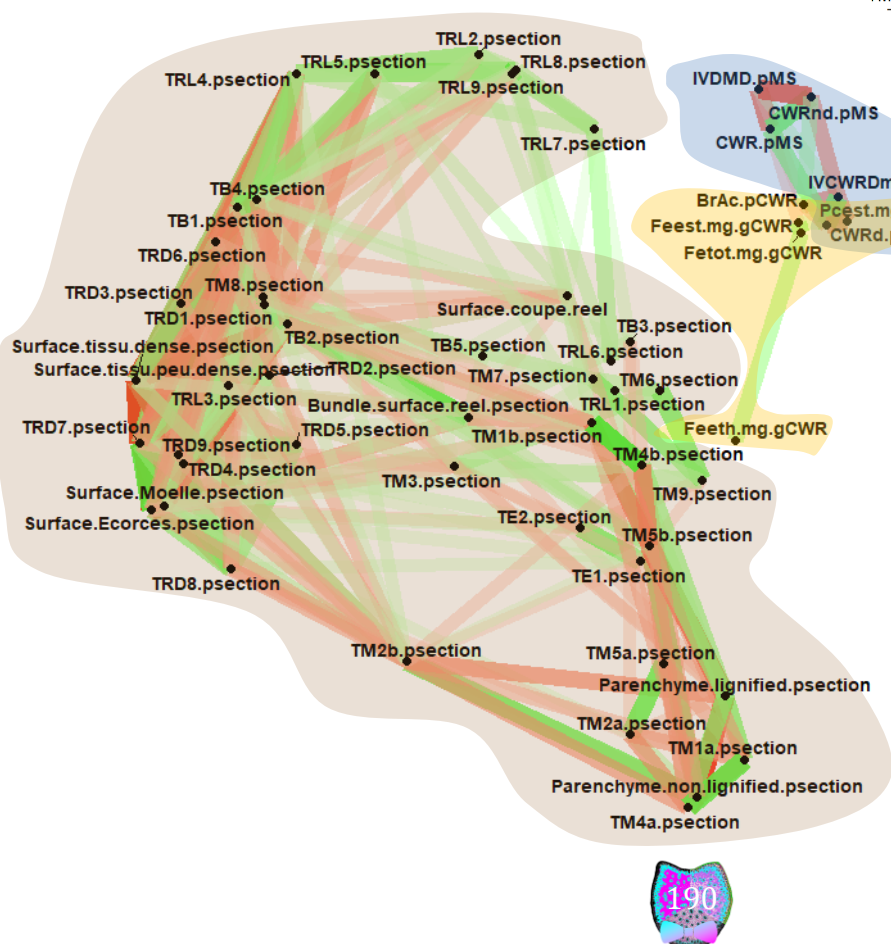
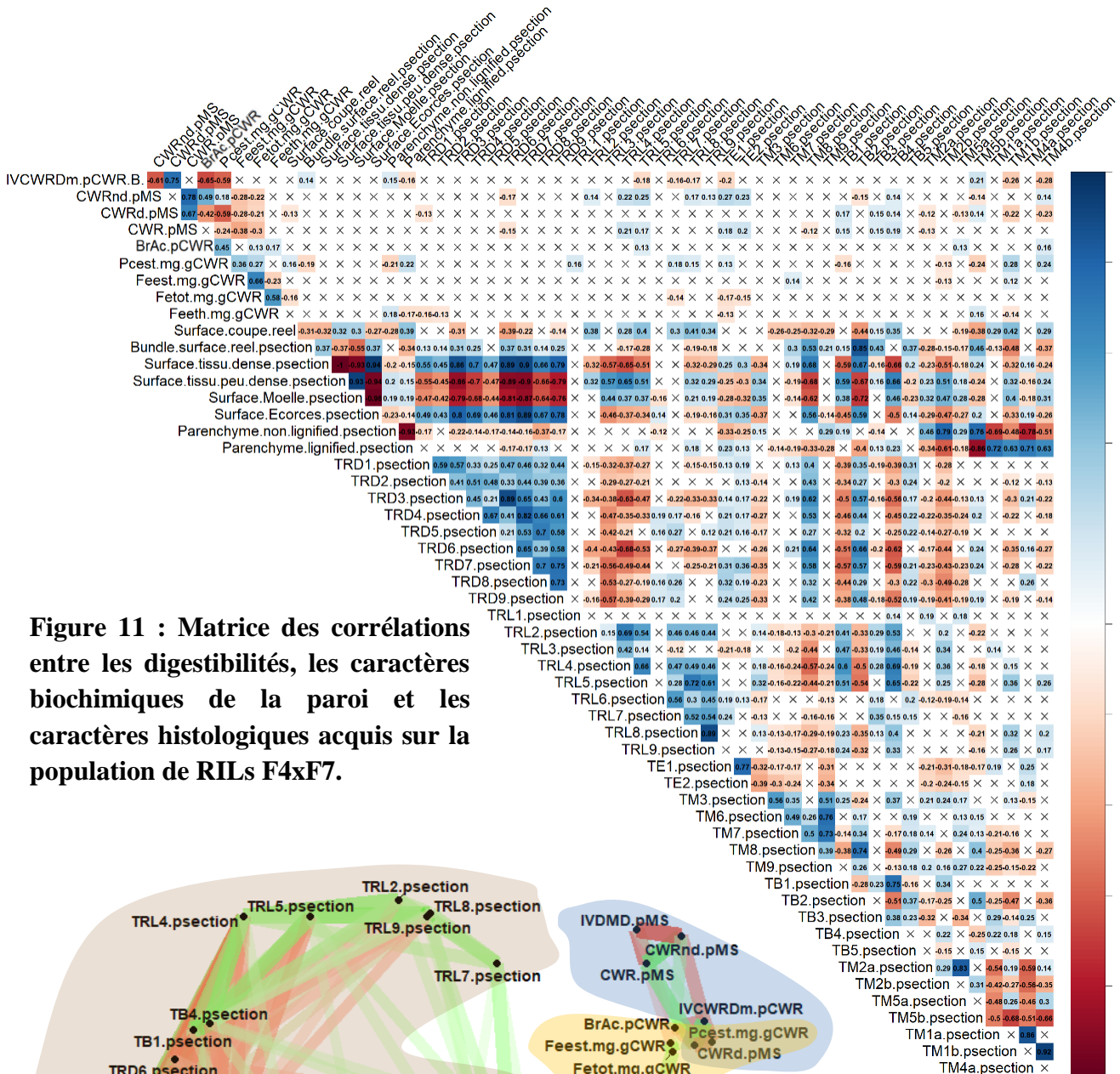


Figure 12 : réseau de relations entre les digestibilités, les caractères biochimiques de la paroi et les caractères histologiques acquis sur la population de RILs F4xF7.



- ii. Identification de 3 histotypes au sein de la population de RILs et identification des cibles histologiques et biochimiques impliquées dans les variations de digestibilité au sein de chaque groupe d'histotype.

- a. Séparation des RILs en 3 histotypes

Les parents de la population de RILs possèdent des profils histologiques très différents (Figure 2), mais restent tous les deux très digestibles (Figure 1, Tableau 2). Ils ont néanmoins une digestibilité de paroi différente notamment avec F4 possédant plus de paroi digestible que F7 (Figure 1). Leurs profils de lignification étant très contrastés, cela suggère que deux stratégies opposées de répartition de la lignification au sein de l'entrenœud permettent d'avoir une bonne digestibilité de la matière sèche mais pas forcément une aussi bonne digestibilité de paroi.

Pour grouper les RILs et les parents en fonction de leur stratégie de lignification, nous avons utilisé les 40 tissus de la coupe (segmentation la plus fine) pour créer un arbre et segmenter la population en trois groupes (Figure 13 A à C). Au sein de ces trois groupes, nous pouvons identifier le groupe 1 comme étant le groupe avec un profil histologique semblable à celui de F7. Le groupe 1, caractérisé comme étant le groupe « F7 », rassemble 8 des 9 coupes transversales d'entrenœuds caractérisés pour F7 (Figure 13A). L'ensemble des coupes qui composent ce groupe possèdent une moelle principalement rouge une fois colorée à la solution FASGA (Figure 13A). Le groupe 2, quant à lui, est caractérisé comme étant celui du groupe « F4 » (Figure 13B). Le groupe 2 rassemble les 4 coupes histologiques provenant des entrenœuds de la lignée F4 (Figure 13B). Les coupes transversales composant ce groupe ont généralement un parenchyme bleu une fois colorées à la solution FASGA (Figure 13B). Néanmoins nous pouvons constater une large gamme de variabilité de profil histologique au sein du groupe de F4 (Figure 13B). Le groupe numéro 3 est le groupe intermédiaire. Il rassemble des coupes aux profils divers tout en présentant toujours un parenchyme médullaire plutôt rouge une fois coloré à la solution FASGA.

Figure 13: (A) Groupe 1 (F7)

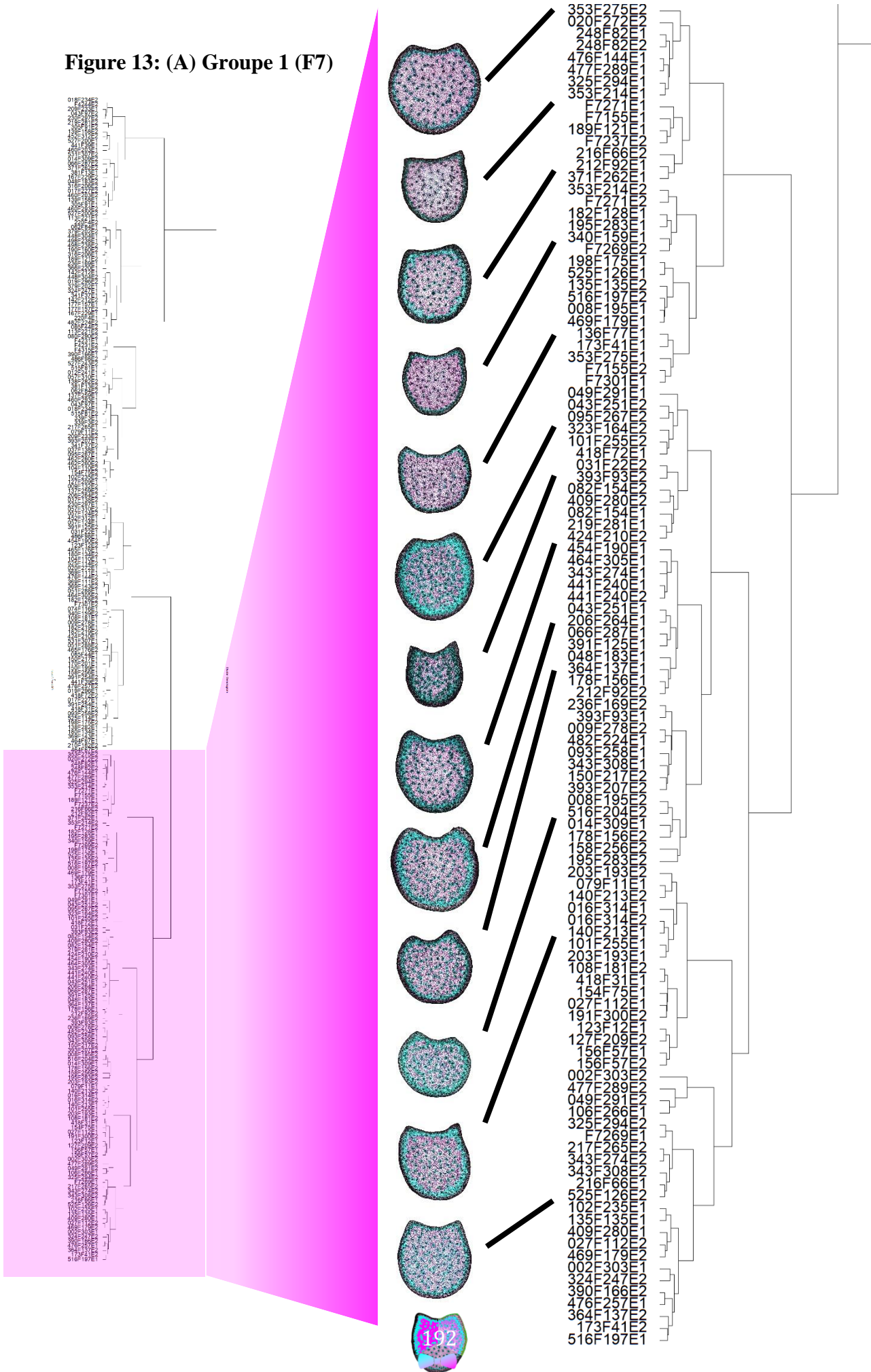
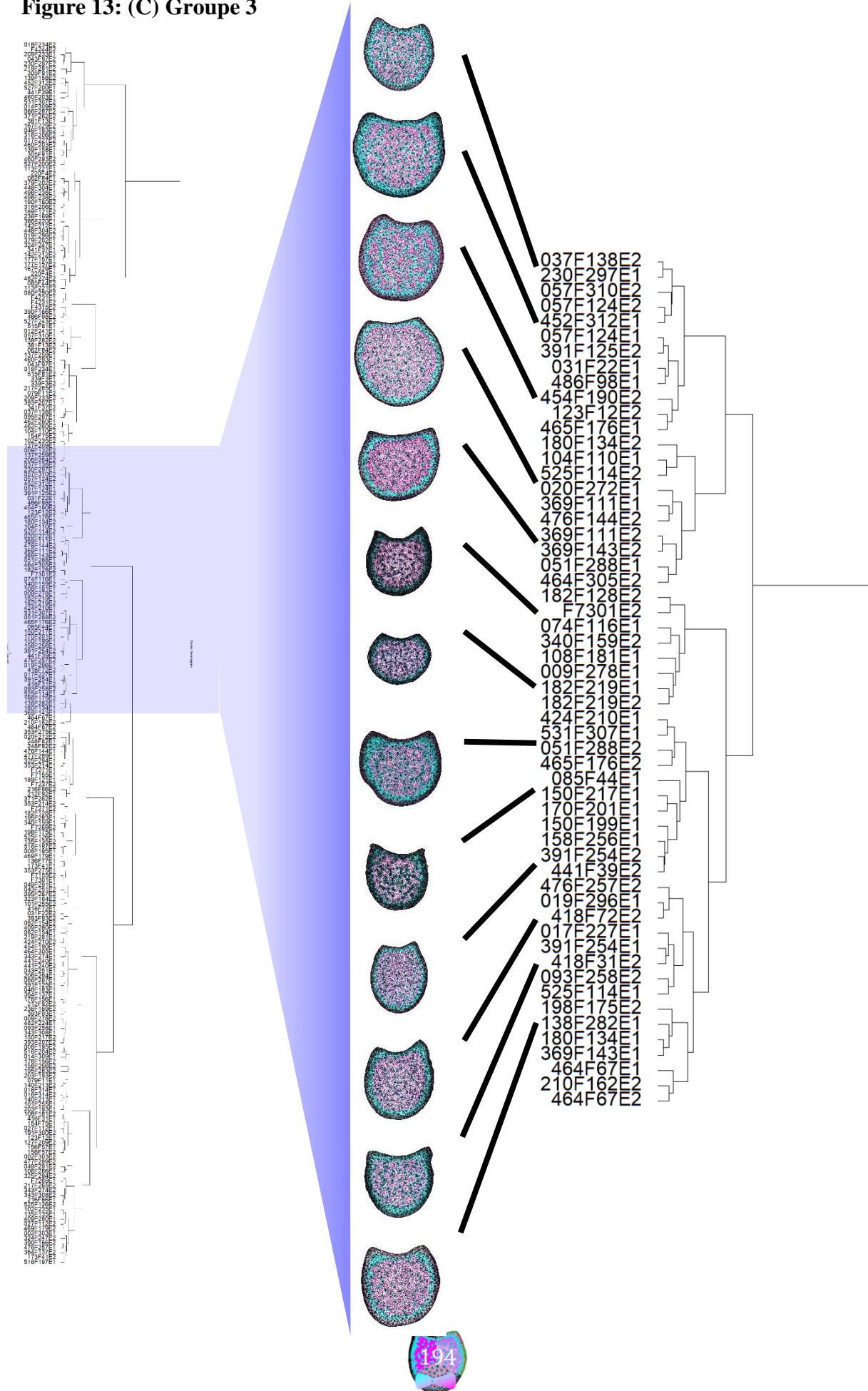




Figure 13: (C) Groupe 3

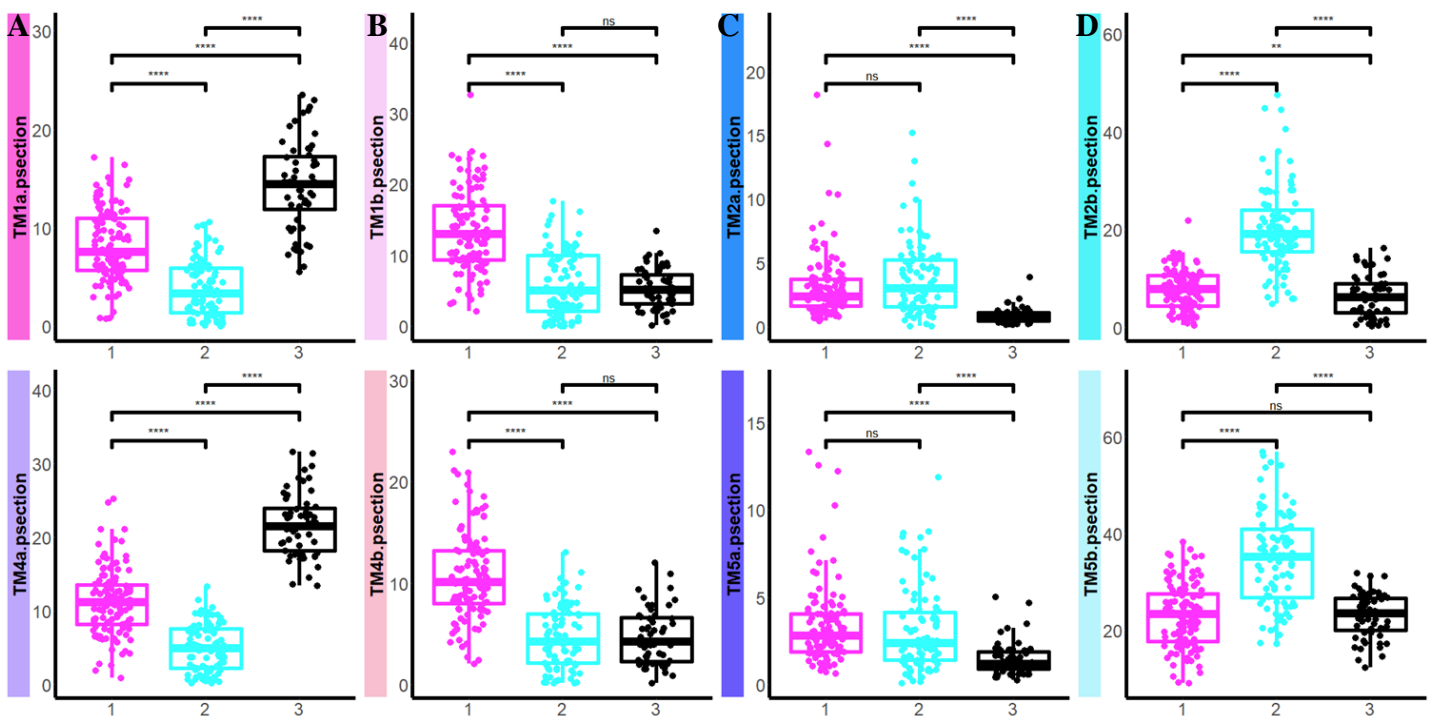




**Figure 13 : Répartition de la population de RILs issues du croisement F4xF7 en trois groupes sur la base des 40 types de tissus histologiques.** (A) Groupe 1 avec des profils de type « F7 » (B) Groupe 2 avec des profils de type « F4 » (C) Groupe 3.

b. Présentation des différences histologiques entre les groupes

Comme observé précédemment, les coupes qui caractérisent le groupe 2 incluant F4 possèdent significativement plus de coupes ayant un parenchyme bleu digestible (TM2b et TM5b) (Figure 13B, Figure 14D et Annexe 4). Alors que le groupe F7 se caractérise par significativement plus de parenchyme rouge non digestible (TM1a, TM1b, TM4a et TM4b) que le groupe F4 (Figure 14A et 14B et Annexe 4). Le groupe 3 se distingue au niveau de la moelle des deux autres groupes par significativement plus de tissus TM1a et TM4a et significativement moins de tissus de TM2a et TM5a (Figure 14A et 14C et Annexe 4).



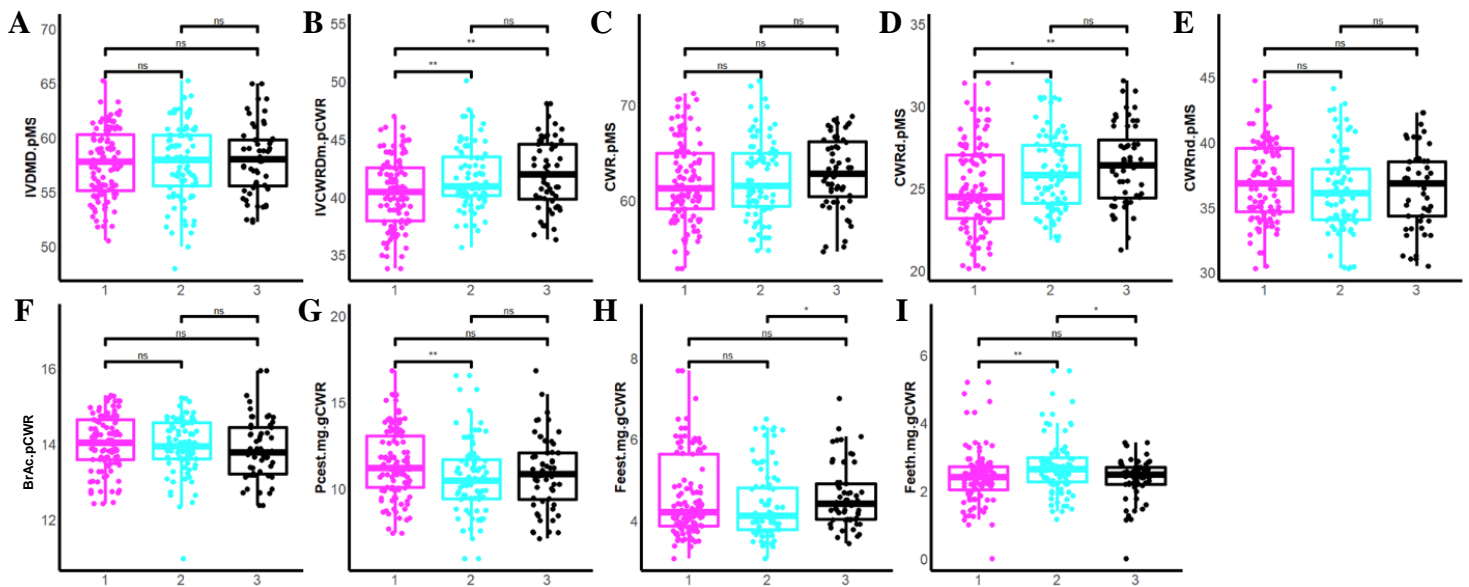
**Figure 14 : Représentations graphiques des différences histologiques de la moelle pour les trois groupes présentés sur le dendrogramme (Figure 13).** En rose le groupe 1 ou F7. En turquoise le groupe 2 ou F4 et en noir le groupe intermédiaire. (A) Tissus récalcitrants à la digestion (TM1a et TM4a), (B) Tissus non digestibles (TM1b et TM4b), (C) Tissus peu digestibles (TM2a et TM5a), (D) Tissus digestibles (TM2b et TM5b).

Les autres types tissulaires de la moelle ne sont *a priori* pas impliqués dans la formation des groupes, seul le tissu TM3 montre une différence significative entre le groupe 3 et les groupes 1 et 2. Les tissus des faisceaux sont eux aussi peu impliqués dans la formation des

groupes (Annexe 4). Pour les tissus de l'écorce, le groupe 3 aurait une écorce sombre plus similaire à celle du groupe de F7 qu'à celle du groupe de F4, et inversement pour l'écorce claire le groupe 3 serait plus similaire au groupe de F4 qu'à celui de F7 (Annexe 4).

c. Présentation de différences biochimiques entre les groupes

Les trois groupes que nous venons de présenter affichent des profils histologiques moyens très contrastés, notamment en termes de coloration bleue ou rouge du parenchyme médullaire. Il est d'autant plus spectaculaire de constater que ces 3 groupes affichent malgré tout des digestibilités de la MS similaires (figure 15A) associées à des teneurs en paroi et en lignine comparables (figure 15C et 15F). Le groupe F7 présente par contre une digestibilité de paroi et une teneur en CWRd significativement plus faible que celles des deux autres groupes (Figure 15B et 15D). Le groupe F7 présente enfin une teneur significativement plus élevée en acide *p*-coumarique et en acide férulique étherifié (Figure 15G et 15I).



**Figure 15 : Représentations graphiques des différences biochimiques pour les groupes identifiés grâce au dendrogramme (Figure 13). En rose le groupe 1 ou F7, en turquoise le groupe 2 ou F4 et en noir le groupe intermédiaire. (A) Digestibilité de la matière sèche, (B) Digestibilité de la paroi, (C) Teneur en paroi, (D) Teneur en paroi digestible, (E) Teneur en paroi non digestible, (F) Teneur en lignine (BrAc) dans la paroi (G) Teneur en acide *p*-coumarique dans la paroi, (H) Teneur en acide féruliques estérifié dans la paroi, (I) Teneur en acide férulique étherifié dans la paroi.**



### d. Variables biochimiques et histologiques explicatives des variations de digestibilité de paroi dans l'ensemble de la population et au sein des 3 groupes d'histotypes

Lorsque l'on considère uniquement les paramètres biochimiques, que l'on se place à l'échelle de la population entière ou au sein de n'importe quels des trois groupes d'histotypes, la gamme de variation de la digestibilité pariétale reste importante (Figure 15 B). Invariablement, sur l'ensemble de la population ou dans chacun des groupes, la teneur en lignine explique environ 42% des variations de digestibilité de paroi (Tableau 6), la teneur en acide *p*-coumarique en explique environ 32% (Tableau 6) et ensemble ces deux paramètres expliquent environ 52% des variations d'IVCWRDm (Tableau 6). Ainsi, que le profil histologique moyen soit bleu ou rouge, les teneurs en lignine et en acide *p*-coumarique rendent toujours compte ensemble de plus de 50% des variations de digestibilité de paroi.

Lorsque nous considérons les variables histologiques pour tenter d'expliquer les variations de digestibilité de paroi, il ne faut pas cacher que les résultats sont un peu décevants. Que l'on soit à l'échelle de la population entière ou de l'un des 3 groupes, les variables histologiques peinent à expliquer une part importante des variations d'IVCWRDm. Une combinaison de variables peut réussir à expliquer environ 10 à 20 % des variations suivant le groupe considéré (Tableau 6). Dans le groupe F7 (parenchyme médullaire rouge), favoriser la mise en place de parenchyme bleu (TM5b) et limiter la lignification de l'épiderme (TE1) permet d'augmenter la digestibilité de paroi (Tableau 6). Dans le groupe F4 (parenchyme médullaire bleu), limiter la surface de tissus bleu les moins faciles à digérer (TM2a) et favoriser le TRL3 (Tableau 6) favorise la digestibilité. Enfin dans le groupe 3, ce ne sont pas les tissus médullaires qui permettent d'expliquer les variations de digestibilité de paroi. La digestibilité de paroi dans ce groupe, est favorisée par une limitation de la lignification de tissus de l'épiderme (TE1) et de l'écorce (TRD1 et 8 et TRL1) (Tableau 6). Dans la population entière, une limitation de la surface de tissus lignifiés dans le parenchyme médullaire (TM4b) et dans l'épiderme (TE1) favorise une digestibilité un peu plus élevée (Tableau 6).

Dans notre logique, nous avons combiné les facteurs biochimiques et histologiques pour expliquer le maximum de la variation pour la digestibilité des parois. Invariablement, les teneurs en lignine et en acide *p*-coumarique sont préférentiellement utilisées dans les modèles et l'ajout d'un paramètre histologique permet d'améliorer le pourcentage explicatif du modèle de 3 %.

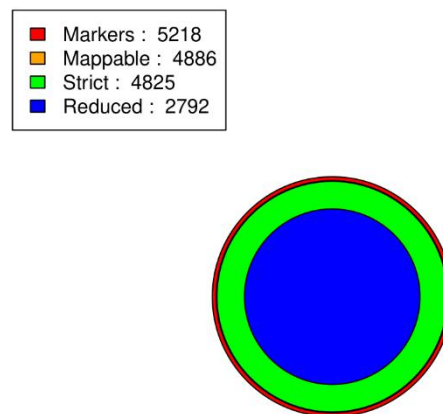
**Tableau 6 : Modèles de régressions pour expliquer les variations de teneur en IVCWRDm.pCWR en fonction de caractères biochimiques et/ou histologique de composition de la paroi au sein de la population de RILs ou des groupes créés à partir du dendrogramme. Pour chaque modèle sont indiqués les régresseurs, en vert le régresseur a un signe positif dans le modèle, en rouge le régresseur a un signe négatif dans le modèle, R<sup>2</sup>= coefficient de détermination, AIC = critère d'information d'Akaike.**

IVCWRDm	Jeu de données complet	G1 (groupe F7)	G2 (groupe F4)	G3
Biochimie et Histologie	1: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR - Feest.mg.gCWR + TE1.psection R <sup>2</sup> :0.54 AIC: 346.34	1: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR + Feest.mg.gCWR + TRL2.psection R <sup>2</sup> :0.60 AIC: 153,23	1: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR + TRL3.psection R <sup>2</sup> :0.61 AIC: 102,8 5: ABL.pCWR + TRL3.psection R <sup>2</sup> :0.49 AIC: 124.62	3: BrAc.pCWR + TE1.psection + TM3.psection 4: ABL.pCWR + TE1.psection R <sup>2</sup> :0.48 AIC: 91.85
	1: TM4b.psection + TE1.psection + TRL7.psection + TM5a.psection + TB1.psection R <sup>2</sup> :0.112 AIC: 509 2: TM4b.psection + TE1.psection + TRL7.psection R <sup>2</sup> :0.090 AIC: 510.94 3: TM4b.psection R <sup>2</sup> :0.04 AIC: 520.34 4: TE1.psection R <sup>2</sup> :0.04 AIC: 520.4	1: TM5b.psection + TE1.psection + TB2.psection + TRD3.psection + TRL7.psection R <sup>2</sup> :0.19 AIC: 232.65 2: TM5b.psection + TE1.psection R <sup>2</sup> :0.11 AIC: 237.46 3: TM5b.psection R <sup>2</sup> :0.07 AIC: 240.31 4: TE1.psection R <sup>2</sup> :0.05 AIC: 243.09	1: TM2a.psection + TRL3.psection + TRD3.psection R <sup>2</sup> : 0.13 AIC: 174.29 2: TM2a.psection + TRL3.psection R <sup>2</sup> : 0.10 AIC: 174.63 3: TM2a.psection R <sup>2</sup> :0.07 AIC: 175.35	1: TRD1.psection + TE1.psection + TM6.psection + TRL1.psection + TRD8.psection R <sup>2</sup> : 0.27 AIC: 116.51 2: TRD1.psection + TE1.psection R <sup>2</sup> :0.16 AIC: 118.49 3: TRD1.psection R <sup>2</sup> :0.11 AIC: 119.62 4: TE1.psection R <sup>2</sup> : 0.089 AIC :120.92
Biochimie	1: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.51 AIC:358.01 2: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> :0.41 AIC: 402.67 3: Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.32 AIC: 437.18	1: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR + Feest.mg.gCWR + Feeth.mg.gCWR R <sup>2</sup> : 0.59 AIC: 155.61 2: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.53 AIC:166.01 3: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> : 0.42 AIC: 187.39 4: Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.33 AIC: 203.96	1: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.58 AIC: 108.3 2: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> : 0.45 AIC:129.85 3: Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.38 AIC: 139.63	1: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR + Feeth.mg.gCWR R <sup>2</sup> : 0.50 AIC: 91.04 2: BrAc.pCWR + Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.47 AIC:92.68 3: BrAc.pCWR R <sup>2</sup> : 0.42 AIC: 95.41 4: Pcest.mg.gCWR R <sup>2</sup> :0.26 AIC: 108.88

## E. Identification du déterminisme génétique des caractères agronomiques, biochimiques et histologiques au sein de la population de lignées recombinantes F4xF7

### 1. Construction de la carte génétique

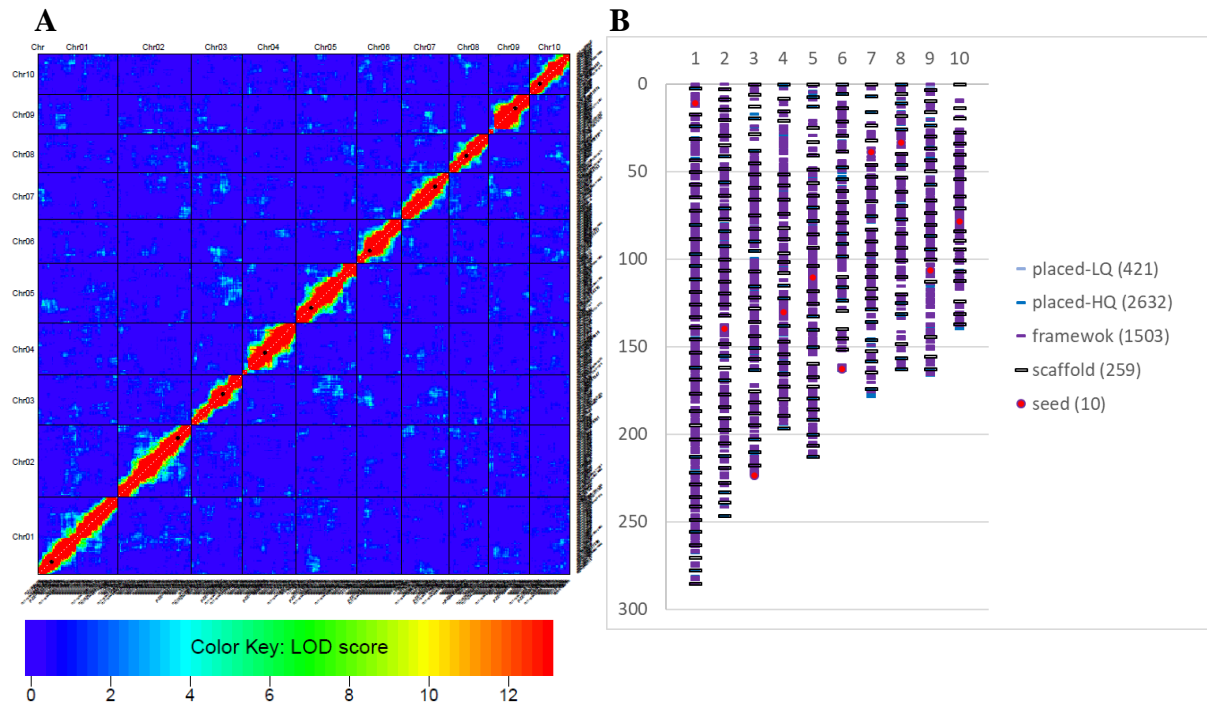
L'ensemble des 480 lignées recombinantes en génération F5 ont été génotypées dans le cadre du projet DECLIC (cf matériels et méthodes). Parmi les 14584 marqueurs SNP qui ont servi au génotypage, 5218 présentaient un polymorphisme entre les lignées parentales F4 et F7. Parmi eux 4886 SNP ont pu être placés sur une carte génétique dont 4825 ont une position unique (« strict »). 2792 marqueurs (les marqueurs dit « réduits ») ont été sélectionnés pour apporter le maximum d'information sur la carte en réduisant le nombre de marqueurs (Figure 16).



**Figure 16 : Nombres de marqueurs polymorphes (5218), cartographiés (4886), avec une position unique (4825) et nombre de marqueurs réduits (2792) pour maximiser l'information portée par la carte génétique.**

La carte génétique construite possède une densité de marqueurs très élevée et l'ordre des marqueurs obtenu sur chaque groupe de liaison s'avère très robuste (LOD de lien entre des marqueurs proches très élevé (LOD>12) ; Figure 17A).

Par ailleurs, la répartition des marqueurs sur la carte génétique est relativement homogène, ne laissant pas de grandes régions génomiques sans marqueur (Figure 17B).



**Figure 17 : (A) Carte de chaleur des tests de liaisons de la carte génétique, (B) Position des marqueurs sur la carte génétique.**

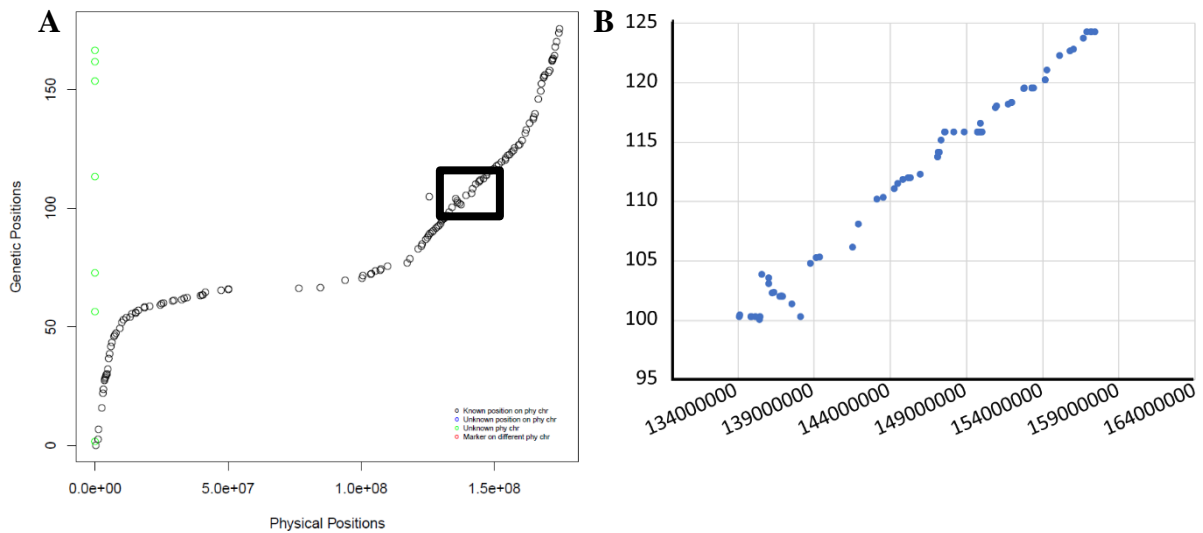
Le nombre de marqueurs ayant une position unique (marqueurs « strict ») sur chaque chromosome est détaillé dans le Tableau 7. Sur l’ensemble des chromosomes, la densité de marqueurs est élevée avec en moyenne sur l’ensemble du génome plus de 2 marqueurs par centimorgan (Tableau 7) et un centimorgan représente environ 1 Mpb sur la carte génétique établie pour la population F4xF7 (Tableau 7).

**Tableau 7 : Nombre de marqueurs stricts par chromosome et taille des chromosome en cM ou en pb.**

Chromosomes	Nombres de marqueurs "Strict"	Taille (cM)	Nombre de marqueurs / cM	Taille du chromosome (pb)	Taille moyenne d'un cM (en pb) par chromosome
1	813	286.10	2.84	300799806	1051371.51
2	644	247.88	2.60	236966845	955965.56
3	524	223.66	2.34	230900686	1032378.71
4	528	197.02	2.68	240456906	1220480.68
5	484	213.73	2.26	217708600	1018638.43
6	356	164.31	2.17	169008156	1028623.92
7	391	178.31	2.19	176135519	987817.79
8	346	162.77	2.13	175287181	1076899.71
9	421	166.62	2.53	156393501	938636.21
10	318	143.50	2.22	149308494	1040459.91

De plus, les Marey map établies pour chaque chromosome (lien entre l'ordonnement des marqueurs sur la carte physique [génom de B73] et l'ordonnement sur la carte génétique établie) indiquent que l'ordre des marqueurs obtenu sur la carte génétique reflète fidèlement l'ordre attendu des marqueurs (Annexe 5 pour visualiser toutes les marey map).

A noter tout de même qu'il y a une inversion dans l'ordre des marqueurs sur le chromosome 7, entre 100 et 105 cM (1.345 et 1.390 Mbp ; Figure 18).

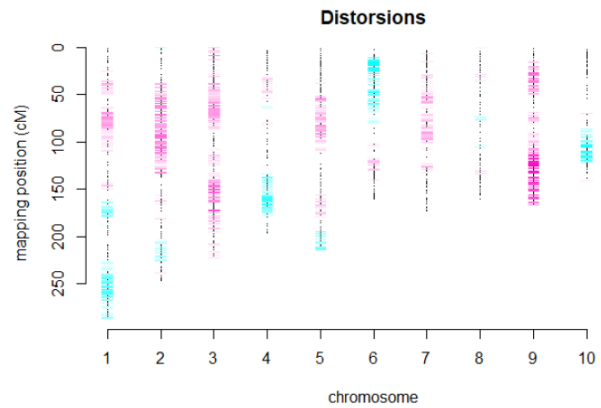


**Figure 18 : (A) Marey map des marqueurs du chromosome 7 (B) Grossissement au niveau la région en inversion [100-105] cM.**

## 2. Identification des régions génomiques distordues et des régions monomorphiques dans la population F4xF7

Une fois la carte établie, nous avons identifié les régions du génome en distorsion, qui ont une fréquence des allèles de F4 significativement différente de celle des allèles de F7, sur les RILs en génération F7. La population de RILs F4xF7 montre de multiples distorsions significatives réparties sur l'ensemble du génome (Figure 19). Il s'avère qu'au sein de la population F4xF7, il existe des régions qui présentent soit une présence accrue des allèles de F7 mais aussi des régions qui présentent une présence accrue des allèles de F4 sur l'ensemble de la population. En général, nous avons pu diagnostiquer des distorsions significatives lorsque qu'un allèle à un locus était présent à plus de 55 % sur l'ensemble des RILs. A noter qu'il y a en bas du chromosome 9 ([119-131]cM ou [141-146]Mpb) où les allèles de F7 sont présents chez plus de 80% des RILs.

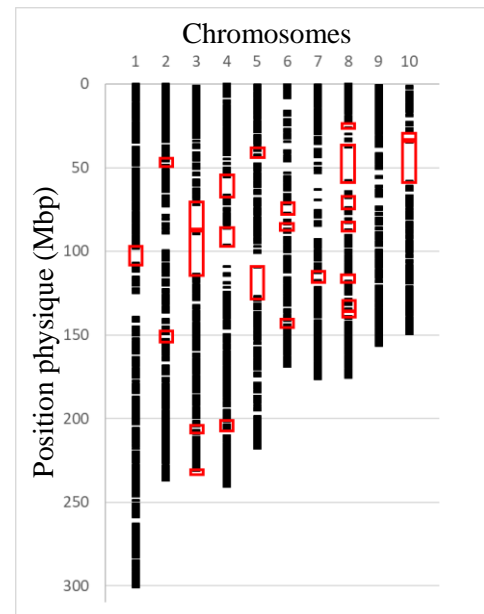
**Figure 19 : Identification des régions distordues sur la carte génétique.** Coloration rose enrichissement significatif des allèles de F7, coloration bleu enrichissement significatif des allèles de F4.



Les lignées F4 et F7 sont toutes deux des lignées cornées précoces et nous nous sommes demandés si ce génotypage à haut débit peut nous permettre d’identifier des régions monomorphes entre ces deux lignées (Figure 20). Nous avons bien pris garde à ce que ces régions ne soient pas dépourvues de marqueurs testés mais que les marqueurs dans la région testée soient réellement monomorphes.

L’ensemble des chromosomes présentent au moins une région monomorphe entre les lignées F4 et F7, avec la plus grande région qui s’étend entre 89.4 et 1.14 Mbp sur le chromosome 3 (Figure 20, Annexe 6)

**Figure 20 : Localisation des régions monomorphes entre F4 et F7, reportées sur la carte physique de B73.** En noir sont indiquées les positions des marqueurs polymorphes entre F4 et F7, et en encadrés rouges les régions monomorphes identifiées.



L’identification des régions distordues et des régions monomorphes est à mettre en regard des loci impliqués dans la variation des caractères biochimiques et histologiques qui sont identifiés dans la partie suivante. L’écueil est de ne pas détecter des QTLs dans des régions monomorphes (QTL fantômes ;(Courtial et al., 2013; Barrière et al., 2015)) et de rester vigilant à ceux cartographiés dans des régions distordues.



## F. Déterminismes génétiques des principales cibles permettant de moduler la digestibilité

### 1. Analyses de QTLs

#### i. QTLs agronomiques

Dans l'ensemble, 61 loci ont été cartographiés pour être impliqués dans la variation des caractères agronomiques (Annexe 7, Annexe 8). Parmi ces loci, des QTL très significatifs ont été identifiés avec un LOD supérieur à 5.05 (Tableau 8).

**Tableau 8 : Tableau de QTLs présentant les LOD les plus élevés pour les caractères agronomiques.**

Caractère	Chr	Position du pic (cM)	LOD
Dates De floraisons femelles médiane	2	210.46	18.77
Hauteurs d'insertions (cm)	1	246.48	9.42
Hauteurs de plantes (cm)	4	179.79	24.13
Longueur Ene (cm)	8	144.1	11.67

#### ii. QTLs de digestibilité

De la même façon, 36 QTLs ont été cartographiés pour les différentes estimations de la digestibilité (Annexe 7, Annexe 8), avec parmi eux des QTL impliqués présentant des LOD élevés (>5.05 ; Tableau 9)

**Tableau 9 : Tableau des QTLs présentant les LOD les plus élevés pour les différentes digestibilités.**

Caractère	Chr	Position du pic (cM)	LOD
IVDMD.pMS	4	59.82	18.59
IVCWRDm.pCWR	4	39.77	11.41
CWR.pMS	4	59.82	9.66
CWRnd.pMS	4	59.82	14.85
CWRd.pMS	1	164.31	12.97

Les QTL très significatifs pour l'IVDMD, CWR et CWRnd colocalisent sur le chromosome 1 à 59.82cM, ce qui est cohérent avec les fortes corrélations phénotypiques entre ces caractères.

### iii. QTLs des caractères biochimiques pariétaux

38 QTLs ont également été détectés pour l'ensemble des caractères biochimiques pariétaux (Annexe 7, Annexe 8), avec là encore des QTLs très significatifs pour ce type de caractères (Tableau 10).

**Tableau 10 : Tableau des QTLs présentant les LOD les plus élevés pour les différents caractères biochimiques de la paroi.**

Caractère	Chr	Position du pic (cM)	LOD
BrAc.pCWR	4	59.82	10.16
Pcest.mg.gCWR	6	14.68	9.45
Feest.mg.gCWR	2	115.19	10.82
Feeth.mg.gCWR	2	200.05	10.77

Le QTL d'BrAc (%CWR) cartographié sur le chromosome 4 à 59.82 cM colocalise avec les QTLs très significatifs de IVDMD, CWR et CWRnd reflétant la forte corrélation entre la teneur en lignine et les digestibilités au sein de cette population (Figure 7). Cette position a déjà été identifiée pour ces caractères dans les travaux de Virlovet et al, 2019 et de El Hage et al, 2021. Les colocalisations à ce locus avec d'autres études sont reportées dans Virlovet et al, 2019.

### iv. QTLs de caractères histologiques

Au total, 128 QTL de caractères histologiques (Annexe 7, Annexe 8) ont été détectés, certains également avec des LOD très élevés (Tableau 11).

**Tableau 11 : Tableau des QTLs présentant les LOD les plus élevés pour les différents caractères histologiques**

Caractère	Chr	Position du pic (cM)	LOD
Bundle.surface.reel.psection	10	39	5.53
Parenchyme.lignified.psection	7	120.24	5.26
Parenchyme.non.lignified.psection	5	173.5	8.09
TE1.psection	7	110.19	7.85
TRD3.psection	3	95.45	5.18
TRD9.psection	2	186.12	6.37
TRL4.psection	5	145.51	5.2

Caractère	Chr	Position du pic (cM)	LOD
TRL5.psection	7	30.09	6.2
TM1.psection	10	75.42	9.32
TM1a.psection	7	105.32	5.62
TM1b.psection	3	49.34	6.43
TM2.psection	5	170.22	8.05
TM2a.psection	2	114.72	6.14
TM2b.psection	5	170.22	7.82
TM4.psection	7	119.53	6.73
TM4a.psection	7	110.19	7.59
TM4b.psection	9	138.35	6.23
TM5.psection	5	166.22	5.55
TM5a.psection	2	70.59	5.36
TM5b.psection	5	166.22	7.77
TB2.psection	5	154.62	5.42
TB3.psection	8	69.92	5.99
TB4.psection	9	55.21	6.79

Là encore, il existe des colocalisations entre ces QTLs de caractères histologiques à effets forts. Notamment, sur le chromosome 5 entre 166 et 173 cM où des QTLs de surface de parenchyme non lignifié colocalisent avec des QTL des tissus qui le composent (TM5, TM5b, TM2, TM2b) et sur le chromosome 7 entre 110 et 12 cM où des QTLs de surface de parenchyme lignifié colocalisent avec des QTL de tissus qui le composent (TM4, TM4a) et un tissu épidermique (TE1). La littérature reste pauvre en QTL pour ce type de caractères. Seul le travail de El Hage et al, (2021) peut permettre une comparaison valable. Un QTL de « red parenchyma » avait d'ailleurs été cartographié en condition irrigué dans le travail de El Hage et al, (2021) au chromosome 7. En revanche, le QTL cartographié sur le chromosome 1 pour de nombreux paramètres histologiques chez El hage et al (2021) n'a pas été retrouvé dans la population F4xF7.

- v. Colocalisations des QTLs de digestibilités, des caractères biochimiques de la paroi et de l'histologie.

Au-delà des QTLs à effet fort, je me suis intéressé aux colocalisations (Figure 21) entre les QTL de digestibilités (IVDMD, IVCWRDm, CWRd et CWRnd), les QTL de caractères biochimiques impliqués dans la variation des digestibilité (CWR, PCest et BrAc) et les caractères histologiques impliqués dans la variation de la digestibilité (Parenchyme lignifié et TM1, TM1a TM1b, TM4, TM4a, TM4b – parenchyme non lignifié et TM2, TM2a, TM2b, TM5, TM5a, TM5b).

Mise à part la colocalisation pour les caractères IVDMD, CWR, CWRnd et ABL avec des LOD élevés au chromosome 4 à 59.82cM, d'autres cluster autour de QTL de digestibilité ont été identifiés. On peut distinguer 2 types de clusters : (i) des clusters où des QTLs de caractéristiques biochimiques sont présents et (ii) des clusters où principalement des caractères histologiques sont présents.

Les clusters pour lesquels les QTLs de digestibilité colocalisent avec des QTLs biochimiques sont localisés :

-sur le chromosome 1 à 164.31 cM, où colocalisent des QTLs de CWR, CWRd, IVCWRDm, PCest et BrAc.

- sur le chromosome 1 à 244,1 cM, où colocalisent des QTLs de CWRnd et d'IVCWRDm.

- sur le chromosome 5 entre [103.29-116.04] cM, où colocalisent des QTLs IVCWRDm, CWRnd IVDMD.pMS et PCest. Des QTLs de teneur en acide *p*-coumarique ont déjà été reportés à ce locus (Truntzler et al., 2010; Virlovet et al., 2019; El Hage et al., 2021).

- sur le chromosome 5 à 201.37 cM, où colocalisent des QTLs de IVDMD et de CWR.

- sur le chromosome 6 entre [13.89-20.85] cM, où colocalisent des QTLs de CWRd et de PCest.

- sur le chromosome 9 entre [33.09-40.92] cM, où colocalisent des QTLs de IVDMD, CWR et de CWRnd. C'est une région qui avait été identifiée dans l'analyse méta-QTL de Truntzler et al., (2010).

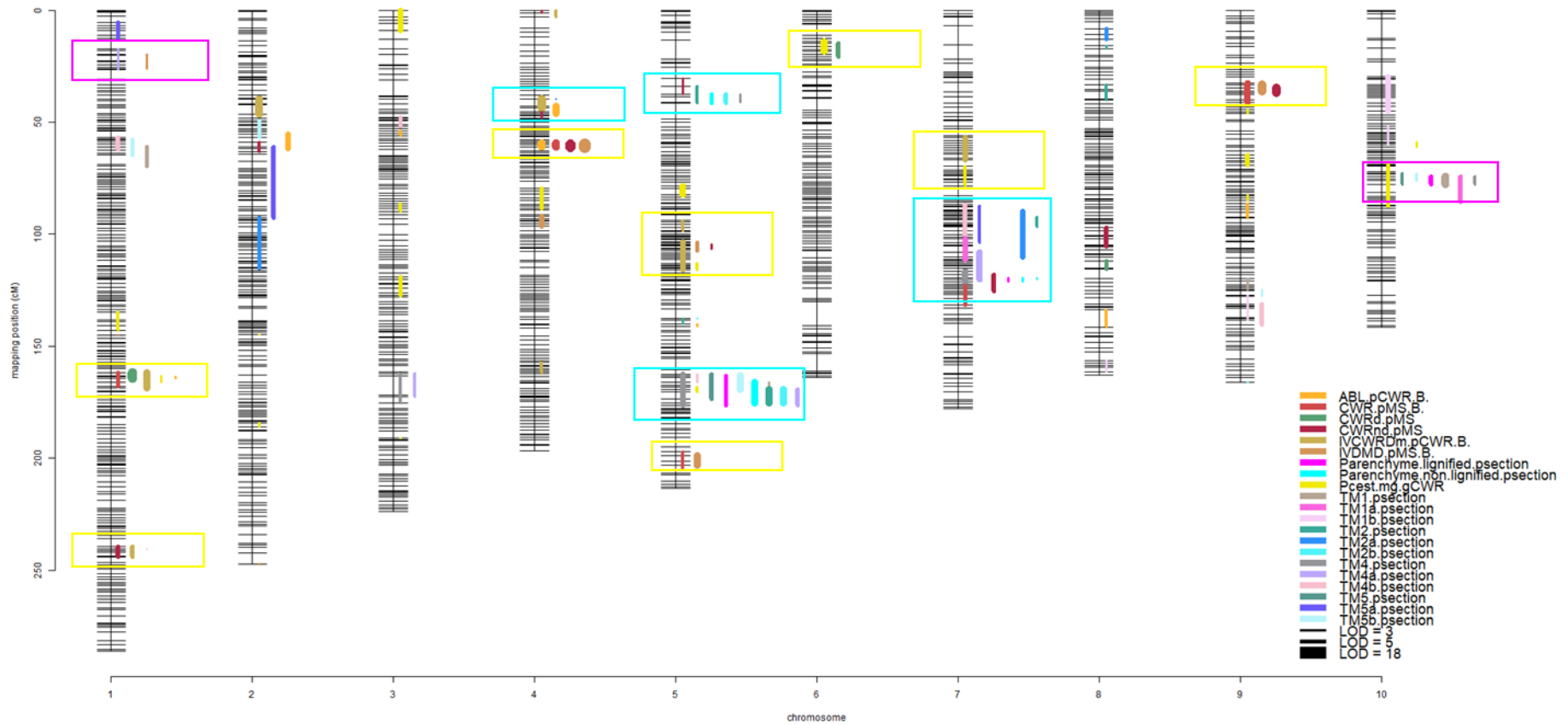
L'ensemble de ces colocalisations entre les digestibilités et les caractères biochimiques reflètent bien les corrélations phénotypiques observées au sein de la population (Figure 7).

Les clusters pour lesquels les QTLs de digestibilité colocalisent avec des QTLs d'histologie sont :

- Sur le chromosome 1 entre [17.19-26.52] cM avec des QTLs d'IVDMD et TM4a.
- sur le chromosome 4 entre [39.77-46.17] cM, où colocalisent des QTLs de IVCWRdm, CWRnd, d'BrAc et TM2a.
- Sur le chromosome 5 à [30.34-37.48] cM avec des QTL de CWRnd, TM2, TM2b et TM4.
- Sur le chromosome 7 à [87.45-125.47] cM avec un QTL de CWRnd qui colocalise avec des QTLs de TM1a, TM4, TM4a, TM4b, TM2, TM2a, TM2b, TM5a, TM5b.

Ces QTLs de digestibilité colocalisant avec des QTLs de paramètres histologiques ont souvent des effets plus faibles que ceux colocalisant avec des caractères biochimiques (Annexe 7, Annexe 8), reflétant le faible lien entre les caractères histologiques et la digestibilité au sein de cette population (Figure 11, Figure 12). Ces QTLs sont probablement en partie impliqués dans les différences de digestibilité observées entre les lignées appartenant au groupe1 et celles appartenant au groupe2 (Figure 15).

Enfin, un cluster sur le chromosome 10 entre [68.81-87.45] cM regroupe des QTLs de PCest et de paramètres histologiques (TM1, TM4, TM5, TM5b, TM1a).



**Figure 21 : Cartographie des QTLs de digestibilité de matière sèche, de digestibilité de paroi, de teneurs en BrAc, de teneur en Pcest et des surfaces de coupe de parenchyme lignifié et non lignifié.**



### 2. Mise en évidence du déterminisme génétique responsable des différences d'histotypes entre F4 et F7

Comme mentionné précédemment, l'originalité d'avoir créé une population issue du croisement entre les lignées F4 et F7 réside dans l'étude du profil histologique, puisque les parents sont histologiquement très contrastés. Une fois colorées au FASGA, les coupes issues d'entrenœuds de F4 présentent une moelle peu lignifiée bleue alors que celles de F7 sont plus lignifiées et rouges (Figure 2). Nos études ont donc porté plus particulièrement sur l'identification du déterminisme génétique impliqué dans ces variations histologiques qui se reflètent dans le caractère « surface de parenchyme non lignifié ». Des QTLs majeurs pour ce caractère ont été cartographiés sur le bas du chromosome 5 (marqueur SYN1929 à 173 cM - LOD=5 - effet=-5.2 %) et sur le haut du chromosome 5 (marqueur PZE.105017142 à 38 cM - LOD=8 - effet=-4.63 %) (Figure 22A). Un autre QTL localisé sur le chromosome 7 (marqueur PZE.107099124 à 120 cM - LOD=3.2 - effet=-4.2 %) a été détecté (Figure 22A). A noter que ces QTLs ne sont pas localisés dans des régions en forte distorsion (Figure 19), ni dans des régions monomorphiques (Figure 20).

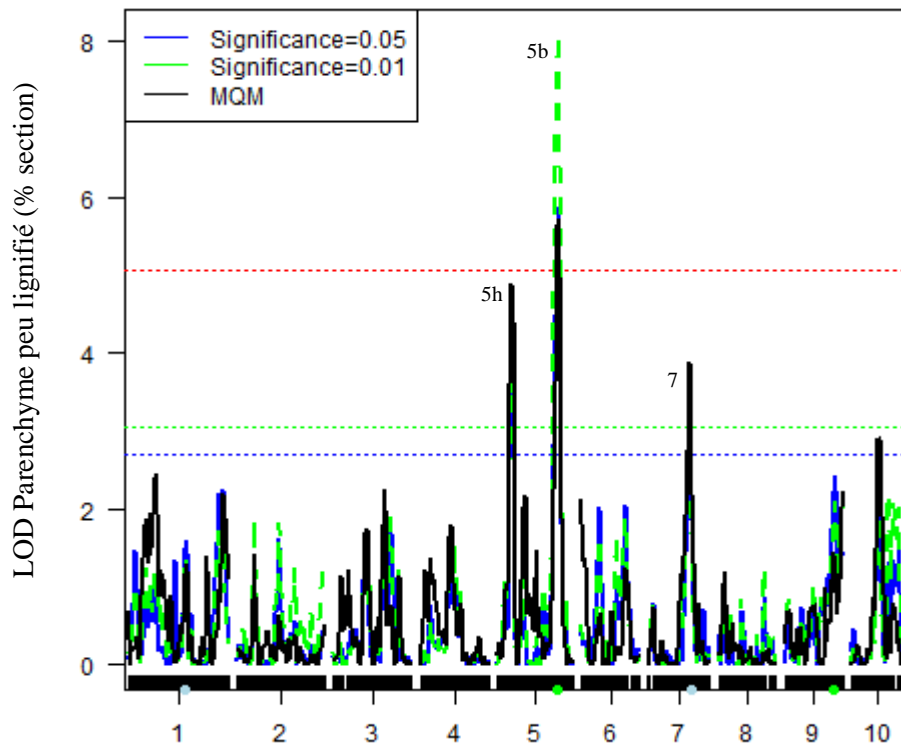
Ainsi, comme attendu au vu des histotypes des lignées parentales, le signe négatif des effets de chacun des QTL pour la surface de parenchyme non lignifié indique bien que la présence des allèles de F7 à ces loci diminue la surface de parenchyme non lignifié, bleu. En revanche, les effets individuels de chacun de ces QTLs restent faibles. Dès lors, nous avons classé les RILs de la population en fonction de la combinaison allélique à ces 3 loci, et avons testé la significativité des différences de surface de parenchyme non lignifié entre ces classes de lignées (Figure 22B). Comme attendu, les lignées recombinantes qui possèdent les allèles de F4 à ces trois loci ont en moyenne plus de 50% de la surface de coupe occupée par du parenchyme non lignifié alors que les lignées qui possèdent les allèles de F7 à ces trois loci ont en moyenne 27% de surface de coupe occupée par du parenchyme non lignifié. Pour appuyer ce fait, plus de 75% des lignées qui possèdent les allèles de F4 à ces trois loci appartiennent au groupe 2 (Figure 13B) et présentent le même histotype que F4 (Figure 22C). Similairement, moins de 10% des lignées qui possèdent les allèles de F7 à ces trois loci appartiennent à ce groupe 2 (Figure 22C). Cela reflète bien, qu'avec uniquement ces trois loci, il est possible de rendre compte des différences histologiques entre les lignées parentales.

De façon remarquable, les lignées qui possèdent les allèles de F4 au locus en bas du chromosome 5 (marqueur SYN1929) ne présentent pas, en moyenne, des surfaces de parenchyme non lignifié significativement différentes, quels que soient les autres allèles présents sur le haut du chromosome 5 et sur le chromosome 7. A l'inverse, lorsque les allèles de F7 sont présents sur le bas du chromosome 5, les impacts de l'effet allélique aux autres QTLs s'expriment. Cela suggère fortement que le QTL en bas du chromosome 5 est épistatique sur les deux autres loci.

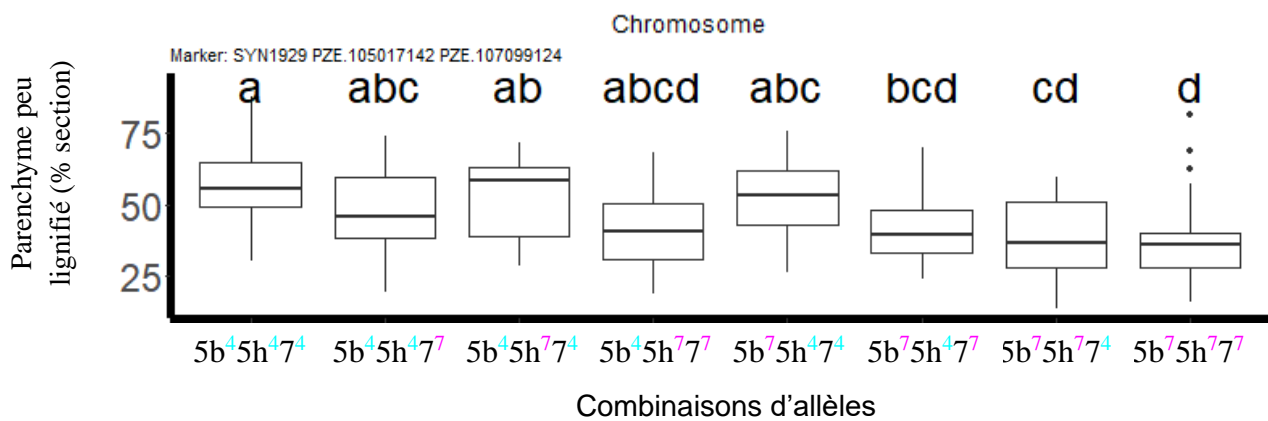
Il reste à noter que lorsque les allèles de F7 sont présents au QTL du chromosome 7, quels que soient les allèles aux autres QTLs, il y a toujours une tendance (non significative lorsque l'on compare classe à classe) à ce que la surface de parenchyme non lignifié soit réduite. De plus toutes les classes de combinaisons alléliques avec les allèles de F7 au chromosome 7 sont constituées à plus de 60% par des lignées appartenant au groupe 1 (Figure 13A, histotype F7) sauf pour les lignées possédant la combinaison allélique F4, F4, F7 aux QTLs situés en bas du chromosome 5, en haut du chromosome 5 et au chromosome 7, respectivement, suggérant là encore des relations épistatiques entre ces QTLs.

Le QTL au milieu du chromosome 7 situé au sein d'un cluster de QTLs de caractères histologiques s'étend entre 90 et 129 cM et englobe la région sur le chromosome 7 possédant l'inversion de 100 à 105 cM (Figure 18). Cette inversion pourrait être responsable de la présence du cluster de QTLs sur le chromosome 7 et être à l'origine d'une répartition différente de la lignification au sein de la moelle.

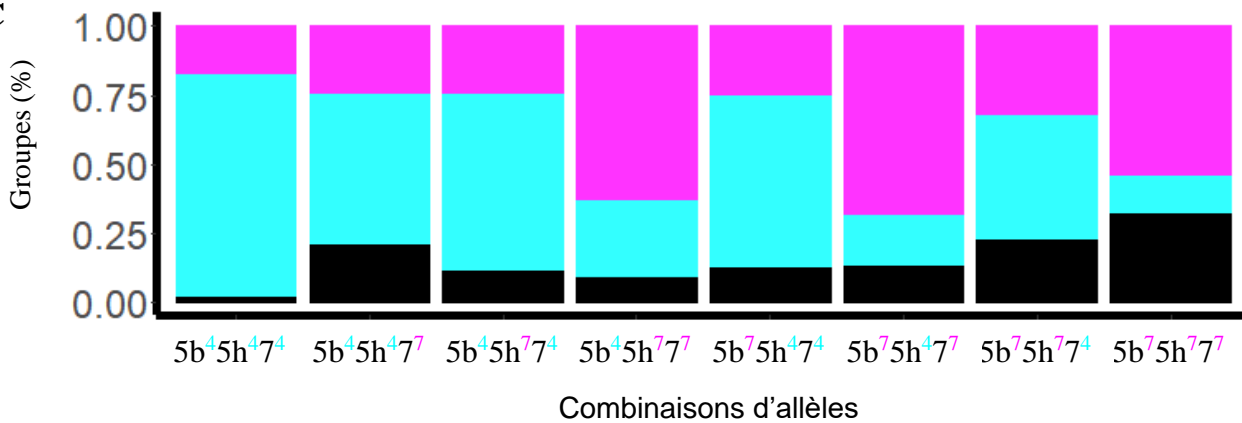
A



B



C



**Figure 22 : Déterminisme génétique de la coloration bleu/rose du parenchyme médullaire au sein des RILs issues du croisement F4xF7.** (A) Traces de LOD pour la surface de parenchyme non lignifié. En noir trace LOD sans cofacteur, en bleu trace LOD avec les cofacteurs significatif à 5 % et en vert trace LOD avec les cofacteurs significatif à 1 %. Les positions des 3 QTLs possédant des LODs les plus élevés en haut du chromosome 5, en bas du chromosome 5 et au milieu du chromosome 7 sont mentionnées par « 5h », « 5b » et « 7 » respectivement. (B) Présentation du pourcentage de parenchyme non lignifié par classes de RILs possédant différentes combinaisons alléliques au 3 QTLs 5b, 5h et 7. Les allèles de F4 sont indiqués par un 4 en bleu et ceux de F7 par un 7 en rose (C) Pourcentage de RILs pour chaque combinaison d'allèles aux 3 QTLs 5b, 5h et 7 appartenant aux 3 groupes extraits du dendrogramme (Figure 13), avec en bleu : le % de RILs appartenant au groupe 2, en rose : le pourcentage de RILs appartenant au groupe 1 et en noir : le pourcentage de RILs appartenant au groupe 3).

# Références Chapitre 4

- Barrière, Y., Courtial, A., Soler, M., Grima-Pettenati, J., 2015. Toward the identification of genes underlying maize QTLs for lignin content, focusing on colocalizations with lignin biosynthetic genes and their regulatory MYB and NAC transcription factors. *Mol Breeding* 35, 87. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0275-8>
- Barrière, Y., Guillaumie, S., Denoue, D., Pichon, M., Goffner, D., Martinant, J.-P., 2018. Investigating the unusually high cell wall digestibility of the old INRA early flint F4 maize inbred line. *Maydica* 62, 21.
- Broman, K.W., Wu, H., Sen, S., Churchill, G.A., 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19, 889–890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg112>
- Cone, J.W., Engels, F.M., 1990. Influence of growth temperature on anatomy and in vitro digestibility of maize tissues. *The Journal of Agricultural Science* 114, 207–212. <https://doi.org/10.1017/S002185960007221X>
- Courtial, A., Thomas, J., Reymond, M., Méchin, V., Grima-Pettenati, J., Barrière, Y., 2013. Targeted linkage map densification to improve cell wall related QTL detection and interpretation in maize. *Theor Appl Genet* 126, 1151–1165. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2043-7>
- Du, J., Zhang, Y., Guo, X., Ma, L., Shao, M., Pan, X., Zhao, C., Du, J., Zhang, Y., Guo, X., Ma, L., Shao, M., Pan, X., Zhao, C., 2016. Micron-scale phenotyping quantification and three-dimensional microstructure reconstruction of vascular bundles within maize stalks based on micro-CT scanning. *Functional Plant Biol.* 44, 10–22. <https://doi.org/10.1071/FP16117>
- El Hage, F., 2018. Impact du déficit hydrique sur les relations entre la dégradabilité, la biochimie pariétale et la répartition des tissus lignifiés chez l'entre-noeud de maïs et déterminisme génétique de ces caractères. l'Université Paris-Saclay, INRA Versailles.
- El Hage, F., Legland, D., Borrega, N., Jacquemot, M.-P., Griveau, Y., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2018. Tissue Lignification, Cell Wall p-Coumaroylation and Degradability of Maize Stems Depend on Water Status. *J. Agric. Food Chem.* 66, 4800–4808. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05755>
- El Hage, F., Virilouvet, L., Lopez-Marnet, P.-L., Griveau, Y., Jacquemot, M.-P., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2021. Responses of Maize Internode to Water Deficit Are Different at the Biochemical and Histological Levels. *Front Plant Sci* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.628960>
- Gouesnard, B., Negro, S., Laffray, A., Glaubitz, J., Melchinger, A., Revilla, P., Moreno-Gonzalez, J., Madur, D., Combes, V., Tollon-Cordet, C., Laborde, J., Kermarrec, D., Bauland, C., Moreau, L., Charcosset, A., Nicolas, S., 2017. Genotyping-by-sequencing highlights original diversity patterns within a European collection of 1191 maize flint lines, as compared to the maize USDA genebank. *Theor Appl Genet* 130, 2165–2189. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2949-6>
- Heckwolf, S., Heckwolf, M., Kaeppler, S.M., de Leon, N., Spalding, E.P., 2015. Image analysis of anatomical traits in stalk transections of maize and other grasses. *Plant Methods* 11, 26. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0070-x>
- Legland, D., El-Hage, F., Méchin, V., Reymond, M., 2017. Histological quantification of maize stem sections from FASGA-stained images. *Plant Methods* 13, 84. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0225-z>
- Mazaheri, M., Heckwolf, M., Vaillancourt, B., Gage, J.L., Burdo, B., Heckwolf, S., Barry, K., Lipzen, A., Ribeiro, C.B., Kono, T.J.Y., Kaeppler, H.F., Spalding, E.P., Hirsch, C.N., Robin Buell, C., de Leon, N., Kaeppler, S.M., 2019. Genome-wide association analysis of stalk biomass and anatomical traits in maize. *BMC Plant Biology* 19, 45. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1653-x>
- Méchin, V., 2000. Etude de facteurs biochimiques et génétiques explicatifs de la variabilité pour la valeur alimentaire du maïs fourrage. INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON, INRA - Lusignan.

- Méchin, V., Argillier, O., Hébert, Y., Guingo, E., Moreau, L., Charcosset, A., Barrière, Y., 2001. Genetic Analysis and QTL Mapping of Cell Wall Digestibility and Lignification in Silage Maize. *Crop Science* 41, 690–697. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.413690x>
- Méchin, V., Argillier, O., Menanteau, V., Barrière, Y., Mila, I., Pollet, B., Lapiere, C., 2000. Relationship of cell wall composition to in vitro cell wall digestibility of maize inbred line stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 574–580. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200004\)80:5<574::AID-JSFA575>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<574::AID-JSFA575>3.0.CO;2-R)
- RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Sauvant, D., Noziere, P., 2013a. La quantification des principaux phénomènes digestifs chez les ruminants : les relations utilisées pour rénover les systèmes d'unités d'alimentation énergétique et protéique. *INRA Prod. Anim.* 26, 327–346.
- Sauvant, D., Noziere, P., 2013b. The quantification of the main digestive processes in ruminants: The equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Productions Animales* 26, 327–346. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002670>
- Truntzler, M., Barrière, Y., Sawkins, M.C., Lespinasse, D., Betran, J., Charcosset, A., Moreau, L., 2010. Meta-analysis of QTL involved in silage quality of maize and comparison with the position of candidate genes. *Theor Appl Genet* 121, 1465–1482. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1402-x>
- Virlovet, L., El Hage, F., Griveau, Y., Jacquemot, M.-P., Gineau, E., Baldy, A., Legay, S., Horlow, C., Combes, V., Bauland, C., Palafre, C., Falque, M., Moreau, L., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2019. Water Deficit-Responsive QTLs for Cell Wall Degradability and Composition in Maize at Silage Stage. *Front. Plant Sci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00488>
- Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., Zemla, J., Freidank, M., Cai, J., Protivinsky, T., 2021. Visualization of a Correlation Matrix.
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Lin Pedersen, T., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., 2020. Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics.
- Wilson, J.R., Mertens, D.R., Hatfield, R.D., 1993. Isolates of cell types from sorghum stems: Digestion, cell wall and anatomical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63, 407–417. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740630406>
- Zhang, Y., Ma, L., Wang, J., Wang, X., Guo, X., Du, J., 2020. Phenotyping analysis of maize stem using micro-computed tomography at the elongation and tasseling stages. *Plant Methods* 16, 2. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0549-y>
- Zhang, Y., Wang, J., Du, J., Zhao, Y., Lu, X., Wen, W., Gu, S., Fan, J., Wang, C., Wu, S., Wang, Y., Liao, S., Zhao, C., Guo, X., 2021. Dissecting the phenotypic components and genetic architecture of maize stem vascular bundles using high-throughput phenotypic analysis. *Plant Biotechnology Journal* 19, 35–50. <https://doi.org/10.1111/pbi.13437>
- Zheng, Y., Hou, P., Zhu, L., Song, W., Liu, H., Huang, Y., Wang, H., Guo, J., 2021. Genome-Wide Association Study of Vascular Bundle-Related Traits in Maize Stalk. *Front Plant Sci* 12, 699486. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699486>



# Chapitre 5 : Discussion Générale

## I. Développement d'outils de phénotypage de très haut débit.

Pour répondre à la question principale de ma thèse qui est « Quels sont les caractères biochimiques et histologiques impliqués dans l'explication des variations de la digestibilité chez le maïs ensilage », j'ai développé deux outils. Le premier outil est un protocole de digestibilité *in vitro* permettant de diminuer les volumes de matière sèche à analyser, facilitant son déploiement au laboratoire et permettant d'augmenter le débit d'analyse. Le deuxième outil est un workflow de segmentation d'images de coupes transversales d'entre-nœuds de maïs colorées au FASGA. Ce workflow ne nécessite pas de paramétrisation pour chaque image augmentant ainsi le débit d'analyse et permettant une très bonne reproductibilité pour chaque image et une comparaison directe de la segmentation entre plusieurs images. Ces questions autour du débit des analyses sont discutées dans ce qui suit.

### A. Augmenter le débit des analyses biochimiques sans compromettre la qualité des résultats.

Lors de la conception du protocole de digestibilité, nous avons réduit la masse de poudre à 30 mg. Puis nous nous sommes intéressés aux effets que pouvait avoir chaque étape du protocole sur la digestibilité. Nous avons identifié que l'étape de gélatinisation est cruciale pour reproduire les valeurs de digestibilité *in vitro* de la matière sèche selon le protocole Aufrère et al., (2007). La gélatinisation est une étape essentielle du protocole de digestibilité puisqu'elle permet une meilleure accessibilité aux molécules d'amidon pour leur hydrolyse ultérieure. Pour améliorer les rendements d'analyse et diminuer la pénibilité du protocole, le point que nous avons modifié est relatif à l'étape de filtration/rinçage sur creusets. Nous avons décidé de remplacer cette étape par une neutralisation afin de pouvoir directement ajouter ensuite la solution cellulasique sans manipulation supplémentaire. Ce protocole est très satisfaisant, car il nous permet d'obtenir la digestibilité de la matière sèche de 200 échantillons par semaine tout en restant fidèle aux valeurs produites avec le protocole Aufrère original.

L'utilisation de l'incubateur Daisy (Ankom) permet d'atteindre des débits très similaires. Cela impose bien entendu d'investir dans ce matériel mais demande aussi de travailler avec des prises d'échantillons toujours importantes (250-500mg de MS), d'utiliser de très importants volumes de solution, de procéder à des étapes de rinçages et peut aussi soulever la question des coûts des sachets en plus des questions de pertes des particules non digestibles de petite taille ainsi que de stabilité des tailles de pores des sachets souvent relevée dans la littérature. Ainsi, le protocole haut débit que j'ai développé garantit non seulement la qualité des résultats mais permet aussi une facilité d'utilisation dans n'importe quel laboratoire.

Pour adapter notre protocole, nous nous sommes servi de valeurs de digestibilité *in vitro* de référence mise au point à partir du protocole d'Aufrère, (1982). Jusqu'à aujourd'hui, ce dernier fait référence dans le domaine de la digestibilité animale et il reste utilisé pour évaluer l'UFL via l'équation M4.2 (Peyrat et al., 2016). Il est à noter que dans le contexte actuel de la sélection d'hybrides ensilage chaque augmentation de digestibilité (aussi minime soit-elle) est valorisable. Comme nous l'avons vu au cours du chapitre 1, tous les protocoles de digestibilité ne se valent pas, et le classement des génotypes selon leur digestibilité estimée peut être complètement différent d'un protocole à l'autre. Il serait intéressant d'étudier à nouveau la corrélation entre la digestibilité *in vitro* ainsi estimée et la digestibilité *in vivo*. Cela permettrait de s'assurer que les variations de digestibilité mises en avant avec le protocole *in vitro* développé rendent effectivement compte de variations de digestibilité *in vivo*. Cette expérimentation serait lourde à mener (moyens financiers, infrastructure, moyens humains, horaires) puisqu'elle nécessite de tester des grandes quantités d'ensilage issues de différents hybrides sur des animaux en cage (Andrieu et al., 1999; Iantcheva et al., 1999) voire sur des vaches laitières. Il n'en reste pas moins vrai que cette corrélation entre *in vitro* et *in vivo* a été estimée auparavant, sur une gamme de variation très large qui a toujours comme biais d'augmenter artificiellement les  $R^2$  (Aufrère et al., 2007). Pour rendre la sélection d'hybrides de maïs ensilage plus efficace, la question de proposer des protocoles plus fidèles à la digestibilité *in vivo* reste posée.

Vous avez remarqué que mon travail de thèse ne fait jamais recours à des analyses avec des valeurs prédites grâce à des équations NIRS. Il est vrai que l'utilisation de cette technologie permet d'augmenter considérablement le débit d'analyse avec l'obtention d'un très grand nombre de caractères prédits par échantillon en peu de temps. Ainsi, des prédictions NIRS auraient pu être acquises, d'autant plus que des équations de prédiction pour la digestibilité de la matière sèche du maïs ensilage (et d'autres caractères pariétaux) existent (Dardenne et al., 1993), et sont couramment utilisées dans le domaine de la sélection. En revanche, les

corrélations entre les valeurs prédites par NIRS pour différents caractères sont parfois surestimées par rapport à celles entre les valeurs issues de la biochimie humide. Cette surestimation des corrélations entre les caractères prédits nous aurait conduit à une identification erronée de cibles biochimiques corrélées avec la digestibilité. Nous avons donc fait le choix au cours de ma thèse de privilégier les analyses avec des valeurs biochimiques de qualité sur 2 blocs plutôt qu'avec des valeurs prédites sur l'ensemble des blocs récoltés dans le cadre des essais DECLIC.

Il n'en reste pas moins vrai qu'au cours de ma thèse, j'ai eu la curiosité de regarder ce que la NIRS prédisait sur les poudres des deux blocs analysés en biochimie humide. Effectivement, les valeurs prédites (équations de prédiction de Gembloux) ne répondaient pas à mes exigences, avec des corrélations entre valeurs prédites par NIRS et valeurs quantifiées en biochimie de l'ordre de  $R^2 = 0.6$ .

Par ailleurs, les données biochimiques acquises sur plusieurs hybrides cultivés dans 2 blocs représentent un socle pour l'établissement de nouvelles équations NIRS (156 échantillons). Ces données permettent de proposer des nouvelles équations NIRS dédiées aux hybrides ensilages modernes et pour des caractères pas encore prédits par NIRS sur ce type de matériel (teneurs en acides p-hydroxycinnamiques et structure  $\beta O_4$  de la lignine). Yves Griveau, ingénieur NIRS au sein de notre équipe, a donc établi des équations NIRS pour l'ensemble des caractérisations biochimiques réalisées au cours de ma thèse. Ces équations jeunes réussissent à prédire ces caractères biochimiques aussi bien que les équations de Gembloux (voire mieux parfois) mais n'atteignent toujours pas un niveau de prédiction assez satisfaisant pour répondre à toutes mes questions de thèse.

Il serait intéressant de proposer des alternatives aux approches de construction d'équations NIRS d'un point de vue mathématique pour essayer de mettre aux points des modèles plus fiables (modèles non linéaires : (Yu et al., 2018), (von Cossel et al., 2018)) ou même de changer radicalement d'approche en utilisant par exemple du « machine learning » ou du réseau de neurones (Liu et al., 2021). Récemment j'ai appris qu'il est possible de faire de la prédiction à partir de méthode fractale, utilisée dans d'autres domaines pour prédire l'usure de matériaux (Zhou et al., 1993), ou dans la reconnaissance de tissus cancéreux prostatique (Pu et al., 2012). Il pourrait être intéressant d'essayer d'appliquer leurs méthodes en les adaptant au maïs. Les questions autour de l'utilisation et de l'amélioration de prédictions NIRS n'ont cessé d'être posées et ouvertes au cours de ma thèse et j'ai eu l'opportunité de les soumettre à des mathématiciens, statisticiens et des informaticiens. Ces discussions fort intéressantes sont restées sans réponse conclusive.



## **B. Augmenter le débit des analyses histologiques en augmentant la qualité des résultats.**

L'outil de segmentation d'image que j'ai proposé au cours de ma thèse permet de segmenter la coupe en 44 types de tissus. Cette segmentation repose sur les caractéristiques H, S et V de chaque pixel de l'image ainsi que sur le positionnement des pixels au sein de la coupe. Dans mon travail de thèse, j'ai principalement utilisé les informations relatives aux surfaces des 44 tissus segmentés. Les informations fournies par le workflow que j'ai créé sont certainement sous-exploitées. En effet 416 colonnes de caractérisations de l'ensemble de l'image d'une coupe sont extraites de chaque image. Certaines restent encore à utiliser. Au-delà de segmenter les tissus d'une coupe de maïs colorée au FASGA, le workflow que j'ai développé extrait également les valeurs de H, S et V de chaque tissu segmenté. Nous pourrions essayer d'élaborer, comme proposé par El Hage et al., (2018), des variables composites en combinant surface et intensité de coloration pour rendre compte de façon plus exhaustive encore des variations histologiques entre les coupes. El Hage et al., (2018) ont montré que l'augmentation de la digestibilité pariétale au sein d'un entrenœud engendrée par un stress hydrique était accompagnée d'une augmentation de « blue\_parenchyma » qui est l'intensité de bleu par unité de surface de parenchyme peu lignifié. Nous avons pu mettre du sens biochimique entre les caractéristiques H, S et V de certains tissus de la moelle et leur faculté à se digérer plus ou moins facilement. En effet, les digestions sur coupes ont révélé que les parois cellulaires de type TM2b et TM5b sont plus digestibles que les autres types du parenchyme médullaire. Les différences de digestibilités de paroi en fonction des tissus avaient déjà été observées par Boon et al., (2008) au niveau de l'écorce et par Jung and Casler (2006) au niveau de la moelle. L'ensemble de l'expérimentation, de la coupe de tige à l'acquisitions des résultats, est un travail long et minutieux mais il permet tout de même d'obtenir les résultats d'une centaine d'échantillons par une semaine. Pour améliorer les rendements, nous pourrions essayer de prédire les différentes surfaces de chaque type tissulaire à l'aide de spectres NIRS acquis sur plante entière et en établissant des équations de prédictions. L'ensemble des données pour tester la pertinence de l'approche NIRS dans la prédiction de paramètres histologiques ont été acquises (spectres NIRS et quantifications histologiques). Je reste peu convaincu que cela fournisse des prédictions fiables pour l'ensemble des types tissulaires et là encore, des approches de « machine learning » ou de prédiction fractale peuvent être envisagées (sur des spectres et/ou sur des images de coupes). A l'inverse, il est envisageable de penser qu'il est

possible à partir d'une coupe histologique de déterminer ou prédire les teneurs des paramètres biochimiques. Il serait envisageable de faire de la prédiction à partir des spectre HSV brut ou projeté dans les 3 dimensions. Il pourrait être aussi envisagé de faire de la prédiction directement sur les images en adaptant des méthodes fractales.

## II. Les différentes estimations de la digestibilité et les variations de composition entre les types tissulaires.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la digestibilité de la matière sèche et de la paroi. Dans mes chapitres 3 et 4, j'ai montré que la digestibilité de la matière sèche (IVDMD) pouvait être expliquée par deux paramètres, la digestibilité de la paroi (IVCWRDm) et la teneur en paroi (CWR). Ces paramètres expliquent environ 50 à 70 % (en fonction du jeu de donnée) de la variation de la digestibilité de la matière sèche pour les hybrides et 70 % de la variation de la digestibilité de la matière sèche chez les RILs.

A partir de ces deux paramètres, IVCWRDm et CWR, sont calculés deux autres paramètres : la teneur en paroi non digestible (CWRnd) et la teneur en paroi digestible (CWRd). La teneur en paroi digestible ne permet pas d'expliquer la digestibilité de la matière sèche chez les hybrides comme chez les lignées, alors que la teneur en paroi non digestible explique dans toutes les circonstances les variations de digestibilité de matière sèche aussi bien que la variation de la digestibilité de paroi et de la teneur en paroi. La digestibilité de matière sèche est limitée par la teneur en paroi non digestible, corroborant les résultats déjà publiés (Dardenne et al., 1993; Sauvant and Noziere, 2013a, 2013b; Peyrat, 2014). La teneur en paroi non digestible est corrélée positivement à la teneur en paroi et négativement à la digestibilité de la paroi. Par ailleurs, la teneur en lignine est le principal régresseur expliquant la variabilité de CWRnd et de IVCWRDm, comme montré par Zhang et al., (2011) et aussi Argillier et al., (1998), Méchin et al., (2005), Riboulet et al., (2008), El Hage et al., (2018). Ces résultats ont été confirmés en utilisant les lignées mutantes *bm* pour étudier l'impact de la réduction de la lignification et l'amélioration digestibilité (Cherney et al., 1991; Machinet et al., 2011; Halpin, 2019). Néanmoins, la teneur en lignine ne peut être réduite en dessous d'un certain seuil car elle est essentielle dans le maintien et la protection de la plante (Wang et al., 2019). D'ailleurs, nous avons constaté que les hybrides modernes sélectionnés par les différentes entreprises semencières fournis dans le cadre de ce projet affichent déjà des variations de teneur en lignine

dans une gamme réduite qui a du être retenue de façon empirique pour maximiser rendement et digestibilité. Améliorer la digestibilité de la matière sèche revient donc à diminuer la teneur en paroi non digestible en améliorant la digestibilité de paroi et par conséquent sans réduire la teneur en lignine pour ne pas impacter les caractéristiques agronomiques des plantes. Pour cela, nous étudions la répartition de la lignification ou possiblement d'autre molécules au sein de la coupe.

Au niveau histologique, nous avons vu que lors d'une digestion enzymatique sur coupe, ce sont les tissus colorés en bleu au FASGA de types TM2b et TM5b qui sont digérés plus facilement que ceux de types TM2a et TM5a. Les tissus de types TM2a et TM5a deviennent digestibles après un traitement à la solution NaOH 0.1M. Le traitement NaOH est doux et permet de rompre uniquement des liaisons esters et de libérer les acides férulique et *p*-coumarique liés aux arabinoses ou aux sous-unité S de la lignine (Morrison et al., 1994; Culhaoglu et al., 2011). Cela suggérerait qu'il y a possiblement une incorporation d'acide *p*-coumarique et/ou férulique au niveau des tissus bleu TM2a et TM5a qui limiterait leurs digestibilités. L'encombrement provoqué par une forte *p*-coumaroylation des lignines pourrait limiter l'accès aux sucres pour les enzymes comme discuté dans Zhang et al. (2011). La rupture des liaisons esters des acides féruliques pourrait libérer d'une part le maillage diférulique entre chaînes d'hémicelluloses, libérant ainsi les chaînes liées entre elles, et d'autre part rompre le pont hémicelluloses-lignines, libérant ainsi les hémicelluloses de leur armure lignifiée. Des différences biochimiques entre différents types tissulaires ont déjà été reportées, notamment avec des différences de teneurs en acide *p*-coumarique entre l'écorce et la moelle (Lopez et al., 1993; Morrison et al., 1998; Barros-Rios et al., 2012). Il serait possible de vérifier cette hypothèse en utilisant des anticorps anti-*p*-coumarique pour révéler leurs localisations (Tranquet et al., 2009). Il serait aussi intéressant de comparer l'accessibilité des sucres par imagerie MALDI sans et avec prétraitement NaOH (10ml de 0.1N 60 minutes) pour visualiser les différences notables entre les tissus TM2, TM5 de types « a » et « b » (Arnaud et al., 2020). Il serait possible d'effectuer de la microdissection laser pour extraire les tissus spécifiques de la moelle et ainsi estimer directement les teneurs en acide *p*-coumarique et lignine. Néanmoins cela semble très compliqué au niveau des dimensions et du temps impliqué. Il existe des alternatives pour séparer des tissus comme le fractionnement en voie sèche (Mayer-Laigle et al., 2021). Des tests sur poudre sont en cours dans l'équipe, afin de visualiser l'impact d'un traitement NaOH sur les teneurs en acide *p*-coumarique, acide férulique et en lignine. Réduire la teneur en acide *p*-coumarique ou répartir préférentiellement l'acide *p*-coumarique dans des tissus lignifiés pourrait avoir comme effet d'augmenter la teneur en paroi digestible, par conséquence la



digestibilité de la paroi et augmenter la surface de tissus digestibles de types TM2b et TM5b sans impacter la teneur en paroi ni la teneur en lignine.

Pour aller plus loin, car nous avons montré sur une coupe colorée que la paroi digestible est située dans une zone colorée en bleu de type TM2b et TM5b et la paroi non digestible dans une zone colorée en rouge, nous pourrions associer la teneur en paroi digestible aux types de tissus TM2b et TM5b et la paroi non digestible aux tissus rouges du parenchyme médullaire. Dans ce contexte, bien que la teneur en paroi digestible sur la série d'hybrides étudiés dans le cadre de ma thèse ne soit pas ressortie comme impliquée dans les variations d'IVDMD, nous demandons si cette variable a été contre-sélectionnée en choisissant l'UFL et le rendement comme cibles de sélection. Cette variable ne semble donc pas être une cible d'intérêt pour augmenter l'UFL. Néanmoins, je pense tout de même que cette teneur en paroi digestible (CWRd) mérite attention : on peut se poser la question de l'impact d'une augmentation de la CWRd, tout en conservant le minimum requis de paroi non digestible (CWRnd) pour maintenir les caractéristiques agronomiques atteintes par les hybrides ensilages modernes. Cela aurait pour conséquence d'augmenter les rendements de matière sèche en augmentant la teneur en paroi dans la plante conjointement avec la digestibilité de cette paroi.

### **III. Les cibles histologiques et biochimiques impliquées dans la variation de la digestibilité chez les hybrides et les lignées recombinantes étudiés.**

Les résultats de ma thèse montrent sans équivoque que les paramètres biochimiques et histologiques permettent de rendre compte des variations de digestibilité observées. Les paramètres identifiés sont partiellement identiques entre les hybrides et les RILs et ne sont pas impliqués avec la même importance. Néanmoins, certains de ces paramètres biochimiques et histologiques sont retrouvés quel que soit le panel étudié.

Au niveau biochimique, les cibles retrouvées sont la teneur en lignine, le rendement en liaisons  $\beta O4$  et la teneur en acide *p*-coumarique estérifié. Chez les hybrides, la gamme de variation de teneur en lignine est assez restreinte alors qu'au sein des RILs, elle est plus élevée. De façon assez remarquable, quelle que soit sa gamme de variabilité, la teneur en lignine reste toujours la première cible identifiée (premier régresseur recruté par les modèles). Sur 8 RILs (issues du croisement F286xF2012) sélectionnées pour avoir une faible gamme de variation de

teneur en lignine klason (2.8 %CWR), Zhang et al., (2011) ont également montré que la teneur en lignine reste quand même la première cible biochimique pour expliquer les variations de digestibilité pariétale. Chez les hybrides, le rendement en liaisons  $\beta$ O4 est la deuxième cible en lien avec les variations de la digestibilité pariétale. Les analyses de thioacidolyse sont en cours pour les RILs et nous saurons si elle garde cette place de deuxième cible chez les lignées recombinantes. Ce rendement en liaisons  $\beta$ O4 est corrélé négativement à la digestibilité de la paroi et, comme discuté dans le chapitre 3 de la thèse, le rendement en liaisons  $\beta$ O4 rend compte d'une plus forte linéarité du polymère de lignine et donc d'un étalement ou encombrement de la lignification (Besombes and Mazeau, 2005) sur le réseau polysaccharidique. Selon ces auteurs, une lignine qui présente plus de liaisons  $\beta$ O4 s'étalerait de façon plus linéaire sur le polymère de cellulose, réduisant ainsi l'accessibilité des enzymes à la cellulose. Encore une fois, Zhang et al., (2011) ont également identifié cette teneur en  $\beta$ O4 comme facteur de réduction de la digestibilité pariétale.

Sur l'ensemble des échantillons hybrides analysés en biochimie humide provenant de deux blocs, la teneur en acide *p*-coumarique n'a pas été identifiée comme cible pour comprendre la variation de la digestibilité de la paroi observée. En revanche, si l'on considère uniquement les échantillons récoltés à Hédé en 2018, cette teneur en acide *p*-coumarique sort en tant que premier régresseur. A y regarder de plus près, les coupes histologiques récoltées sur le bloc de Hédé en 2018, présentent, dans la majorité des cas, plus de tissus TM2a et TM5a (Figure 10, chapitre 3). Comme discuté précédemment, ces tissus pourraient être en lien avec la teneur en acide *p*-coumarique et un traitement NaOH de la coupe améliore la digestibilité de ces tissus (chapitre 2). Ceci suggère que les variations des conditions environnementales pourraient partiellement agir sur la teneur et la répartition en acide *p*-coumarique (dans les tissus TM2a et TM5a) pour engendrer des modifications de digestibilité de la paroi. Il a été montré par El Hage et al., (2018), sur des lignées cultivées en condition irriguée ou de stress hydrique, une augmentation de surface de tissus bleus lorsque les lignées sont cultivées en condition de stress hydrique. Le lien entre la répartition tissulaire ou la lignification et la digestibilité pariétale a aussi été constaté au cours du développement des plantes de maïs (Zhang et al., 2011). Ce travail reporte que la fin de période de lignification de la tige a lieu entre la floraison et le stade ensilage principalement dans l'écorce. Ces auteurs pointent une accumulation dans l'écorce d'une lignine riche en liaisons  $\beta$ O4 et en acide *p*-coumarique. Au sein de la population de RILs, l'acide *p*-coumarique a un rôle plus important et il sort comme second régresseur après la teneur en lignine. Comme nous l'avons mentionné à plusieurs reprises, les conditions de culture 2020 à Versailles sont d'ailleurs des conditions de stress hydrique important. La

teneur en acide *p*-coumarique permet d'expliquer 30% de la variation de digestibilité de la paroi chez les RILs. La teneur en acide *p*-coumarique est plus corrélée à la teneur en paroi digestible (CWRd) qu'à la teneur en paroi non digestible (CWRnd) ( $r = 0.34$  et  $0.03$  respectivement). Depuis les années 2000, un bon nombre d'articles notent l'impact important de l'acide *p*-coumarique sur la digestibilité de la matière sèche ou de la paroi (Méchin et al., 2005; Taboada et al., 2010; Zhang et al., 2011; El Hage et al., 2018).

Au niveau histologique, les cibles identifiées pour améliorer la digestibilité de paroi sont TM2b et TM5b dans le panel d'hybrides. Pour la population F4xF7, les corrélations entre la digestibilité de paroi et l'histologie sont faibles. Les gammes de variation des teneurs en lignine et en acide *p*-coumarique étant importantes, elles impactent fortement la digestibilité pariétale et laissent peu de place pour que l'histologie soit impliquée dans les variations de la digestibilité pariétale. Cependant, en groupant les RILs en fonction de leur histotype, nous avons mis en évidence que des RILs au parenchyme non lignifié (avec beaucoup de TM2b et de TM5b) ont des digestibilités pariétales très légèrement supérieures à celles présentant des parenchymes lignifiés. Cependant, il reste néanmoins une large gamme de variation de la digestibilité pariétale au sein de chaque groupe et une RIL au parenchyme bleu peut rester moins digestible qu'une RIL au parenchyme rouge. Cela suggère qu'il y a sûrement de nombreux caractères à combiner pour proposer des génotypes bien digestibles. D'ailleurs dans le panel hybrides, moins contrasté au niveau de leurs teneurs en lignine, le tissu TM5b du profil histologique permet d'expliquer 22 % de la digestibilité de la paroi sur l'ensemble des deux années analysées. C'est un pourcentage d'explication équivalent à celui de la teneur en lignine. Dans ce cas-là, la répartition de la lignine a un impact équivalent à celui de la teneur en lignine sur la digestibilité pariétale. C'est d'autant plus remarquable, qu'il n'y a pas de corrélation entre ces deux caractères. C'est bien la preuve que la répartition de la lignification apporte des informations supplémentaires à celles apportées par la teneur en lignine. Il est possible que le rôle de la répartition de la lignification soit plus important que sa teneur dans un contexte d'hybrides à haut potentiel de rendement, puisque la teneur en lignine est contrainte et ne peut être réduite pour conserver des bonnes aptitudes agronomiques (verse, attaque de ravageurs, etc...).

Ainsi, nous proposons pour les hybrides un modèle simple pour expliquer la variation de la digestibilité pariétale avec la teneur en lignine et le pourcentage en surface de tissu bleu TM2b dans la coupe. Ce modèle à deux paramètres peut expliquer jusqu'à 44 % de la variation de digestibilité de paroi chez les hybrides étudiés (Chapitre 3, Figure 21). Pour valider ce modèle, il a été convenu de caractériser la teneur en lignine et le pourcentage de parenchyme

bleu (TM2b) chez 6 hybrides (sélectionnés pour représenter une gamme de digestibilité ; ce sont les hybrides qui ont été sélectionnés pour la mise au point du protocole d'IVDMD présenté dans le chapitre 1) cultivés dans l'ensemble des 6 lieux du dispositif expérimental DECLIC 2018 et 2019 ainsi qu'à Versailles et en conditions irriguée et de stress fort à Mauguio (34, France). Ce travail est en cours et sera éventuellement terminé par mes collègues de l'équipe Qualibiosec. Il sera ainsi envisageable d'étudier la robustesse du modèle en condition de stress hydrique ou dans d'autres environnements.

## IV. Déterminisme génétique des cibles d'amélioration de la digestibilité

Au niveau génétique, les plus gros QTLs trouvés pour la digestibilité de la paroi ou de la matière sèche colocalisent avec la teneur en paroi non digestible, la teneur en paroi digestible, la teneur en lignine et la teneur en acide *p*-coumarique. Certaines de ces colocalisations se situent dans des régions déjà identifiées dans d'autres analyses QTL. C'est le cas du QTL situé au chromosome 5 entre [103.29-116.04] cM pour la digestibilité de paroi, la digestibilité de matière sèche, et la teneur en acide *p*-coumarique qui a déjà été mentionné par Truntzler et al., (2010); Virlovet et al., (2019); El Hage et al., (2021) ou encore celui sur le chromosome 9 entre [33.09-40.92] cM pour les digestibilités mentionnées par Truntzler et al., (2010).

Malgré les faibles corrélations entre les caractères histologiques et biochimiques dans la population de RILs, nous retrouvons des co-localisation de QTLs sur les chromosomes 1, 4, 5 et 7 pour les différentes digestibilités et pour les pourcentages de tissus de la moelle. De plus, sur le chromosome 10, il y a une colocalisation des QTLs des surface de tissus rouges et bleus de la moelle avec la teneur en acide *p*-coumarique. Cette position pourrait être un bon candidat pour moduler la répartition de la teneur en acide *p*-coumarique à l'échelle tissulaire.

Au niveau histologique, il y a trois localisations (sur le chromosome 5 à 38 et 173 cM et sur le chromosome 7 à 120 cM) pour expliquer la répartition de rouge et de bleu au sein de la coupe. Nous avons obtenu des LOD élevés à ces trois régions 5, 8 et 3.2, respectivement. Des relations épistatiques entre ces QTL ont été mises en évidence pour rendre compte de la répartition des tissus lignifiés et non lignifiés au sein de la moelle. Notamment, la nature des allèles au locus situé en bas du chromosome 5 semble impacter fortement l'effet des deux autres QTLs. De façon totalement subjective, mon choix d'un gène candidat pour endosser ce rôle se tournerait vers un facteur de transcription (Casto et al., 2018). Nous pourrions imaginer qu'il est tissu spécifique et/ou qu'il est inductible par stress hydrique. Par ailleurs, le QTL au

chromosome 7 se situe dans une région dans laquelle nous avons repéré une inversion lors de la construction de la carte. Dès lors, si cette inversion n'est pas présente chez les deux lignées parentales, elle pourrait engendrer également des variations de régulation de gènes impliqués dans la répartition des tissus bleus et rouges dans la moelle.

Pour aller plus loin dans l'étude de ces QTLs, il faudrait confirmer leur présence. Pour cela, une deuxième année de culture des RILs a été menée pendant l'été 2021 sur le domaine expérimental de l'INRAE de Versailles. L'été 2021 a été plus propice à la croissance des plantes de cette population. Il est donc important de mesurer à quel point les QTLs cartographiés sont stables. Le fait que F4 se retrouve avec un parenchyme bleu dans toutes les conditions environnementales testées depuis les travaux de Méchin (2000), nous réconforte dans l'idée que ces QTLs de pourcentage de parenchyme lignifié seront stables. Une fois ces QTLs validés, il sera alors temps de rechercher des gènes candidats sous chacun de ces QTLs. L'étude des polymorphismes de séquence entre F4 et F7 sera facilitée avec la disponibilité de la séquence complète du génome de F7 (<https://maizegdb.org/genome/assembly/Zm-F7-REFERENCE-TUM-1.0>). Parmi les gènes candidats, le mutant Eskimo est, à ce jour, le seul maïs (avec F4) capable d'avoir un parenchyme médullaire complètement bleu. Chez le maïs, le phénotype du mutant eskimo est obtenu par la mutation du gène eskimo (une xylan O -acetyltransferase) sur le chromosome 1 (Horlow et al., 2020). Néanmoins, la position de ce gène ne correspond pas à l'un de nos QTLs. De plus, la coloration d'eskimo n'est pas équivalente à celle de F4. Néanmoins nous pourrions nous intéresser à la famille de gènes d'eskimo pour savoir si l'un d'eux se localise sous l'un des QTLs. La particularité de la lignée F4, avec son parenchyme coloré en bleu au FASGA peut aussi faire émerger de nombreuses questions de recherche : Est-ce que ce phénotype est vraiment unique à la lignée F4 ? Pour répondre à cette question, le criblage de nombreuses lignées aux origines diverses ou à celles provenant en particulier de la population « Etoile de Normandie » serait envisageable. Est-ce que les haplotypes portés par F4 à ces QTLs sont partagés par d'autres lignées et est-ce qu'ils confèrent aussi la particularité d'avoir un parenchyme non lignifié ? Les travaux de Gouesnard et al., (2017) montrent une très forte structuration des lignées cornées de maïs et il serait envisageable, avec le workflow que j'ai mis au point de phénotyper l'ensemble des lignées génotypées dans cette étude. Et puis, au-delà du maïs, cette variation de lignification du parenchyme est également observée chez le sorgho (Perrier et al., 2017; Thomas et al., 2021). Dès lors, on peut se poser la question de savoir si des mécanismes communs à différentes espèces de graminées sont impliqués dans la lignification du parenchyme.

## Références Chapitre 5

- Andrieu, J., Barrière, Y., Demarquilly, C., 1999. Digestibilité et valeur énergétique des ensilages de maïs : le point sur les méthodes de prévision au laboratoire. *INRA Prod. Anim* 12, 391–396.
- Argillier, O., Barrière, Y., Dardenne, P., Emile, J.C., Hébert, Y., 1998. Genotypic variation for in vitro criteria and relationships with in vivo digestibility in forage maize hybrids. *Plant Breeding* 117, 437–441. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1998.tb01969.x>
- Arnaud, B., Durand, S., Fanuel, M., Guillon, F., Méchin, V., Rogniaux, H., 2020. Imaging Study by Mass Spectrometry of the Spatial Variation of Cellulose and Hemicellulose Structures in Corn Stalks. *J. Agric. Food Chem.* 68, 4042–4050. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07579>
- Aufrère, J., 1982. Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Ann. Zootech.* 31, 111–130. <https://doi.org/10.1051/animres:19820202>
- Aufrère, J., Baumont, R., Delaby, L., Peccatte, J.R., Andrieu, J., Andrieu, J.P., Dulphy, J.P., 2007. Prévision de la digestibilité des fourrages par la méthode pepsine-cellulase. Le point sur les équations proposées. *INRAE Productions Animales* 20, 129–136. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2007.20.2.3445>
- Barros-Rios, J., Santiago, R., Malvar, R.A., Jung, H.-J.G., 2012. Chemical composition and cell wall polysaccharide degradability of pith and rind tissues from mature maize internodes. *Animal Feed Science and Technology* 172, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.01.005>
- Besombes, S., Mazeau, K., 2005. The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 1: adsorption of a threo guaiacyl beta-O-4 dimer onto a Ibeta cellulose whisker. *Plant Physiol Biochem* 43, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.02.005>
- Boon, E.J.M.C., Struik, P.C., Tamminga, S., Engels, F.M., Cone, J.W., 2008. Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L.) cultivars varying in whole plant digestibility. III. Intra-stem variability in anatomy, chemical composition and in vitro rumen fermentation. *NJAS: Wageningen Journal of Life Sciences* 56, 101–122. [https://doi.org/10.1016/S1573-5214\(08\)80019-X](https://doi.org/10.1016/S1573-5214(08)80019-X)
- Casto, A.L., McKinley, B.A., Yu, K.M.J., Rooney, W.L., Mullet, J.E., 2018. Sorghum stem aerenchyma formation is regulated by SbNAC\_D during internode development. *Plant Direct* 2, e00085. <https://doi.org/10.1002/pld3.85>
- Cherney, J.H., Cherney, D.J.R., Akin, D.E., Axtell, J.D., 1991. Potential of Brown-Midrib, Low-Lignin Mutants for Improving Forage Quality, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 157–198. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60580-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60580-5)
- Culhaoglu, T., Zheng, D., Méchin, V., Baumberger, S., 2011. Adaptation of the Carrez procedure for the purification of ferulic and p-coumaric acids released from lignocellulosic biomass prior to LC/MS analysis. *Journal of Chromatography B* 879, 3017–3022. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.08.039>
- Dardenne, P., Andrieu, J., Barrière, Y., Biston, R., Demarquilly, C., Femenias, N., Lila, M., Maupetit, P., Rivière, F., Ronsin, T., 1993. Composition and nutritive value of whole maize plants fed fresh to sheep. II. Prediction of the in vivo organic matter digestibility. *Annales de zootechnie* 42, 251–270. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00888946>



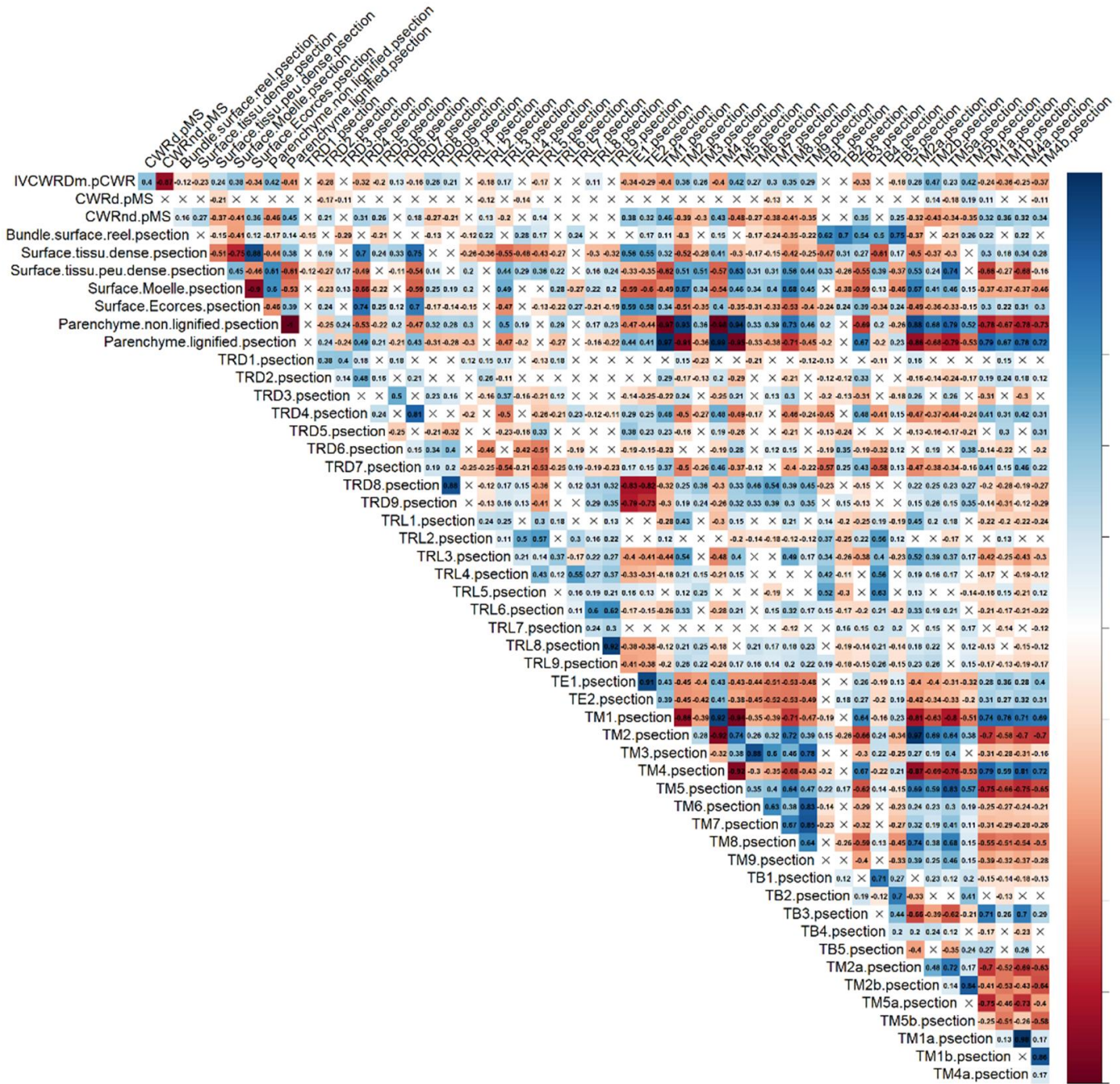
- El Hage, F., Legland, D., Borrega, N., Jacquemot, M.-P., Griveau, Y., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2018. Tissue Lignification, Cell Wall p-Coumaroylation and Degradability of Maize Stems Depend on Water Status. *J. Agric. Food Chem.* 66, 4800–4808. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05755>
- El Hage, F., Virlouvet, L., Lopez-Marnet, P.-L., Griveau, Y., Jacquemot, M.-P., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2021. Responses of Maize Internode to Water Deficit Are Different at the Biochemical and Histological Levels. *Front Plant Sci* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.628960>
- Gouesnard, B., Negro, S., Laffray, A., Glaubitz, J., Melchinger, A., Revilla, P., Moreno-Gonzalez, J., Madur, D., Combes, V., Tollon-Cordet, C., Laborde, J., Kermarrec, D., Bauland, C., Moreau, L., Charcosset, A., Nicolas, S., 2017. Genotyping-by-sequencing highlights original diversity patterns within a European collection of 1191 maize flint lines, as compared to the maize USDA genebank. *Theor Appl Genet* 130, 2165–2189. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2949-6>
- Halpin, C., 2019. Lignin engineering to improve saccharification and digestibility in grasses. *Current Opinion in Biotechnology, Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.013>
- Horlow, C., Durand-Tardif, M.-H., Mouille, G., Rogowsky, P., 2020. Obtaining Plants Having Improved Biomass Digestibility.
- Iantcheva, N., Steingass, H., Todorov, N., Pavlov, D., 1999. A comparison of in vitro rumen fluid and enzymatic methods to predict digestibility and energy value of grass and alfalfa hay. *Animal Feed Science and Technology* 81, 333–344. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00037-1)
- Jung, H.G., Casler, M.D., 2006. Maize Stem Tissues: Impact of Development on Cell Wall Degradability. *Crop Science* 46, 1801–1809. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.02-0086>
- Liu, J., Jin, S., Bao, C., Sun, Y., Li, W., 2021. Rapid determination of lignocellulose in corn stover based on near-infrared reflectance spectroscopy and chemometrics methods. *Bioresource Technology* 321, 124449. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124449>
- Lopez, S., Murison, S.D., Travis, A.J., Chesson, A., 1993. Degradability of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated at different developmental stages from a newly extended maize internode. *Acta Botanica Neerlandica* 42, 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1993.tb00693.x>
- Machinet, G.E., Bertrand, I., Barrière, Y., Chabbert, B., Recous, S., 2011. Impact of plant cell wall network on biodegradation in soil: Role of lignin composition and phenolic acids in roots from 16 maize genotypes. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1544–1552. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.002>
- Mayer-Laigle, C., Haurie Ibarra, L., Breyse, A., Palumbo, M., Mabile, F., Lacasta Palacio, A.M., Barron, C., 2021. Preserving the Cellular Tissue Structure of Maize Pith Though Dry Fractionation Processes: A Key Point to Use as Insulating Agro. *Materials* 14, 5350. <https://doi.org/10.3390/ma14185350>
- Méchin, V., 2000. Etude de facteurs biochimiques et génétiques explicatifs de la variabilité pour la valeur alimentaire du maïs fourrage. INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON, INRA - Lusignan.
- Méchin, V., Argillier, O., Rocher, F., Hébert, Y., Mila, I., Pollet, B., Barrière, Y., Lapiere, C., 2005. In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5872–5881. <https://doi.org/10.1021/jf050722f>
- Morrison, T.A., Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., 1998. Cell-Wall Composition of Maize Internodes of Varying Maturity. *Crop Science* 38,

- crops1998.0011183X003800020031x.  
<https://doi.org/10.2135/crops1998.0011183X003800020031x>
- Morrison, T.A., Kessler, J.R., Buxton, D.R., 1994. Maize Internode Elongation Patterns. *Crop Science* 34, crops1994.0011183X003400040040x.  
<https://doi.org/10.2135/crops1994.0011183X003400040040x>
- Perrier, L., Rouan, L., Jaffuel, S., Clément-Vidal, A., Roques, S., Soutiras, A., Baptiste, C., Bastianelli, D., Fabre, D., Dubois, C., Pot, D., Luquet, D., 2017. Plasticity of Sorghum Stem Biomass Accumulation in Response to Water Deficit: A Multiscale Analysis from Internode Tissue to Plant Level. *Front. Plant Sci.* 8.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01516>
- Peyrat, J., 2014. Digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage chez les ruminants : conséquences sur l'évaluation de sa valeur nutritive. Université Blaise Pascal: Clermont-Ferrand II, France.
- Peyrat, J., Nozière, P., Féraud, A., Le Morvan, A., Meslier, E., Protin, P.V., Carpentier, B., Baumont, R., 2016. Digestibilité du maïs fourrage : équations et critères de prédiction. ARVALIS - Institut du végétal - INRA.
- Pu, Y., Wang, W., Al-Rubaiee, M., Gayen, S.K., Xu, M., 2012. Determination of Optical Coefficients and Fractal Dimensional Parameters of Cancerous and Normal Prostate Tissues. *Appl Spectrosc* 66, 828–834. <https://doi.org/10.1366/11-06471>
- Riboulet, C., Lefèvre, B., Dénoue, D., Barrière, Y., 2008. Genetic variation in maize cell wall for lignin content, lignin structure, p-hydroxycinnamic acid content, and digestibility in set of 19 lines at silage harvest maturity. *Maydica* 53, 11–19.
- Sauvant, D., Nozière, P., 2013a. La quantification des principaux phénomènes digestifs chez les ruminants : les relations utilisées pour rénover les systèmes d'unités d'alimentation énergétique et protéique. *INRA Prod. Anim.* 26, 327–346.
- Sauvant, D., Nozière, P., 2013b. The quantification of the main digestive processes in ruminants: The equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Productions Animales* 26, 327–346.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731115002670>
- Taboada, A., Novo-Uzal, E., Flores, G., Loureda, M., Ros Barceló, A., Masa, A., Pomar, F., 2010. Digestibility of silages in relation to their hydroxycinnamic acid content and lignin composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1155–1162.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.3933>
- Thomas, H.L., Pot, D., Jaffuel, S., Verdeil, J.-L., Baptiste, C., Bonnal, L., Trouche, G., Bastianelli, D., Latrille, E., Berger, A., Calatayud, C., Chauvergne, C., Rossard, V., Jeanson, P., Alcouffe, J., Carrère, H., 2021. Mobilizing sorghum genetic diversity: Biochemical and histological-assisted design of a stem ideotype for biomethane production. *GCB Bioenergy* n/a. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12886>
- Tranquet, O., Saulnier, L., Utile, J.-P., Ralph, J., Guillon, F., 2009. Monoclonal antibodies to p-coumarate. *Phytochemistry* 70, 1366–1373.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.019>
- Truntzler, M., Barrière, Y., Sawkins, M.C., Lespinasse, D., Betran, J., Charcosset, A., Moreau, L., 2010. Meta-analysis of QTL involved in silage quality of maize and comparison with the position of candidate genes. *Theor Appl Genet* 121, 1465–1482.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-010-1402-x>
- Virlovet, L., El Hage, F., Griveau, Y., Jacquemot, M.-P., Gineau, E., Baldy, A., Legay, S., Horlow, C., Combes, V., Bauland, C., Palafre, C., Falque, M., Moreau, L., Coursol, S., Méchin, V., Reymond, M., 2019. Water Deficit-Responsive QTLs for Cell Wall Degradability and Composition in Maize at Silage Stage. *Front. Plant Sci.* 0.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00488>

- von Cossel, M., Möhring, J., Kiesel, A., Lewandowski, I., 2018. Optimization of specific methane yield prediction models for biogas crops based on lignocellulosic components using non-linear and crop-specific configurations. *Industrial Crops and Products* 120, 330–342. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.042>
- Wang, J.P., Matthews, M.L., Naik, P.P., Williams, C.M., Ducoste, J.J., Sederoff, R.R., Chiang, V.L., 2019. Flux modeling for monolignol biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology, Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.12.003>
- Yu, L., Liu, W., Li, W., Qin, H., Xu, J., Zuo, M., 2018. Non-destructive identification of maize haploid seeds using nonlinear analysis method based on their near-infrared spectra. *Biosystems Engineering* 172, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2018.05.011>
- Zhang, Y., Culhaoglu, T., Pollet, B., Melin, C., Denoue, D., Barrière, Y., Baumberger, S., Méchin, V., 2011. Impact of Lignin Structure and Cell Wall Reticulation on Maize Cell Wall Degradability. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10129–10135. <https://doi.org/10.1021/jf2028279>
- Zhou, G.Y., Leu, M.C., Blackmore, D., 1993. Fractal geometry model for wear prediction. *Wear* 170, 1–14. [https://doi.org/10.1016/0043-1648\(93\)90345-M](https://doi.org/10.1016/0043-1648(93)90345-M)

# Annexes

**Annexe 1 : Matrice de corrélations sur les 2 années pour les caractères de digestibilités de la paoi et les caractères histologies**





Annexe 2 : Différence entre les parents F4 et F7 de la population de RILs au niveau biochimique et histologiques

Caractères	Significativité	F4 (M±ET)	F7 (M±ET)
Surface.coupe.reel.cm <sup>2</sup>	**	0.84±0.12	1.38±0.34
Faisceau.surface.reel.psection	*	6.6±2.29	4.37±0.47
Surface.tissu.“dark”.psection	ns	8.78±7.51	9.47±5.06
Surface.tissu.“light”.psection	ns	91.22±7.51	90.53±5.06
Surface.Moelle.psection	ns	81.71±8.68	83.33±3.26
Surface.Ecorces.psection	ns	11.56±6.29	12.04±3.07
Parenchyme.peu.lignifié.psection	**	75.73±6.09	23.6±5.35
Parenchyme.lignifié.psection	**	5.04±5.95	59.3±3.86
<b>Caractères associés au Rind dark</b>			
TRD1.psection	ns	0±0	0±0
TRD2.psection	ns	0±0	0±0
TRD3.psection	ns	0.29±0.28	0.42±0.36
TRD4.psection	ns	0.14±0.23	0.12±0.13
TRD5.psection	**	0±0	0.01±0.01
TRD6.psection	ns	3.8±3.99	3.78±2.37
TRD7.psection	ns	2.59±2.5	1.95±1.17
TRD8.psection	**	0.19±0.12	0.78±0.2
TRD9.psection	ns	0.53±0.42	1.17±0.5
<b>Caractères associés au Rind light</b>			
TRL1.psection	ns	0±0.01	0.01±0.01
TRL2.psection	ns	0.01±0.01	0±0
TRL3.psection	ns	0.91±0.68	0.48±0.44
TRL4.psection	ns	2.85±2.27	2.38±1.46
TRL5.psection	ns	0.02±0.02	0.22±0.21
TRL6.psection	ns	0±0	0.01±0.01
TRL7.psection	ns	0.02±0.01	0.02±0.02
TRL8.psection	ns	0±0	0±0
TRL9.psection	ns	0±0	0±0
<b>Caractères associés à l'épiderme</b>			
TE1.psection	**	0.07±0.03	0.38±0.24
TE2.psection	ns	0.14±0.17	0.3±0.31
<b>Caractères associés à la moelle</b>			
TM3.psection	ns	0.1±0.1	0.09±0.05
TM6.psection	ns	0.07±0.09	0.04±0.04
TM7.psection	ns	0.28±0.29	0.1±0.08
TM8.psection	ns	0.39±0.39	0.19±0.19
TM9.psection	ns	0.1±0.12	0.02±0.01
<b>Caractères associés aux bundles</b>			
TB1.psection	ns	0.41±0.12	0.57±0.23
TB2.psection	ns	5.01±2.43	2.83±0.66
TB3.psection	**	1.06±0.06	0.69±0.12
TB4.psection	ns	0.12±0.12	0.27±0.18
TB5.psection	*	0.47±0.09	0.29±0.06
<b>Distinction entre les différents degrés de digestibilité des tissus digestibles de la moelle</b>			
TM2a.psection	ns	1.13±0.93	1.66±1.12

Caractères	Significativité	F4 (M±ET)	F7 (M±ET)
<b>TM2b.psection</b>	**	36.41±15.87	3.38±3.03
<b>TM5a.psection</b>	*	1.12±0.68	3.39±1.7
<b>TM5b.psection</b>	**	37.07±11.46	15.17±3.1
<b>TM1a.psection</b>	**	1.03±1.53	8.69±4.24
<b>TM1b.psection</b>	**	0.89±1.43	17.87±4.29
<b>TM4a.psection</b>	**	2.31±2.15	15.88±7.33
<b>TM4b.psection</b>	**	0.8±0.88	16.86±5.14



**Annexe 3 : Variabilité et effet du génotype ainsi que l'héritabilité pour les caractères Histologiques dans la population de RILs.**

Caractères	Minimum	Moyenne	Maximum	Effet Génétique	Héritabilité
Surface.coupe.reel.cm <sup>2</sup>	0,48	1,43	2,65	***	0,33
Faisceau.surface.reel.psection	2,81	5,12	9,04	***	0,38
Surface.tissu."dark".psection	0,76	10,84	35,00	***	0,32
Surface.tissu."light".psection	65,00	89,16	99,24	***	0,32
Surface.Moelle.psection	58,34	80,84	91,65	***	0,38
Surface.Ecorces.psection	1,03	13,67	32,94	***	0,34
Parenchyme.peu.lignifié.psection	14,06	44,86	87,43	***	0,48
Parenchyme.lignifié.psection	0,62	35,51	69,16	***	0,45
<b>Caractères associés au Rind "dark"</b>					
TRD1.psection	0,00	0,00	0,04	***	0,59
TRD2.psection	0,00	0,00	0,03	***	0,34
TRD3.psection	0,00	0,42	2,69	***	0,35
TRD4.psection	0,00	0,35	2,35		0,11
TRD5.psection	0,00	0,02	0,21		0,12
TRD6.psection	0,13	3,44	18,61	***	0,39
TRD7.psection	0,19	3,29	10,70	**	0,24
TRD8.psection	0,00	0,74	2,12	***	0,35
TRD9.psection	0,05	1,10	3,01	***	0,37
<b>Caractères associés au Rind "light"</b>					
TRL1.psection	0,00	0,02	1,57		0,09
TRL2.psection	0,00	0,01	0,06	***	0,29
TRL3.psection	0,00	0,48	2,32	**	0,23
TRL4.psection	0,01	2,83	7,45	***	0,43
TRL5.psection	0,00	0,16	1,06	***	0,46
TRL6.psection	0,00	0,01	0,15		0,00
TRL7.psection	0,00	0,06	0,27	**	0,22
TRL8.psection	0,00	0,00	0,03	**	0,20
TRL9.psection	0,00	0,01	0,06		0,03
<b>Caractères associés à l'épiderme</b>					
TE1.psection	0,00	0,36	2,14	***	0,51
TE2.psection	0,00	0,37	2,55	*	0,19
<b>Caractères associés à la moelle</b>					
TM3.psection	0,00	0,08	0,46	*	0,15
TM6.psection	0,00	0,03	0,39		0,00
TM7.psection	0,00	0,11	0,82		0,03
TM8.psection	0,00	0,22	1,47	**	0,22
TM9.psection	0,00	0,02	0,25		0,00
<b>Caractères associés aux Faisceaux</b>					
TB1.psection	0,06	0,58	2,25	***	0,38
TB2.psection	1,32	3,38	7,10	***	0,37
TB3.psection	0,10	0,89	2,17	***	0,35
TB4.psection	0,00	0,27	0,92	***	0,47
TB5.psection	0,14	0,40	0,99	***	0,30

Caractères	Minimum	Moyenne	Maximum	Effet Génétique	Héritabilité
<b>Distinction entre les différents degrés de digestibilité des tissus digestibles de la moelle</b>					
<b>TM2a.psection</b>	0,08	2,93	18,16	***	0,42
<b>TM2b.psection</b>	0,27	11,72	44,87	***	0,53
<b>TM5a.psection</b>	0,08	2,86	13,32	***	0,37
<b>TM5b.psection</b>	9,25	27,35	56,90	***	0,47
<b>TM1a.psection</b>	0,01	8,12	23,52	***	0,34
<b>TM1b.psection</b>	0,02	8,94	32,61	***	0,42
<b>TM4a.psection</b>	0,20	11,40	31,57	***	0,40
<b>TM4b.psection</b>	0,12	7,06	21,11	***	0,44

Annexe 4 : Différence histologique entre les différents groupes séparé histologiquement.

Caractères	1vs2	1vs3	2vs3	Moyenne1	Moyenne2	Moyenne3
Surface.coupe.reel.cm <sup>2</sup>	***	**	ns	1.53±0.38	1.29±0.40	1.36±0.32
Faisceau.surface.reel.psection	*	*	ns	4.89±1.13	5.32±1.42	5.27±1.05
Surface.tissu.“dark”.psection	ns	**	***	10.13±5.34	9.44±6.72	14.08±8.19
Surface.tissu.“light”.psection	ns	**	***	89.87±5.34	90.56±6.72	85.92±8.19
Surface.Moelle.psection	ns	**	***	81.65±4.78	81.8±5.98	78.18±6.63
Surface.Ecorces.psection	ns	**	***	13.1±4.07	12.56±5.25	16.14±6.1
Parenchyme.peu.lignifié.psection	***	***	***	37.53±10.25	61.86±8.69	31.61±7.62
Parenchyme.lignifié.psection	***	ns	***	43.69±11.61	19.42±10.46	46.08±7.04
<b>Caractères associés au Rind dark</b>						
TRD1.psection	***	ns	***	0±0.01	0±0.01	0.01±0.01
TRD2.psection	*	ns	*	0±0	0±0	0±0
TRD3.psection	ns	***	***	0.35±0.36	0.32±0.42	0.72±0.67
TRD4.psection	**	ns	***	0.36±0.41	0.26±0.41	0.43±0.42
TRD5.psection	***	ns	**	0.02±0.03	0.02±0.02	0.02±0.02
TRD6.psection	ns	***	***	2.8±2.28	3.13±3.26	5.28±3.99
TRD7.psection	*	ns	**	3.19±1.84	2.86±2.34	3.92±2.32
TRD8.psection	***	ns	***	0.8±0.39	0.57±0.34	0.84±0.39
TRD9.psection	ns	ns	ns	1.11±0.51	1.01±0.55	1.18±0.55
<b>Caractères associés au Rind light</b>						
TRL1.psection	ns	***	*	0.01±0.01	0.03±0.17	0.01±0.01
TRL2.psection	ns	*	ns	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
TRL3.psection	*	ns	ns	0.42±0.37	0.57±0.49	0.5±0.48
TRL4.psection	ns	**	*	2.96±1.6	3.02±1.94	2.18±1.87
TRL5.psection	ns	***	*	0.19±0.2	0.16±0.19	0.08±0.11
TRL6.psection	*	ns	*	0.01±0.02	0.01±0.01	0.01±0.01
TRL7.psection	**	**	ns	0.07±0.07	0.05±0.05	0.04±0.04
TRL8.psection	ns	**	ns	0±0	0±0	0±0
TRL9.psection	*	***	ns	0.01±0.01	0±0	0±0
<b>Caractères associés à l'épiderme</b>						
TE1.psection	***	ns	***	0.39±0.32	0.25±0.18	0.44±0.26
TE2.psection	*	ns	***	0.38±0.36	0.28±0.3	0.46±0.3
<b>Caractères associés à la moelle</b>						
TM3.psection	ns	*	**	0.08±0.08	0.09±0.07	0.06±0.08
TM6.psection	ns	ns	ns	0.03±0.05	0.03±0.05	0.03±0.07
TM7.psection	ns	ns	ns	0.11±0.11	0.12±0.15	0.13±0.15
TM8.psection	ns	ns	ns	0.19±0.23	0.24±0.3	0.25±0.32
TM9.psection	ns	ns	ns	0.02±0.03	0.03±0.05	0.02±0.03
<b>Caractères associés aux bundles</b>						
TB1.psection	*	*	**	0.55±0.26	0.65±0.34	0.5±0.32
TB2.psection	ns	*	ns	3.18±1.09	3.55±1.43	3.55±1.15
TB3.psection	ns	ns	ns	0.87±0.33	0.86±0.32	0.97±0.35
TB4.psection	ns	ns	ns	0.28±0.2	0.27±0.19	0.26±0.26
TB5.psection	ns	ns	ns	0.39±0.14	0.38±0.15	0.4±0.15
<b>Distinction entre les différents degrés de digestibilité des tissus digestibles de la moelle</b>						
TM2a.psection	ns	***	***	3.14±2.61	3.78±2.81	0.86±0.62
TM2b.psection	***	**	***	7.95±3.99	20.25±8.6	6.26±4.32

Caractères	1vs2	1vs3	2vs3	Moyenne1	Moyenne2	Moyenne3
TM5a.psection	ns	***	***	3.37±2.29	3.08±2.39	1.47±0.97
TM5b.psection	***	ns	***	23.07±6.67	34.76±9.6	23.02±4.6
TM1a.psection	***	***	***	8.21±3.56	3.81±2.82	14.29±4.52
TM1b.psection	***	***	ns	13.46±5.67	5.99±4.59	5.38±2.77
TM4a.psection	***	***	***	11.29±4.51	5.02±3.24	21.72±4.27
TM4b.psection	***	***	ns	10.73±4.36	4.6±3.09	4.7±2.71



## Annexe 6 : Positon de début et de fin des régions Monomorphiques.

	Chromosomes	Position (bp)	Posison (cM)
début	1	98320184	120.77
fin	1	107183068	121.98
début	2	45962268	96.78
fin	2	48402120	99.02
début	2	149338757	120.72
fin	2	152508654	121.53
début	3	72363528	71.85
fin	3	86841477	72.92
début	3	89433510	72.27
fin	3	113554970	73.82
début	3	204356648	163.06
fin	3	207148384	171.59
début	3	230900686	223.43
fin	3	232040569	223.66
début	4	55730740	60.78
fin	4	66286010	62.42
début	4	86458995	65.93
fin	4	96309068	65.94
début	4	201733182	149.73
fin	4	203817172	151.38
début	4	204962196	151.55
fin	4	206367586	152.38
début	5	39818124	75.09
fin	5	42227807	75.21
début	5	109326025	109.63
fin	5	127043149	110.42
début	5	194831567	154.73
fin	5	198788722	159.66
début	6	71921957	20.02
fin	6	76969238	20.95
début	6	83778276	24.43
fin	6	86561164	26.54
début	6	141285027	89.13
fin	6	143961659	91.23
début	7	112219778	75.73
fin	7	117303186	76.86
début	8	23771379	52.98
fin	8	26072742	53.71
début	8	37782940	55.96
fin	8	57516538	56.41
début	8	67888277	59.51
fin	8	73854904	61,28



## Annexes

	Chromosomes	Position (bp)	Posison (cM)
début	8	82967102	63,47
fin	8	87033018	63,46
début	8	114014118	75,64
fin	8	117971719	77,22
début	8	130926291	85,34
fin	8	134491653	86,51
début	8	135774948	86,67
fin	8	138887412	87,68
début	10	29536566	41,68
fin	10	33614687	41,41
début	10	34930756	41,41
fin	10	57997699	42,36

Tableau 5 : Positions des QTLs

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
BrAc.pCWR	PZE.101160748	1	164.31	3.19	0.01	163.71	164.31	-0.14	0.05	-3.04
BrAc.pCWR	PZE.101160748	1	164.31	4.18	0.05	161.88	168.66	-0.14	0.05	-3.04
BrAc.pCWR	PZE.101180035	1	185.14	3.78	0.05	179.02	186.28	-0.12	0.05	-2.51
BrAc.pCWR	PZE.102036427	2	58.82	5.96	0.01	55.38	61.89	-0.2	0.05	-4.29
BrAc.pCWR	PZE.102042073	2	67.6	6.58	0.05	58.82	71.3	-0.15	0.05	-3.23
BrAc.pCWR	PZE.102119899	2	125.83	3.38	0.05	124.73	132.94	0.12	0.05	2.56
BrAc.pCWR	PZE.103016459	3	44.13	3.28	0.05	44.13	46.13	0.03	0.05	0.66
BrAc.pCWR	PZE.103024938	3	55.11	3.95	0.01	54.02	56	0.1	0.05	2.14
BrAc.pCWR	PZE.103024938	3	55.11	3.31	0.05	54.02	55.11	0.1	0.05	2.14
BrAc.pCWR	SYN8509	4	39.77	7.73	0.05	39.77	45.5	0.15	0.05	3.19
BrAc.pCWR	PZE.104017733	4	45.5	8.5	0.01	42.78	46.17	0.19	0.05	4.08
BrAc.pCWR	PZE.104017733	4	45.5	3.46	NA	42.78	46.17	0.19	0.05	4.08
BrAc.pCWR	PZE.104036198	4	59.82	10.16	0.01	59.19	60.92	0.23	0.04	5.2
BrAc.pCWR	PZE.104036198	4	59.82	7.6	0.05	59.19	60.92	0.23	0.04	5.2
BrAc.pCWR	PZE.104036198	4	59.82	5.22	NA	58.68	60.92	0.23	0.04	5.2
BrAc.pCWR	PZE.105123093	5	140	3.28	0.01	140	141.19	0.14	0.05	2.98
BrAc.pCWR	PZE.105123093	5	140	7.83	0.05	137.51	140	0.14	0.05	2.98
BrAc.pCWR	PZE.105154210	5	170.22	4.04	0.05	169.3	173.5	0.05	0.05	1.05
BrAc.pCWR	SYNGENTA13988	5	180.02	3.43	0.05	177.73	180.02	-0.08	0.05	-1.73
BrAc.pCWR	PZE.106106224	6	115.14	3.1	0.05	115.14	115.8	0.05	0.05	0.98
BrAc.pCWR	PZE.107132427	7	164.35	3.84	0.05	162.04	168.04	0.08	0.05	1.62
BrAc.pCWR	PUT.163A.76010623.3722	8	133.82	4.9	NA	131.24	133.82	-0.23	0.05	-5.18
BrAc.pCWR	PZE.108125717	8	141.68	3.73	0.01	133.82	141.68	-0.18	0.05	-4
BrAc.pCWR	PZE.109006938	9	23.63	3.38	0.05	23.63	26.49	-0.04	0.05	-0.8
BrAc.pCWR	PZE.109023492	9	64.54	3.52	0.05	62.82	66.01	0.09	0.05	1.93
BrAc.pCWR	PUT.163A.50337277.2257	9	90.34	3.94	0.01	86.34	92.9	0.13	0.05	2.74
BrAc.pCWR	SYNGENTA0393	10	94.58	3.96	NA	89.9	94.58	0.21	0.05	4.5
BrAc.pCWR	PZE.110092938	10	105.79	3.42	NA	103.29	110.14	0.2	0.05	4.2
Bundle.surface.reel.psection	SYN6208	1	25.23	3.48	NA	22.47	26.52	-0.32	0.07	-4.3
Bundle.surface.reel.psection	PZE.102182624	2	215.3	3.95	NA	213.07	216.67	0.32	0.08	4.29
Bundle.surface.reel.psection	SYN772	3	4.39	5.3	0.01	0	5.95	-0.34	0.08	-4.45
Bundle.surface.reel.psection	SYN772	3	4.39	4.05	0.05	0	5.95	-0.34	0.08	-4.45
Bundle.surface.reel.psection	SYN772	3	4.39	3.77	NA	0	5.95	-0.34	0.08	-4.45
Bundle.surface.reel.psection	PZE.103007349	3	19.67	3.27	0.01	19.67	19.67	-0.27	0.08	-3.58
Bundle.surface.reel.psection	PZE.105115780	5	130.98	3.17	0.01	130.98	131.63	-0.22	0.08	-2.84
Bundle.surface.reel.psection	PZE.105123093	5	140	3.85	0.01	137.51	143.65	-0.25	0.08	-3.29
Bundle.surface.reel.psection	PZE.108009968	8	29.12	4.27	0.05	19.92	33.3	0.24	0.08	3.14
Bundle.surface.reel.psection	PZE.108011210	8	30.88	4.03	0.01	25.53	35.31	0.28	0.08	3.71
Bundle.surface.reel.psection	PZE.108058477	8	69.92	3.4	0.05	69.08	69.92	0.3	0.08	4.05
Bundle.surface.reel.psection	PZE.108058477	8	69.92	3.28	NA	65.09	69.92	0.3	0.08	4.05
Bundle.surface.reel.psection	PUT.163A.60346578.2556	8	148.24	3.74	0.05	141.68	150.73	-0.23	0.08	-3.05
Bundle.surface.reel.psection	PZE.110014712	10	39	4.92	0.01	34.68	44.95	-0.18	0.08	-2.3
Bundle.surface.reel.psection	PZE.110014712	10	39	5.53	0.05	34.68	42.8	-0.18	0.08	-2.29
CWR.pMS.B.	PZE.101142488	1	145.04	3.05	0.01	145.04	145.04	0.5	0.25	1.97
CWR.pMS.B.	PZE.101160748	1	164.31	4.36	0.01	161.88	167.92	0.76	0.25	2.97
CWR.pMS.B.	PZE.101160748	1	164.31	6.06	0.05	161.88	166	0.76	0.25	2.97
CWR.pMS.B.	PZE.104036198	4	59.82	9.66	0.01	59.19	60.92	0.85	0.25	3.41
CWR.pMS.B.	PZE.104036198	4	59.82	9.3	0.05	59.19	60.92	0.85	0.25	3.41
CWR.pMS.B.	PZE.104096885	4	104.56	4.32	0.05	103.17	107.54	0.02	0.25	0.09

## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
CWR.pMS.B.	SYN3361	5	201.37	3.94	0.01	197.13	205.31	-0.62	0.25	-2.44
CWR.pMS.B.	SYN3361	5	201.37	3.48	0.05	198.77	202.96	-0.62	0.25	-2.44
CWR.pMS.B.	PZE.106027935	6	19.6	4.04	0.05	17.41	22.02	-0.88	0.26	-3.37
CWR.pMS.B.	PZE.107109969	7	128.56	4.74	0.01	122.82	131.68	0.9	0.25	3.57
CWR.pMS.B.	SH1.4	9	34.68	5.57	0.05	33.09	55.21	0.94	0.26	3.6
CWR.pMS.B.	PZE.109012824	9	39.92	6.92	0.01	32.44	40.92	1.05	0.26	4.11
CWR.pMS.B.	PZE.109012824	9	39.92	3.41	NA	37.58	39.92	1.05	0.26	4.11
CWRd.pMS	PZE.101160748	1	164.31	12.97	0.01	161.88	164.31	1.03	0.14	7.25
CWRd.pMS	PZE.101160748	1	164.31	11.29	0.05	161.88	166	1.03	0.14	7.25
CWRd.pMS	PZE.101160748	1	164.31	9.21	NA	161.88	166	1.03	0.14	7.25
CWRd.pMS	PZE.102130219	2	139.95	3.98	0.05	138.6	149.63	0.52	0.15	3.43
CWRd.pMS	PZE.102132861	2	144.8	3.27	NA	143.53	144.8	0.6	0.15	4.02
CWRd.pMS	PZA03293.2	2	200.05	3.22	0.05	198.46	200.05	0.26	0.15	1.7
CWRd.pMS	PUT.163A.21390 620.1531	2	225.86	3.29	NA	224.01	225.86	0.63	0.15	4.22
CWRd.pMS	PZE.103180508	3	210.1	3.06	0.05	210.1	210.1	0.44	0.15	2.89
CWRd.pMS	PZE.105031680	5	61.02	5.23	0.05	58.97	68.84	-0.17	0.16	-1.07
CWRd.pMS	PZE.105098940	5	115.17	4.12	0.05	113.57	116.04	0.17	0.15	1.14
CWRd.pMS	PZE.106017013	6	15.98	3.46	0.05	13.89	19.6	-0.65	0.16	-4.14
CWRd.pMS	PZE.106027935	6	19.6	5.08	0.01	14.68	20.85	-0.69	0.16	-4.44
CWRd.pMS	PZE.106027935	6	19.6	4.14	NA	15.98	22.53	-0.69	0.16	-4.44
CWRd.pMS	PUT.163A.78092 237.4250	8	74.55	4.28	0.05	72.52	75.64	0.19	0.15	1.24
CWRd.pMS	SYN8904	8	115.18	4.37	0.01	111.81	115.57	0.6	0.15	4.02
CWRd.pMS	SYN8904	8	115.18	3.22	NA	111.81	115.18	0.6	0.15	4.02
CWRd.pMS	PZE.108119984	8	131.24	3.13	NA	131.24	131.24	0.55	0.15	3.63
CWRd.pMS	PZE.109118333	9	159.01	4.01	0.05	151.48	160.67	-0.42	0.16	-2.62
CWRnd.pMS	PZE.101229632	1	244.1	5.43	0.01	239.31	244.1	0.73	0.19	3.87
CWRnd.pMS	PZE.101229632	1	244.1	5.01	0.05	239.31	246.48	0.73	0.19	3.87
CWRnd.pMS	PZE.102037297	2	61.06	3.85	0.01	58.82	63.17	-0.77	0.19	-3.97
CWRnd.pMS	PZE.102037297	2	61.06	3.84	0.05	58.82	64.35	-0.77	0.19	-3.97
CWRnd.pMS	PZE.102037297	2	61.06	3.14	NA	61.06	61.06	-0.77	0.19	-3.97
CWRnd.pMS	PZE.104000024	4	0	3.48	0.01	0	1.11	-0.59	0.19	-3.14
CWRnd.pMS	PZE.104017733	4	45.5	3.28	0.01	45.5	48.08	0.53	0.19	2.77
CWRnd.pMS	PZE.104036198	4	59.82	14.13	0.01	59.82	60.92	1.18	0.18	6.69
CWRnd.pMS	PZE.104036198	4	59.82	14.85	0.05	59.82	60.92	1.18	0.18	6.69
CWRnd.pMS	PZE.104036198	4	59.82	8.42	NA	59.19	60.92	1.18	0.18	6.69
CWRnd.pMS	PZE.105015838	5	33.78	3.36	0.01	30.34	37.48	-0.29	0.19	-1.49
CWRnd.pMS	PZE.105063794	5	90.84	3.21	NA	88.96	91.45	-0.71	0.19	-3.71
CWRnd.pMS	PZE.105075527	5	104.88	3.47	0.01	104.33	106.78	-0.49	0.19	-2.57
CWRnd.pMS	PZE.105075527	5	104.88	3.19	0.05	104.88	105.28	-0.49	0.19	-2.57
CWRnd.pMS	PZE.107099124	7	120.24	5.52	0.01	117.89	125.47	0.83	0.19	4.49
CWRnd.pMS	PZE.107099124	7	120.24	3.67	0.05	119.53	126.77	0.83	0.19	4.49
CWRnd.pMS	PZE.107099124	7	120.24	4.21	NA	115.2	126.37	0.83	0.19	4.49
CWRnd.pMS	PZE.108097730	8	100.4	5.33	0.01	96.95	105.65	0.31	0.19	1.64
CWRnd.pMS	PZE.108101678	8	104.72	5.64	0.05	96.95	105.65	0.2	0.19	1.03
CWRnd.pMS	SH1.4	9	34.68	10.19	0.01	34.68	36.75	0.78	0.2	3.96
CWRnd.pMS	SH1.4	9	34.68	9.91	0.05	34.68	36.75	0.78	0.2	3.96
CWRnd.pMS	PZE.109012824	9	39.92	5.29	NA	37.58	40.92	0.99	0.19	5.22
CWRnd.pMS	SYNGENTA039 3	10	94.58	4.29	NA	92.62	104.08	0.89	0.19	4.7
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.101089776	1	109.57	5.81	0.01	103.1	111.46	-0.47	0.22	-2.15
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.101089776	1	109.57	6.67	0.05	105.18	111.46	-0.47	0.22	-2.15
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.101155386	1	160.06	6.06	0.01	159.28	164.31	-0.65	0.22	-2.99
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.101155386	1	160.06	5.97	0.05	159.28	166	-0.65	0.22	-2.99
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.102040312	2	64.35	3.78	NA	58.82	70.59	0.96	0.22	4.38
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.102076225	2	104.8	4.3	NA	101.74	106.99	1.02	0.22	4.62
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.102142638	2	165.95	3.57	0.01	165.95	165.95	-0.31	0.22	-1.4
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.102142638	2	165.95	3.31	0.05	165.95	165.95	-0.31	0.22	-1.4
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.102179936	2	210.46	17.84	0.01	210.46	210.46	0.8	0.22	3.69



## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.102179936	2	210.46	18.77	0.05	210.46	210.46	0.8	0.22	3.69
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PUT.163A.21390620.1531	2	225.86	3.6	NA	222.99	225.86	0.92	0.22	4.27
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.103094159	3	89.72	3.87	0.05	87.35	95.45	-0.25	0.22	-1.12
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	SYN1422	5	85.94	3.12	NA	85.94	88.96	0.79	0.22	3.61
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.105070554	5	99.97	4.43	0.01	97.07	101.93	0.57	0.22	2.6
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.105070554	5	99.97	4.44	0.05	97.07	101.93	0.57	0.22	2.6
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PUT.163A.71419466.3204	7	36.47	4.65	0.01	36.47	49.31	0.71	0.22	3.26
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PUT.163A.71419466.3204	7	36.47	4.65	0.05	36.47	49.31	0.71	0.22	3.26
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.107079545	7	100.33	4.04	0.01	87.45	102.04	0.19	0.22	0.87
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.107079545	7	100.33	4.69	0.05	90.46	102.04	0.19	0.22	0.87
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.107132427	7	164.35	3.52	0.05	164.35	168.04	-0.72	0.22	-3.31
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.107136612	7	175.66	6.93	0.01	173.94	177.88	-1.03	0.21	-4.88
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.107136612	7	175.66	6.35	0.05	173.94	177.88	-1.03	0.21	-4.87
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	SYN10000	7	177.88	4.87	NA	173.94	177.88	-1.06	0.21	-4.97
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.108101966	8	105.24	4.73	0.01	101.96	110.34	-0.61	0.22	-2.79
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.108101966	8	105.24	4.93	0.05	101.96	109.28	-0.61	0.22	-2.79
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PUT.163A.26557278.1605	8	145.32	6.36	0.01	144.1	150.73	-0.49	0.22	-2.26
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PUT.163A.26557278.1605	8	145.32	6.68	0.05	144.1	148.24	-0.49	0.22	-2.26
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.109008703	9	29.66	3.48	0.05	26.49	32.44	-0.19	0.23	-0.84
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	SYN11758	9	44.25	3.83	0.05	39.92	46.22	-0.63	0.22	-2.86
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.109090188	9	110.36	5.9	0.01	106.15	110.36	-0.8	0.22	-3.6
Dates.de.floraisons.femelles.médiane.	PZE.109090188	9	110.36	4.18	0.05	106.15	110.36	-0.8	0.22	-3.6
Feest.mg.gCWR	PZE.102101817	2	114.72	4.14	NA	105.72	118.68	0.24	0.05	4.51
Feest.mg.gCWR	PZE.102099347	2	115.19	10.82	0.01	113.14	116.13	0.24	0.05	4.58
Feest.mg.gCWR	PZE.102099347	2	115.19	7.25	0.05	112.45	116.98	0.24	0.05	4.58
Feest.mg.gCWR	PZE.102118717	2	124.73	3.56	NA	121.37	125.83	0.22	0.05	4.23
Feest.mg.gCWR	PZE.102184139	2	219.82	3.09	NA	219.82	219.82	0.2	0.05	3.91
Feest.mg.gCWR	PZE.104000024	4	0	3.84	0.01	0	2.8	-0.12	0.05	-2.2
Feest.mg.gCWR	PZE.104000024	4	0	5.5	0.05	0	1.11	-0.12	0.05	-2.2
Feest.mg.gCWR	PZE.104152999	4	184.74	3.13	NA	184.74	185.94	-0.21	0.05	-4.05
Feest.mg.gCWR	PZE.105048861	5	75.79	3.2	NA	74.61	75.79	0.21	0.05	3.87
Feest.mg.gCWR	PZE.105054383	5	79.64	3.46	0.05	78.61	79.64	0.18	0.05	3.41
Feest.mg.gCWR	PZE.105154210	5	170.22	3.68	0.05	167.43	175.33	-0.09	0.05	-1.69
Feest.mg.gCWR	PZE.106027935	6	19.6	4.62	0.01	15.98	22.53	0.07	0.06	1.25
Feest.mg.gCWR	PZE.106027935	6	19.6	6.69	0.05	11.21	22.53	0.07	0.06	1.25
Feest.mg.gCWR	PZE.106061139	6	69.95	4.29	0.01	64.77	71.45	-0.09	0.05	-1.67
Feest.mg.gCWR	PZE.106061139	6	69.95	4.68	0.05	64.77	76.55	-0.09	0.05	-1.67
Feest.mg.gCWR	PZE.107001146	7	2.92	3.6	NA	0	6.77	0.22	0.05	4.33
Feest.mg.gCWR	SYN18496	7	30.09	6.29	0.01	23.51	32.02	0.1	0.05	1.84
Feest.mg.gCWR	SYN18496	7	30.09	5.68	0.05	27.44	32.02	0.1	0.05	1.84
Feest.mg.gCWR	PZE.107031555	7	64.14	3.38	0.01	63.47	66.14	-0.09	0.05	-1.6
Feest.mg.gCWR	PZE.107031555	7	64.14	3.21	0.05	64.14	66.14	-0.09	0.05	-1.6
Feest.mg.gCWR	SYN31693	2	15.84	3.66	0.05	13.66	20.93	-0.14	0.05	-2.74
Feest.mg.gCWR	PHM12952.13	2	19.9	3.42	0.01	15.84	33.11	-0.11	0.05	-2.23
Feest.mg.gCWR	PZE.102140935	2	162.79	5.23	0.01	162.79	165.95	-0.08	0.05	-1.5
Feest.mg.gCWR	PZE.102140935	2	162.79	5.24	0.05	158.92	165.95	-0.08	0.05	-1.5
Feest.mg.gCWR	PZA03293.2	2	200.05	4.97	0.01	198.46	207.36	0.13	0.05	2.6
Feest.mg.gCWR	PZA03293.2	2	200.05	10.77	0.05	200.05	200.05	0.13	0.05	2.6



## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
Feeth.mg.gCWR	PZE.102192375	2	239.7	5.78	0.01	238.77	242.2	-0.17	0.05	-3.44
Feeth.mg.gCWR	PZE.102192375	2	239.7	6.71	0.05	238.77	242.2	-0.17	0.05	-3.44
Feeth.mg.gCWR	PZE.103007349	3	19.67	4.7	0.05	17.23	19.67	-0.12	0.05	-2.42
Feeth.mg.gCWR	PZE.104123149	4	149.25	4.71	0.05	147.21	154.15	0.06	0.05	1.27
Feeth.mg.gCWR	PZE.106047388	6	44.64	3.72	0.05	44.64	46.84	-0.14	0.05	-2.87
Feeth.mg.gCWR	PZE.106052904	6	55.34	3.25	0.01	55.34	55.34	-0.19	0.05	-3.85
Feeth.mg.gCWR	PZE.108041587	8	59.51	3.06	NA	59.51	59.51	0.17	0.05	3.41
Feeth.mg.gCWR	PZE.109012824	9	39.92	3.17	0.05	39.92	39.92	0.1	0.05	1.97
Feeth.mg.gCWR	PZE.109100121	9	125.21	3.79	0.05	122.77	127.63	-0.2	0.06	-3.31
Feeth.mg.gCWR	PZE.110094832	10	110.14	5.84	0.05	110.14	111.9	0.12	0.05	2.28
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.101134573	1	134.61	4.41	NA	127.95	140.74	-2.1	0.45	-4.63
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.101137456	1	138.98	3.73	0.05	134.61	143.09	-2.03	0.46	-4.47
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.101138790	1	140.74	5.54	0.01	138.23	143.09	-2.08	0.46	-4.57
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.101195541	1	204.65	3.2	NA	204.65	205.54	-1.86	0.46	-4.06
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.101208157	1	222.2	3.85	0.05	218.77	228.75	-1.43	0.46	-3.08
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.101229632	1	244.1	6.44	NA	239.31	247.51	-2.81	0.46	-6.16
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.101231883	1	246.48	8.97	0.01	242.12	249.61	-2.25	0.46	-4.84
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.101231883	1	246.48	9.42	0.05	241.31	249.61	-2.25	0.46	-4.84
Hauteurs.d.insertions(cm)	PUT.163A.28982 637.1670	2	174.97	3.36	NA	171.5	175.35	-1.85	0.46	-4.04
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.103129557	3	140.02	4.09	0.01	138.82	141.25	1.72	0.47	3.67
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.103129557	3	140.02	3.24	0.05	140.02	140.02	1.72	0.47	3.67
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.103137006	3	150.07	3.13	0.01	150.07	150.07	1.82	0.49	3.73
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.104011522	4	30.57	5.04	0.01	28	31.73	1.81	0.46	3.92
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.104011522	4	30.57	4.55	0.05	28	56.45	1.81	0.46	3.92
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.104011522	4	30.57	3.08	NA	30.57	30.57	1.81	0.46	3.92
Hauteurs.d.insertions(cm)	SYN8509	4	39.77	3.41	0.01	37.92	42.78	1.74	0.46	3.76
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.104026267	4	54.69	3.58	0.01	48.08	56.03	1.22	0.47	2.59
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.105027872	5	55.26	5.8	0.01	53.7	66.49	-1.46	0.48	-3.06
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.105027872	5	55.26	6.79	0.05	53.7	55.87	-1.46	0.48	-3.06
Hauteurs.d.insertions(cm)	SYN31128	5	205.31	3.59	0.01	205.31	206.64	1.3	0.47	2.74
Hauteurs.d.insertions(cm)	PUT.163A.60338 736.2369	7	119.53	3.14	0.05	119.53	120.24	0.99	0.47	2.12
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.108016243	8	40.05	5.42	0.01	39.53	41.64	1.23	0.47	2.63
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.108016243	8	40.05	8.48	0.05	39.53	40.05	1.23	0.47	2.63
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.108074213	8	85.34	5.5	0.05	82.28	90.37	-0.29	0.47	-0.62
Hauteurs.d.insertions(cm)	PZE.108082906	8	88.49	7.7	0.01	84.15	90.37	-0.64	0.47	-1.37
Hauteurs.d.insertions(cm)	ZM002674.0672	10	84.68	4.41	0.01	81.48	87.45	1.3	0.46	2.8
Hauteurs.d.insertions(cm)	ZM002674.0672	10	84.68	4.16	0.05	81.48	87.45	1.3	0.46	2.8
Hauteurs.de.plantes(cm)	SYN6208	1	25.23	5.5	0.01	24.19	26.52	-1.45	0.97	-1.49
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.101017380	1	26.52	5.63	0.05	24.19	31.2	-1.74	0.97	-1.79
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.101028351	1	40.23	3.37	0.01	39.61	40.23	-1.99	0.98	-2.03
Hauteurs.de.plantes(cm)	SYN23289	1	69.47	4.71	0.05	68.8	73.34	-2.27	0.99	-2.28
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.101117011	1	125.52	5.89	NA	119.3	129.29	-4.96	0.93	-5.34
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.101130395	1	131.44	6.87	0.01	127.33	134.61	-4.14	0.94	-4.39
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.101220121	1	234.57	3.12	0.05	234.57	234.57	-0.4	0.98	-0.41
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.102000004	2	0	4.38	0.01	0	4.25	-0.61	0.98	-0.62
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.102000004	2	0	6.85	0.05	0	3.52	-0.61	0.98	-0.62
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.102099347	2	115.19	3.06	NA	114.72	115.19	3.69	0.96	3.83
Hauteurs.de.plantes(cm)	SYN36645	2	120.21	19.23	0.01	118.68	120.7	3.52	0.96	3.66
Hauteurs.de.plantes(cm)	SYN36645	2	120.21	12.86	0.05	114.72	121.37	3.52	0.96	3.66
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZA03293.2	2	200.05	4.98	0.05	195.46	200.05	-0.86	0.97	-0.88
Hauteurs.de.plantes(cm)	PUT.163A.21390 620.1531	2	225.86	3.79	0.05	222.99	228.39	-3.09	0.97	-3.19
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.103011490	3	31.21	4.95	0.05	31.21	31.21	-1.78	0.98	-1.81
Hauteurs.de.plantes(cm)	PUT.163A.78087 967.4211	3	195.16	6.4	0.05	191.1	198.45	-1.15	0.98	-1.18
Hauteurs.de.plantes(cm)	SYN8509	4	39.77	19.46	0.01	37.92	39.77	5.52	0.93	5.95
Hauteurs.de.plantes(cm)	SYN8509	4	39.77	14.09	0.05	30.57	39.77	5.52	0.93	5.95
Hauteurs.de.plantes(cm)	SYN8509	4	39.77	7.17	NA	35.86	45.5	5.52	0.93	5.95
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.104150374	4	179.79	24.13	0.01	177.12	179.79	5.63	0.92	6.09
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.104150374	4	179.79	16.15	0.05	178.57	181.02	5.63	0.92	6.09
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.104150374	4	179.79	7.06	NA	174.01	185.94	5.63	0.92	6.09
Hauteurs.de.plantes(cm)	ZM013572.0266	5	4.98	5.01	0.05	4.98	9.77	-3.03	0.96	-3.17
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.105014188	5	30.34	3.22	0.05	30.34	30.34	-2.58	0.96	-2.69
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.105080933	5	109.86	5.98	0.01	109.2	115.17	0.02	0.97	0.03
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.105098158	5	114.76	7.6	0.05	111.24	116.04	-1.16	0.97	-1.2
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.105146867	5	163.84	6.96	0.05	162.51	167.43	0.52	0.99	0.53

## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
Hauteurs.de.plantes(cm)	SYNGENTA14508	5	166.22	5.65	0.01	162.51	168.1	1.15	0.99	1.17
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.106101027	6	107.41	4.67	0.01	103.16	112.17	2.1	0.97	2.18
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.106102395	6	110.62	3.32	0.05	110.62	113.09	2.18	0.96	2.26
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.106111667	6	123.95	5.25	0.01	121.17	123.95	1.78	0.98	1.81
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.106111667	6	123.95	6.21	0.05	121.99	123.95	1.78	0.98	1.81
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.107005367	7	27.44	3.08	NA	27.44	27.44	-3.83	0.95	-4.02
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.107069959	7	89.81	4.92	0.05	87.45	91.74	-0.98	1	-0.99
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.107099124	7	120.24	5.49	0.01	117.89	122.82	0.34	0.97	0.35
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.107109969	7	128.56	7.53	0.05	123.74	128.56	0.94	0.98	0.95
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.107134294	7	170.29	3.3	NA	170.29	170.29	3.74	0.95	3.94
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.108007014	8	19.92	11.56	0.01	17.07	20.73	-4.06	0.95	-4.3
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.108007014	8	19.92	8.01	0.05	17.07	20.73	-4.06	0.95	-4.3
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.108007014	8	19.92	3.76	NA	15.76	22.68	-4.06	0.95	-4.3
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.108058477	8	69.92	5.2	0.05	69.08	75.64	-3.22	0.95	-3.38
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.108112124	8	119.89	3.31	NA	119.89	119.89	-3.79	0.95	-4
Hauteurs.de.plantes(cm)	PUT.163A.76010623.3722	8	133.82	4.11	NA	131.24	133.82	-4.41	0.95	-4.65
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.109001902	9	5.07	6.68	0.01	2.61	5.95	-1.5	0.97	-1.55
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.109001902	9	5.07	4.83	0.05	0	5.95	-1.5	0.97	-1.55
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.110040983	10	50.77	7.37	0.01	44.95	59.81	2.45	0.96	2.55
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.110050273	10	59.81	4.77	0.05	46.63	60.85	4.44	0.94	4.73
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.110050273	10	59.81	4.51	NA	54.7	68.81	4.44	0.94	4.73
Hauteurs.de.plantes(cm)	PZE.110074199	10	81.48	3.85	NA	76.05	85.65	4.31	0.94	4.58
IVCWRDm.pCWR	PZE.101155386	1	160.06	9.21	NA	145.04	163.71	1.21	0.17	7.15
IVCWRDm.pCWR	PZE.101162399	1	166	7.76	0.01	161.88	168.66	1.11	0.17	6.35
IVCWRDm.pCWR	PZE.101162399	1	166	7.87	0.05	163.29	168.66	1.11	0.17	6.35
IVCWRDm.pCWR	PZE.101224367	1	240.38	4.57	0.05	230.11	244.1	-0.45	0.18	-2.43
IVCWRDm.pCWR	PZE.101229632	1	244.1	5.46	0.01	239.31	244.1	-0.5	0.18	-2.71
IVCWRDm.pCWR	PZE.102023677	2	42.32	8.8	0.01	39.67	46.38	0.7	0.19	3.75
IVCWRDm.pCWR	PZE.102023677	2	42.32	4.73	0.05	39.3	46.38	0.7	0.19	3.74
IVCWRDm.pCWR	PZE.102023677	2	42.32	3.1	NA	41.88	42.32	0.7	0.19	3.74
IVCWRDm.pCWR	PZE.102185952	2	224.01	3.28	NA	222.99	224.01	0.78	0.18	4.34
IVCWRDm.pCWR	PZE.103088828	3	85.34	3.54	NA	81.61	89.72	-0.76	0.18	-4.19
IVCWRDm.pCWR	PZE.104000024	4	0	4.1	0.01	0	2.8	0.81	0.18	4.55
IVCWRDm.pCWR	PZE.104000024	4	0	4.17	NA	0	1.11	0.81	0.18	4.55
IVCWRDm.pCWR	SYN8509	4	39.77	11.41	0.01	39.77	43.47	-0.4	0.18	-2.19
IVCWRDm.pCWR	PZE.104036198	4	59.82	10.94	0.05	39.77	59.82	-1.09	0.17	-6.37
IVCWRDm.pCWR	PZE.104036198	4	59.82	7.56	NA	58.68	60.92	-1.09	0.17	-6.37
IVCWRDm.pCWR	PZE.104082177	4	84.95	3.36	NA	81.91	84.95	-0.73	0.18	-4.06
IVCWRDm.pCWR	PZE.104135468	4	160.2	4.05	0.01	157.07	162.08	0.07	0.19	0.34
IVCWRDm.pCWR	PZE.104135468	4	160.2	4.16	0.05	157.07	166.02	0.07	0.19	0.34
IVCWRDm.pCWR	PZE.105067125	5	95.43	3.66	0.01	93.95	98.3	0.53	0.19	2.85
IVCWRDm.pCWR	PZE.105075527	5	104.88	5.75	0.01	103.29	116.04	0.34	0.18	1.85
IVCWRDm.pCWR	PZE.105098158	5	114.76	5.78	0.05	104.88	116.04	0.3	0.18	1.61
IVCWRDm.pCWR	PZE.106102395	6	110.62	3.73	NA	110.62	110.62	-0.83	0.18	-4.65
IVCWRDm.pCWR	PZE.107031555	7	64.14	6.27	0.01	56.85	66.81	-0.48	0.18	-2.59
IVCWRDm.pCWR	PZE.108119984	8	131.24	5.28	NA	131.24	133.82	0.89	0.18	4.94
IVCWRDm.pCWR	PZE.110094832	10	110.14	4.09	NA	102.32	111.9	-0.85	0.19	-4.52
IVDMD.pMS	PZE.101011197	1	20.23	3.37	0.01	19.66	26.11	-0.43	0.21	-2.01
IVDMD.pMS	SYN6208	1	25.23	3.89	0.05	20.23	26.52	-0.37	0.21	-1.76
IVDMD.pMS	PZE.102130219	2	139.95	3.56	0.05	138.6	141.79	-0.31	0.21	-1.47
IVDMD.pMS	PZE.102170920	2	195.46	3.52	0.05	191.81	198.46	0.41	0.21	1.93
IVDMD.pMS	PZE.102193034	2	247.42	3.59	0.01	247.42	247.42	-0.26	0.21	-1.23
IVDMD.pMS	PZE.103154277	3	171.81	3.43	0.05	171.81	172.66	0.48	0.22	2.15
IVDMD.pMS	PZE.104036198	4	59.82	18.59	0.01	59.82	60.92	-1.13	0.2	-5.62
IVDMD.pMS	PZE.104036198	4	59.82	16.53	0.05	59.19	59.82	-1.13	0.2	-5.62
IVDMD.pMS	PZE.104036198	4	59.82	6.16	NA	58.68	60.92	-1.13	0.2	-5.62
IVDMD.pMS	PZE.104090097	4	95.32	5.89	0.01	92.16	96.36	0.08	0.21	0.36
IVDMD.pMS	PZE.104096885	4	104.56	7.08	0.05	95.32	107.54	-0.06	0.21	-0.26
IVDMD.pMS	PZE.105075527	5	104.88	3.54	0.05	104.33	106.78	0.51	0.21	2.39
IVDMD.pMS	PZE.105075673	5	105.28	4.64	0.01	103.9	107.3	0.46	0.21	2.15
IVDMD.pMS	PZE.105163594	5	184.63	3.22	0.05	184.63	187.49	0.71	0.21	3.42
IVDMD.pMS	SYN3361	5	201.37	7.63	0.01	198.77	202.96	0.51	0.21	2.38
IVDMD.pMS	SYN3361	5	201.37	6.23	0.05	198.77	202.96	0.51	0.21	2.38
IVDMD.pMS	SH1.4	9	34.68	10.22	0.01	33.09	36.12	-0.81	0.22	-3.69
IVDMD.pMS	SH1.4	9	34.68	12.9	0.05	34.68	34.68	-0.81	0.22	-3.69
IVDMD.pMS	PZE.109012824	9	39.92	3.93	NA	36.12	40.92	-0.95	0.21	-4.43
Longueur.Ene(cm)	PZE.101056000	1	70.87	3.19	0.01	69.47	70.87	-0.14	0.09	-1.54





## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
Longueur.Ene(cm)	PZE.101056000	1	70.87	3.22	0.05	69.47	72.77	-0.14	0.09	-1.54
Longueur.Ene(cm)	PZE.101097163	1	114.52	3.94	0.01	108.78	116.1	-0.35	0.09	-3.87
Longueur.Ene(cm)	PZE.101097163	1	114.52	3.83	0.05	108.78	115.51	-0.35	0.09	-3.87
Longueur.Ene(cm)	PZE.101126807	1	129.73	5.17	NA	125.52	134.61	-0.44	0.09	-4.97
Longueur.Ene(cm)	PZE.101138790	1	140.74	3.14	0.01	140.74	140.74	-0.37	0.09	-4.16
Longueur.Ene(cm)	PZE.101138790	1	140.74	3.59	0.05	138.98	143.09	-0.37	0.09	-4.16
Longueur.Ene(cm)	PZE.101180035	1	185.14	7.3	NA	181.41	187.95	-0.53	0.09	-6.14
Longueur.Ene(cm)	PZE.101195541	1	204.65	3.27	NA	204.65	205.54	-0.36	0.09	-4.06
Longueur.Ene(cm)	PZE.102037297	2	61.06	4.1	NA	58.82	67.6	-0.4	0.09	-4.4
Longueur.Ene(cm)	PZE.102099347	2	115.19	4.63	0.01	113.14	125.83	0.03	0.09	0.32
Longueur.Ene(cm)	PZE.102099347	2	115.19	4.06	0.05	113.14	116.98	0.03	0.09	0.32
Longueur.Ene(cm)	PZE.102118717	2	124.73	3.78	0.05	122.48	125.83	0.08	0.09	0.87
Longueur.Ene(cm)	PZE.102185952	2	224.01	6.92	NA	222.99	225.86	-0.55	0.09	-6.34
Longueur.Ene(cm)	PUT.163A.21390 620.1531	2	225.86	9.32	0.01	224.01	225.86	-0.51	0.09	-5.75
Longueur.Ene(cm)	PUT.163A.21390 620.1531	2	225.86	7.53	0.05	222.99	225.86	-0.51	0.09	-5.75
Longueur.Ene(cm)	PZE.103016459	3	44.13	3.24	0.01	44.13	45.5	-0.45	0.09	-5.08
Longueur.Ene(cm)	PZE.103016459	3	44.13	3.27	0.05	44.13	45.5	-0.45	0.09	-5.08
Longueur.Ene(cm)	PZE.103016459	3	44.13	4.87	NA	38.07	47.73	-0.45	0.09	-5.08
Longueur.Ene(cm)	PZA03360.1	3	198.45	4	0.01	191.1	203.06	-0.06	0.09	-0.69
Longueur.Ene(cm)	PZE.103175636	3	200.78	3.99	0.05	184.77	203.06	-0.08	0.09	-0.9
Longueur.Ene(cm)	PZE.104000024	4	0	3.38	0.01	0	2.8	-0.26	0.09	-2.88
Longueur.Ene(cm)	PZE.104000024	4	0	4.52	0.05	0	2.8	-0.26	0.09	-2.88
Longueur.Ene(cm)	SYN8509	4	39.77	7.05	0.01	35.86	43.47	0.49	0.09	5.55
Longueur.Ene(cm)	SYN8509	4	39.77	7.53	0.05	37.92	43.47	0.49	0.09	5.55
Longueur.Ene(cm)	PZE.104017733	4	45.5	9.19	NA	42.78	46.17	0.6	0.09	6.98
Longueur.Ene(cm)	PZE.104096885	4	104.56	4.55	NA	101.61	121.17	0.41	0.09	4.63
Longueur.Ene(cm)	PZE.104100589	4	114.79	3.22	0.01	114.79	114.79	0.37	0.09	4.22
Longueur.Ene(cm)	PZE.104100589	4	114.79	3.99	0.05	111.6	118.92	0.37	0.09	4.22
Longueur.Ene(cm)	PZE.104107792	4	129.32	3.05	0.05	129.32	129.32	0.31	0.09	3.48
Longueur.Ene(cm)	PZE.104146692	4	174.79	4.6	NA	165.25	185.94	0.42	0.09	4.75
Longueur.Ene(cm)	PZE.104150374	4	179.79	8.13	0.01	177.12	181.02	0.42	0.09	4.75
Longueur.Ene(cm)	PZE.104150374	4	179.79	7.77	0.05	174.79	181.02	0.42	0.09	4.75
Longueur.Ene(cm)	PZE.105046728	5	74.61	3.33	0.01	74.61	75.79	0.01	0.09	0.07
Longueur.Ene(cm)	PZE.105070554	5	99.97	4.97	0.05	98.84	113.05	-0.3	0.09	-3.33
Longueur.Ene(cm)	PZE.105080933	5	109.86	5.94	0.01	108.25	113.05	-0.14	0.09	-1.5
Longueur.Ene(cm)	PZE.106027935	6	19.6	6.46	0.01	11.21	22.02	0.47	0.09	5.07
Longueur.Ene(cm)	PZE.106027935	6	19.6	6.77	0.05	13.89	22.02	0.47	0.09	5.07
Longueur.Ene(cm)	PZE.106030573	6	20.85	5.13	NA	11.21	29.48	0.45	0.09	4.95
Longueur.Ene(cm)	PZE.106055794	6	60.52	3.08	NA	60.52	60.52	0.35	0.09	3.81
Longueur.Ene(cm)	PZE.106061139	6	69.95	3.62	NA	68.06	86.1	0.37	0.09	4.2
Longueur.Ene(cm)	PZE.106102395	6	110.62	4.74	0.01	106.81	112.17	0.22	0.09	2.49
Longueur.Ene(cm)	PZE.106102395	6	110.62	4.97	0.05	107.41	112.17	0.22	0.09	2.49
Longueur.Ene(cm)	PZE.107003187	7	15.56	3.65	0.01	15.56	15.56	0.07	0.09	0.8
Longueur.Ene(cm)	PZE.107003187	7	15.56	3.68	0.05	15.56	15.56	0.07	0.09	0.8
Longueur.Ene(cm)	PZE.107079545	7	100.33	3.54	0.05	100.33	100.33	-0.08	0.09	-0.84
Longueur.Ene(cm)	PZE.107104221	7	124.29	3.91	0.01	119.53	126.77	0.24	0.09	2.64
Longueur.Ene(cm)	PZE.107104221	7	124.29	3.89	0.05	119.53	126.77	0.24	0.09	2.64
Longueur.Ene(cm)	PZE.108005145	8	15.76	5.27	0.01	13.01	19.92	-0.19	0.09	-2.14
Longueur.Ene(cm)	PZE.108005145	8	15.76	5.14	0.05	13.01	19.92	-0.19	0.09	-2.14
Longueur.Ene(cm)	PZE.108009968	8	29.12	3.51	0.01	27.55	30.88	-0.15	0.09	-1.63
Longueur.Ene(cm)	PZE.108009968	8	29.12	3.28	0.05	27.55	29.12	-0.15	0.09	-1.63
Longueur.Ene(cm)	PZE.108052970	8	65.09	3.5	0.01	65.09	66.72	-0.43	0.09	-4.9
Longueur.Ene(cm)	PZE.108052970	8	65.09	4.85	NA	63.85	66.72	-0.43	0.09	-4.9
Longueur.Ene(cm)	PZE.108105561	8	110.34	4.11	0.01	108.69	111.81	0.13	0.09	1.42
Longueur.Ene(cm)	PZE.108105561	8	110.34	3.32	0.05	109.28	110.34	0.13	0.09	1.42
Longueur.Ene(cm)	SYN18196	8	144.1	11.15	0.01	141.68	145.8	0.13	0.09	1.45
Longueur.Ene(cm)	SYN18196	8	144.1	11.67	0.05	141.68	145.8	0.13	0.09	1.45
Longueur.Ene(cm)	PZE.109090188	9	110.36	3.24	0.05	107.41	110.36	0.2	0.09	2.13
Longueur.Ene(cm)	PZE.110052160	10	60.85	4.73	NA	57.75	77.82	0.44	0.09	4.99
Longueur.Ene(cm)	PZE.110106915	10	134.65	4.43	0.01	133.88	135.51	-0.11	0.09	-1.2
Longueur.Ene(cm)	PZE.110106915	10	134.65	4.43	0.05	133.88	135.51	-0.11	0.09	-1.2
Parenchyme.lignified.pse ction	PZE.101048857	1	64.45	3.52	NA	62.38	64.45	3.99	0.94	4.24
Parenchyme.lignified.pse ction	PZE.105017142	5	38.59	3.61	NA	37.48	41.58	3.92	0.94	4.19
Parenchyme.lignified.pse ction	SYNGENTA145 08	5	166.22	4.62	0.01	163.29	176.33	4.6	0.93	4.94

## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
Parenchyme.lignified.psection	SYNGENTA14508	5	166.22	3.98	0.05	163.29	176.33	4.6	0.93	4.94
Parenchyme.lignified.psection	PZE.105154210	5	170.22	4.9	NA	166.22	175.33	4.64	0.92	5.02
Parenchyme.lignified.psection	PZE.107099124	7	120.24	3.36	0.01	119.53	121.07	4.44	0.93	4.77
Parenchyme.lignified.psection	PZE.107099124	7	120.24	5.26	0.05	117.89	121.07	4.44	0.93	4.77
Parenchyme.lignified.psection	PZE.107099124	7	120.24	4.21	NA	116.58	122.27	4.44	0.93	4.77
Parenchyme.lignified.psection	PZE.110067406	10	75.42	5.17	0.01	74.35	77.82	4.58	0.92	4.97
Parenchyme.lignified.psection	PZE.110067406	10	75.42	3.92	0.05	73.28	81.48	4.58	0.92	4.97
Parenchyme.lignified.psection	PUT.163A.60352819.2700	10	77.82	5.01	NA	73.28	82.97	4.69	0.92	5.1
Parenchyme.non.lignified.psection	PZE.105017142	5	38.59	4.45	0.01	37.48	41.58	-4.63	0.92	-5.02
Parenchyme.non.lignified.psection	PZE.105017142	5	38.59	4.01	0.05	37.48	41.58	-4.63	0.92	-5.02
Parenchyme.non.lignified.psection	PZE.105017142	5	38.59	4.87	NA	37.48	41.58	-4.63	0.92	-5.02
Parenchyme.non.lignified.psection	SYN1929	5	173.5	8.09	0.01	166.22	175.33	-5.27	0.91	-5.8
Parenchyme.non.lignified.psection	SYN1929	5	173.5	5.73	NA	167.43	176.33	-5.27	0.91	-5.8
Parenchyme.non.lignified.psection	PZE.105156021	5	175.33	5.86	0.05	166.22	176.33	-4.88	0.92	-5.31
Parenchyme.non.lignified.psection	PZE.107099124	7	120.24	3.28	0.01	119.53	121.07	-4.2	0.93	-4.5
Parenchyme.non.lignified.psection	PZE.107099124	7	120.24	3.38	0.05	119.53	121.07	-4.2	0.93	-4.5
Parenchyme.non.lignified.psection	PZE.107099124	7	120.24	3.87	NA	116.58	122.82	-4.2	0.93	-4.5
Pcest.mg.gCWR	SYN23289	1	69.47	4.8	0.05	68.8	73.34	-0.11	0.14	-0.78
Pcest.mg.gCWR	PZE.101137456	1	138.98	3.85	0.01	134.61	143.09	-0.66	0.13	-5.26
Pcest.mg.gCWR	PZE.101138790	1	140.74	5.78	NA	134.61	146.57	-0.71	0.12	-5.69
Pcest.mg.gCWR	PZE.101160748	1	164.31	3.43	0.01	163.29	166	-0.58	0.13	-4.48
Pcest.mg.gCWR	PZE.102132861	2	144.8	3.15	0.01	144.8	144.8	-0.33	0.13	-2.53
Pcest.mg.gCWR	PZE.102163599	2	184.37	3.27	0.01	184.37	186.12	-0.5	0.13	-3.91
Pcest.mg.gCWR	PZE.103000505	3	0	5.72	0.01	0	8.89	0.59	0.13	4.54
Pcest.mg.gCWR	PZE.103000505	3	0	4.15	NA	0	4.39	0.59	0.13	4.54
Pcest.mg.gCWR	PZE.103094159	3	89.72	3.7	0.01	86.34	89.72	0.38	0.13	2.93
Pcest.mg.gCWR	PZE.103118101	3	124.02	4.53	0.01	119.07	127.25	-0.5	0.13	-3.88
Pcest.mg.gCWR	PZE.103118101	3	124.02	3.76	0.05	113.71	126.36	-0.5	0.13	-3.88
Pcest.mg.gCWR	PZE.103169740	3	191.1	3.08	0.01	191.1	191.1	-0.26	0.13	-1.9
Pcest.mg.gCWR	PZE.103169740	3	191.1	5.32	0.05	186.55	192.25	-0.26	0.13	-1.9
Pcest.mg.gCWR	PZE.104082177	4	84.95	4.73	0.01	79.56	88.54	0.39	0.13	2.98
Pcest.mg.gCWR	PZE.104082177	4	84.95	3.7	0.05	72.53	89.32	0.39	0.13	2.98
Pcest.mg.gCWR	PZE.104118348	4	145.58	3.63	0.05	142.02	147.21	-0.36	0.13	-2.69
Pcest.mg.gCWR	PZE.104132610	4	155.5	3.39	0.05	152.39	158.84	-0.14	0.13	-1.03
Pcest.mg.gCWR	PZE.105054383	5	79.64	6.64	0.01	78.61	82.42	0.33	0.13	2.44
Pcest.mg.gCWR	PZE.105054383	5	79.64	8.68	0.05	78.61	79.64	0.33	0.13	2.44
Pcest.mg.gCWR	PZE.105098158	5	114.76	3.98	0.01	113.05	116.04	-0.09	0.13	-0.67
Pcest.mg.gCWR	PZE.105098158	5	114.76	5.3	0.05	113.57	116.04	-0.09	0.13	-0.67
Pcest.mg.gCWR	PZE.105154210	5	170.22	3.87	0.01	168.1	170.22	-0.05	0.13	-0.35
Pcest.mg.gCWR	PZE.106012770	6	14.68	8.32	0.01	13.89	18.22	0.61	0.14	4.51
Pcest.mg.gCWR	PZE.106012770	6	14.68	9.45	0.05	12.7	17.41	0.61	0.14	4.51
Pcest.mg.gCWR	PZE.106012770	6	14.68	4.36	NA	12.7	19.6	0.61	0.14	4.51
Pcest.mg.gCWR	PZE.106048045	6	45.54	3.05	NA	45.54	45.54	0.51	0.13	3.87
Pcest.mg.gCWR	PZE.107051526	7	71.23	4.03	0.01	69.54	78.55	0.67	0.13	5.24
Pcest.mg.gCWR	PZE.107062060	7	78.55	4.61	NA	69.54	84.74	0.6	0.13	4.53
Pcest.mg.gCWR	PUT.163A.76010623.3722	8	133.82	3.48	NA	132.39	133.82	-0.58	0.13	-4.44
Pcest.mg.gCWR	PZE.109015314	9	45.22	3.29	0.01	44.25	46.22	0.54	0.13	4.03
Pcest.mg.gCWR	PZE.109015314	9	45.22	3.05	NA	45.22	45.22	0.54	0.13	4.03
Pcest.mg.gCWR	PZE.109024797	9	66.01	5.25	0.01	64.54	69.15	0.4	0.13	3.06
Pcest.mg.gCWR	PZE0003747944	9	84.84	3.14	0.01	82.32	84.84	0.4	0.13	3.03
Pcest.mg.gCWR	PZE0003747944	9	84.84	3.31	0.05	78.32	84.84	0.4	0.13	3.03

## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
Pcest.mg.gCWR	PZE.110050273	10	59.81	3.42	0.01	58.84	60.85	0.48	0.13	3.71
Pcest.mg.gCWR	PZE.110050273	10	59.81	3.45	0.05	58.84	60.85	0.48	0.13	3.71
Pcest.mg.gCWR	PZE.110074199	10	81.48	4.13	0.01	68.81	87.45	0.47	0.13	3.67
Surface.Ecorces.psection	PZE.101138790	1	140.74	3.46	0.05	138.98	140.74	0.69	0.33	2.08
Surface.Ecorces.psection	PZE.101229632	1	244.1	3.11	0.05	243.74	244.1	-0.48	0.34	-1.42
Surface.Ecorces.psection	SYN15076	2	187.96	3.06	0.05	187.96	187.96	-0.93	0.33	-2.82
Surface.Ecorces.psection	PZE.103088828	3	85.34	3.11	0.01	85.34	85.34	1.13	0.33	3.37
Surface.Ecorces.psection	PZE.109095932	9	119.8	3.35	0.01	119.8	120.83	-1.34	0.37	-3.61
Surface.tissu.dense.psection	PZE.101201482	1	214.84	3.62	0.05	210.7	215.83	0.84	0.44	1.92
Surface.tissu.dense.psection	PZE.102132861	2	144.8	3.58	0.01	143.53	146.98	-1.5	0.43	-3.49
Surface.tissu.dense.psection	PZE.102163599	2	184.37	3.21	0.01	183.1	186.12	-1.16	0.43	-2.67
Surface.tissu.dense.psection	PZE.102163599	2	184.37	4.43	0.05	177.01	187.96	-1.16	0.43	-2.67
Surface.tissu.dense.psection	PZE.103098779	3	95.45	3.28	0.05	95.45	95.45	1.26	0.43	2.91
Surface.tissu.dense.psection	PZE.109095932	9	119.8	3.43	0.01	119.8	120.83	-1.73	0.49	-3.57
Surface.tissu.dense.psection	PZE.110014712	10	39	3.26	0.05	34.68	39	-1.25	0.43	-2.88
Surface.tissu.peu.dense.psection	PZE.101201482	1	214.84	3.62	0.05	210.7	215.83	-0.84	0.44	-1.92
Surface.tissu.peu.dense.psection	PZE.102132861	2	144.8	3.58	0.01	143.53	146.98	1.5	0.43	3.49
Surface.tissu.peu.dense.psection	PZE.102163599	2	184.37	3.21	0.01	183.1	186.12	1.17	0.43	2.69
Surface.tissu.peu.dense.psection	PZE.102163599	2	184.37	4.43	0.05	177.01	187.96	1.17	0.43	2.69
Surface.tissu.peu.dense.psection	PZE.103098779	3	95.45	3.28	0.05	95.45	95.45	-1.26	0.43	-2.91
Surface.tissu.peu.dense.psection	PZE.109095932	9	119.8	3.43	0.01	119.8	120.83	1.73	0.49	3.57
Surface.tissu.peu.dense.psection	PZE.110014712	10	39	3.26	0.05	34.68	39	1.26	0.43	2.89
TB1.psection	PZE.102132861	2	144.8	3.6	NA	139.55	151.73	0.08	0.02	4.21
TB1.psection	PZE.102135758	2	149.63	4.55	0.05	147.87	158.92	0.08	0.02	4.24
TB1.psection	PZE.102144739	2	170.45	4.54	0.01	149.14	180.71	0.08	0.02	4.37
TB1.psection	PZE.102144739	2	170.45	3.69	NA	168.56	180.71	0.08	0.02	4.37
TB2.psection	PUT.163A.14895 1459.516	1	218.77	3.15	0.05	214.84	218.77	0.22	0.08	2.89
TB2.psection	PZE.101209792	1	225.11	3.18	0.01	223.82	225.11	0.23	0.08	3.06
TB2.psection	PZE.105115780	5	130.98	3.06	0.01	130.98	130.98	-0.25	0.08	-3.32
TB2.psection	PZE.105123093	5	140	4.21	0.01	137.51	155.55	-0.29	0.08	-3.8
TB2.psection	PZE.105140020	5	154.62	5.42	0.05	142.9	155.55	-0.27	0.08	-3.58
TB2.psection	PZE.108009968	8	29.12	4	0.05	25.53	30.88	0.19	0.08	2.4
TB3.psection	PZE.101003026	1	5.37	3.33	0.01	5.37	6.87	-0.1	0.02	-4.62
TB3.psection	SYN36524	1	19.66	5.11	0.01	17.19	22.89	-0.1	0.02	-4.87
TB3.psection	SYN36524	1	19.66	3.93	0.05	17.19	25.23	-0.1	0.02	-4.87
TB3.psection	SYN36524	1	19.66	5.21	NA	17.19	24.19	-0.1	0.02	-4.87
TB3.psection	PZE.108013234	8	35.31	3.36	0.01	35.31	36.13	0.09	0.02	4.03
TB3.psection	PZE.108013234	8	35.31	3.25	NA	35.31	36.13	0.09	0.02	4.03
TB3.psection	PZE.108029507	8	54.73	3.46	0.05	52.98	55.96	0.11	0.02	5.26
TB3.psection	PZE.108058477	8	69.92	5.99	0.01	53.71	75.64	0.11	0.02	5.42
TB3.psection	PZE.108058477	8	69.92	5.19	0.05	69.08	75.64	0.11	0.02	5.42
TB3.psection	PZE.108058477	8	69.92	5.74	NA	52.98	82.28	0.11	0.02	5.42
TB3.psection	PZE.108131748	8	156.6	3.08	0.05	156.6	156.6	-0.09	0.02	-4.15
TB4.psection	SYN36645	2	120.21	4.64	0.01	116.98	125.83	0.07	0.01	5.1
TB4.psection	SYN36645	2	120.21	4.64	0.05	116.98	125.83	0.07	0.01	5.1
TB4.psection	PZE.102118717	2	124.73	5.22	NA	118.68	149.63	0.07	0.01	5.05
TB4.psection	PZE.102135758	2	149.63	3.32	0.01	149.14	151.73	0.06	0.01	4.64
TB4.psection	PZE.102135758	2	149.63	3.32	0.05	149.14	151.73	0.06	0.01	4.64
TB4.psection	PUT.163A.28982 637.1670	2	174.97	3.67	0.01	168.56	184.37	0.05	0.01	4.13
TB4.psection	PUT.163A.28982 637.1670	2	174.97	3.67	0.05	168.56	184.37	0.05	0.01	4.13
TB4.psection	PUT.163A.28982 637.1670	2	174.97	3.56	NA	170.45	180.71	0.05	0.01	4.13

## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
TB4.psection	PZE.103024938	3	55.11	3.06	NA	55.11	55.11	0.05	0.01	3.99
TB4.psection	PZE.103115629	3	120.14	3.43	NA	119.07	120.14	0.06	0.01	4.15
TB4.psection	PZE.106083170	6	89.68	5.01	0.01	88.35	94.79	-0.04	0.01	-3.11
TB4.psection	PZE.106083170	6	89.68	5.01	0.05	88.35	94.79	-0.04	0.01	-3.11
TB4.psection	PZE.109019686	9	55.21	6.79	0.01	53.85	55.21	-0.07	0.01	-5.06
TB4.psection	PZE.109019686	9	55.21	6.79	0.05	53.85	55.21	-0.07	0.01	-5.06
TB4.psection	PZE.109019686	9	55.21	4.81	NA	53.85	64.54	-0.07	0.01	-5.06
TB5.psection	PZE.101048857	1	64.45	3.2	0.01	63.94	64.45	-0.04	0.01	-4.26
TB5.psection	PZE.101048857	1	64.45	3.5	NA	63.94	64.45	-0.04	0.01	-4.26
TE1.psection	PZE.101178511	1	181.41	5.74	0.01	169.94	189.31	0.03	0.02	1.67
TE1.psection	PZE.102170920	2	195.46	3.07	0.01	195.46	195.46	-0.04	0.02	-2.05
TE1.psection	SYN37221	2	230.23	3.6	0.05	229.54	234	0.02	0.02	1.22
TE1.psection	PZE.104094616	4	100.09	3.39	0.05	100.09	104.56	0.06	0.02	3.37
TE1.psection	PZE.105075527	5	104.88	4.01	0.01	103.29	110.45	-0.07	0.02	-3.77
TE1.psection	PZE.105075673	5	105.28	4.49	0.05	103.29	126.27	-0.07	0.02	-3.78
TE1.psection	PZE.106047388	6	44.64	5.36	0.01	33.15	46.84	0.06	0.02	3.61
TE1.psection	PZE.106097584	6	104.23	3.9	0.05	101.61	107.41	0.08	0.02	4.66
TE1.psection	PZE.106100504	6	105.82	6.05	0.01	103.16	110.62	0.08	0.02	4.63
TE1.psection	PZE.106100504	6	105.82	4.31	NA	100.62	118.71	0.08	0.02	4.63
TE1.psection	PZE.106120075	6	140.72	3.4	NA	128.8	142.25	0.07	0.02	4.1
TE1.psection	SYN35907	7	110.19	7.85	0.01	108.12	111.07	0.08	0.02	4.76
TE1.psection	SYN35907	7	110.19	4.84	0.05	82.72	111.07	0.08	0.02	4.76
TE1.psection	SYN35907	7	110.19	4.42	NA	108.12	122.82	0.08	0.02	4.76
TE2.psection	SYN23289	1	69.47	3.27	0.01	68.8	70.87	-0.07	0.02	-3.34
TE2.psection	SYN23289	1	69.47	3.76	0.05	68.8	70.87	-0.07	0.02	-3.34
TE2.psection	PZE.102170920	2	195.46	3.91	0.05	191.81	200.05	-0.06	0.02	-2.63
TE2.psection	PZE.103111225	3	115.2	3.19	0.05	114.63	115.2	-0.06	0.02	-2.69
TE2.psection	PZE.108005145	8	15.76	4.07	0.05	10.77	20.73	0.06	0.02	2.66
TM1.psection	PZE.101048857	1	64.45	4.26	0.01	60.85	69.47	2.04	0.49	4.16
TM1.psection	PZE.101048857	1	64.45	3.36	NA	63.94	64.45	2.04	0.49	4.16
TM1.psection	PZE.101134573	1	134.61	3.08	0.05	134.61	134.61	-0.81	0.5	-1.61
TM1.psection	PZE.103020274	3	50.92	3.19	0.05	49.34	50.92	-1.65	0.5	-3.29
TM1.psection	SYNGENTA14508	5	166.22	3.14	0.01	166.22	167.43	2.23	0.49	4.58
TM1.psection	PZE.105154210	5	170.22	3.91	NA	166.22	173.5	2.17	0.49	4.46
TM1.psection	PZE.107099124	7	120.24	3.46	0.05	117.89	122.27	2.02	0.49	4.13
TM1.psection	PZE.107099124	7	120.24	3.2	NA	119.53	120.24	2.02	0.49	4.13
TM1.psection	PZE.109095932	9	119.8	3.42	0.05	119.8	122.77	1.81	0.56	3.23
TM1.psection	PZE.109096501	9	120.83	3.51	0.01	119.8	124.7	1.83	0.57	3.2
TM1.psection	PZE.110067406	10	75.42	9.32	0.01	74.35	77.82	2.69	0.47	5.68
TM1.psection	PZE.110067406	10	75.42	4.09	0.05	72.7	81.48	2.69	0.47	5.68
TM1.psection	PZE.110067406	10	75.42	6.31	NA	73.28	81.48	2.69	0.47	5.68
TM1a.psection	PZE.101134573	1	134.61	3.1	0.05	134.61	134.61	-0.27	0.34	-0.79
TM1a.psection	SYN36645	2	120.21	3.6	0.05	118.68	121.37	0.61	0.34	1.79
TM1a.psection	PZE.105156021	5	175.33	3.15	0.05	175.33	175.33	1.21	0.33	3.64
TM1a.psection	PZA.000655001	7	105.32	5.62	0.01	102.04	111.07	1.73	0.32	5.35
TM1a.psection	PZA.000655001	7	105.32	5.19	NA	101.41	110.19	1.73	0.32	5.35
TM1a.psection	SYN35907	7	110.19	5.58	0.05	105.32	111.54	1.59	0.32	4.89
TM1a.psection	PUT.163A.60338736.2369	7	119.53	3.28	0.05	117.89	120.24	1.03	0.33	3.1
TM1a.psection	PUT.163A.60352819.2700	10	77.82	4.42	NA	72.7	83.66	1.54	0.32	4.73
TM1a.psection	PZE.110074199	10	81.48	4.94	0.01	74.35	85.65	1.46	0.33	4.46
TM1a.psection	PZE.110074199	10	81.48	3.41	0.05	81.48	85.65	1.46	0.33	4.47
TM1b.psection	PZE.101048857	1	64.45	3.38	NA	62.38	64.45	1.53	0.37	4.1
TM1b.psection	PZE.101224367	1	240.38	3.07	0.01	240.38	240.38	1.08	0.38	2.83
TM1b.psection	PZE.101224367	1	240.38	3.07	0.05	240.38	240.38	1.08	0.38	2.83
TM1b.psection	PZE.104132531	3	49.34	6.43	NA	47.73	50.92	-2.09	0.37	-5.71
TM1b.psection	SYN8509	4	39.77	3.97	NA	32.9	43.47	1.64	0.37	4.44
TM1b.psection	PZE.108131748	8	156.6	3.44	0.01	156.6	161.41	0.89	0.38	2.34
TM1b.psection	PZE.108131748	8	156.6	3.44	0.05	156.6	161.41	0.89	0.38	2.34
TM1b.psection	PUT.163A.60357079.2822	9	131.23	3.52	0.01	127.16	138.35	1.31	0.43	3.08
TM1b.psection	PUT.163A.60357079.2822	9	131.23	3.52	0.05	127.16	138.35	1.31	0.43	3.08
TM1b.psection	PZE.110014712	10	39	5.89	0.01	29.71	44.95	1.45	0.37	3.9
TM1b.psection	PZE.110014712	10	39	5.89	0.05	29.71	44.95	1.45	0.37	3.89
TM1b.psection	PZE.110015435	10	41.54	3.16	NA	39	42.8	1.44	0.37	3.85
TM1b.psection	PZE.110044817	10	55.12	3.34	0.01	51.82	59.81	1.05	0.38	2.8

## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
TM1b.psection	PZE.110044817	10	55.12	3.34	0.05	51.82	59.81	1.05	0.38	2.8
TM2.psection	PZE.105017202	5	37.48	3.95	0.01	33.78	41.58	-2.76	0.56	-4.92
TM2.psection	PZE.105017142	5	38.59	3.54	0.05	37.48	40.99	-2.76	0.56	-4.91
TM2.psection	PZE.105017142	5	38.59	4.32	NA	33.78	41.58	-2.76	0.56	-4.91
TM2.psection	PZE.105121802	5	137.51	3.31	0.01	137.51	140	0.63	0.59	1.08
TM2.psection	PZE.105121802	5	137.51	3.12	0.05	137.51	137.51	0.63	0.59	1.08
TM2.psection	PZE.105154210	5	170.22	8.05	0.01	169.3	175.33	-2.35	0.57	-4.12
TM2.psection	PZE.105154210	5	170.22	7.39	0.05	169.3	175.33	-2.35	0.57	-4.12
TM2.psection	PZE.105156021	5	175.33	4.08	NA	169.3	176.33	-2.53	0.57	-4.46
TM2.psection	PZE.107074405	7	94.77	3.94	0.01	92.35	96.81	-2.41	0.58	-4.16
TM2.psection	PZE.107074405	7	94.77	3.5	NA	93.6	96.81	-2.41	0.58	-4.16
TM2.psection	PZE.108005145	8	15.76	3.34	0.01	15.76	17.07	-1.92	0.58	-3.33
TM2.psection	PZE.108013234	8	35.31	4	0.01	33.3	40.05	-1.89	0.58	-3.26
TM2a.psection	PZE.102080371	2	110.43	4.28	0.01	92.56	115.19	-0.61	0.18	-3.45
TM2a.psection	PZE.102101817	2	114.72	6.14	0.05	101.2	116.13	-0.52	0.17	-3.02
TM2a.psection	SYN8509	4	39.77	3.05	0.01	39.77	39.77	0.49	0.17	2.88
TM2a.psection	SYN8509	4	39.77	3.09	0.05	39.77	39.77	0.49	0.17	2.88
TM2a.psection	PZE.107074405	7	94.77	5.11	0.05	89.39	96.81	-0.6	0.17	-3.54
TM2a.psection	PZE.107075781	7	95.56	5.65	0.01	89.81	110.19	-0.63	0.17	-3.69
TM2a.psection	SYN22160	7	108.12	3.12	0.05	108.12	110.19	-0.5	0.17	-2.95
TM2a.psection	SYNGENTA16977	8	10.77	4.14	0.01	8.28	13.01	-0.78	0.16	-4.72
TM2a.psection	SYNGENTA16977	8	10.77	4.37	0.05	8.28	13.01	-0.78	0.16	-4.72
TM2a.psection	SYNGENTA16977	8	10.77	4.14	NA	8.28	13.01	-0.78	0.16	-4.72
TM2b.psection	PZE.105017142	5	38.59	5	0.01	37.48	41.58	-2.36	0.49	-4.86
TM2b.psection	PZE.105017142	5	38.59	4.7	0.05	37.48	41.58	-2.36	0.49	-4.86
TM2b.psection	PZE.105017142	5	38.59	4.36	NA	33.78	41.58	-2.36	0.49	-4.86
TM2b.psection	PZE.105121802	5	137.51	3.07	0.01	137.51	137.51	0.42	0.51	0.83
TM2b.psection	PZE.105154210	5	170.22	7.82	0.01	169.3	175.33	-2.2	0.49	-4.49
TM2b.psection	SYN1929	5	173.5	7.35	0.05	169.3	175.33	-2.44	0.48	-5.04
TM2b.psection	SYN1929	5	173.5	4.34	NA	167.43	176.33	-2.44	0.48	-5.04
TM2b.psection	PUT.163A.60338736.2369	7	119.53	3.11	0.01	119.53	120.24	-2.06	0.49	-4.19
TM2b.psection	PZE.107099124	7	120.24	3.57	0.05	116.58	123.74	-2	0.49	-4.04
TM2b.psection	PZE.107099124	7	120.24	3.41	NA	117.89	121.07	-2	0.49	-4.04
TM2b.psection	PZE.109121844	9	166.15	3.06	0.01	166.15	166.15	-2.03	0.51	-4.02
TM2b.psection	PZE.109121844	9	166.15	3.34	NA	166.15	166.15	-2.03	0.51	-4.02
TM3.psection	PZE.108009968	8	29.12	3.33	0.05	25.53	29.12	-0.02	0.01	-3.52
TM4.psection	PZE.101036318	1	50.14	3.8	NA	47.91	53.95	2.21	0.5	4.39
TM4.psection	PZE.103154277	3	171.81	4.05	0.01	162.1	175.45	1.09	0.55	1.98
TM4.psection	PZE.103154277	3	171.81	4.05	0.05	162.1	175.45	1.09	0.55	1.98
TM4.psection	PZE.105017142	5	38.59	3.36	0.01	37.48	40.99	2.42	0.5	4.85
TM4.psection	PZE.105017142	5	38.59	3.36	0.05	37.48	40.99	2.42	0.5	4.85
TM4.psection	PZE.105017142	5	38.59	4.52	NA	33.78	41.58	2.42	0.5	4.85
TM4.psection	SYNGENTA14508	5	166.22	6	0.01	162.51	176.33	2.36	0.5	4.69
TM4.psection	SYNGENTA14508	5	166.22	6	0.05	162.51	176.33	2.36	0.5	4.69
TM4.psection	SYN1929	5	173.5	4.92	NA	166.22	176.33	2.44	0.5	4.89
TM4.psection	PUT.163A.60338736.2369	7	119.53	6.73	0.01	116.58	121.07	2.2	0.5	4.36
TM4.psection	PUT.163A.60338736.2369	7	119.53	6.73	0.05	116.58	121.07	2.2	0.5	4.36
TM4.psection	PZE.107099124	7	120.24	4.29	NA	117.89	122.27	2.41	0.5	4.82
TM4.psection	PZE.110067406	10	75.42	3.81	0.01	74.35	77.82	1.89	0.51	3.72
TM4.psection	PZE.110067406	10	75.42	3.81	0.05	74.35	77.82	1.89	0.51	3.72
TM4a.psection	PZE.101009163	1	17.19	3.3	0.05	12.66	17.95	-1.05	0.46	-2.27
TM4a.psection	SYN6208	1	25.23	3.49	0.01	17.19	26.52	-1.14	0.46	-2.45
TM4a.psection	SYN6208	1	25.23	3.67	0.05	22.47	26.52	-1.14	0.46	-2.45
TM4a.psection	ZM013858.0408	3	163.29	4.08	0.01	162.1	172.66	1.43	0.48	2.97
TM4a.psection	PZE.103154277	3	171.81	4.25	0.05	163.29	175.45	0.97	0.49	1.96
TM4a.psection	PZE.105018063	5	40.99	3.13	NA	38.59	40.99	1.81	0.45	3.99
TM4a.psection	PZE.105156021	5	175.33	5.02	0.01	169.3	176.33	2.07	0.45	4.59
TM4a.psection	PZE.105156021	5	175.33	5.5	0.05	169.3	179	2.07	0.45	4.59
TM4a.psection	PZE.105156021	5	175.33	3.95	NA	173.5	177.73	2.07	0.45	4.59
TM4a.psection	SYN35907	7	110.19	6.78	0.01	108.12	120.24	1.8	0.46	3.95
TM4a.psection	SYN35907	7	110.19	7.59	0.05	108.12	113.12	1.8	0.46	3.95



## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
TM4a.psection	SYN35907	7	110.19	3.11	NA	110.19	110.19	1.8	0.46	3.95
TM4b.psection	PZE.101040607	1	56.78	3.89	NA	52.81	64.45	1.15	0.27	4.3
TM4b.psection	PZE.101045001	1	59.46	4.96	0.01	56.78	62.38	1.18	0.27	4.39
TM4b.psection	PZE.101045001	1	59.46	3.24	0.05	58.69	60.85	1.18	0.27	4.39
TM4b.psection	PZE.104132531	3	49.34	4.18	0.01	47.73	51.67	-1.48	0.27	-5.55
TM4b.psection	PZE.104132531	3	49.34	5.91	NA	47.73	50.92	-1.48	0.27	-5.55
TM4b.psection	SYN8509	4	39.77	3.69	NA	35.86	43.47	1.15	0.27	4.25
TM4b.psection	PZE.105146867	5	163.84	3.44	0.01	162.51	166.22	0.67	0.28	2.41
TM4b.psection	PZE.107057158	7	75.1	3.13	0.05	75.1	75.73	-0.81	0.28	-2.89
TM4b.psection	PZE.107066081	7	84.74	3.15	0.05	84.04	87.82	-0.6	0.28	-2.12
TM4b.psection	PZE.107079545	7	100.33	4.89	0.01	86.69	101.41	-0.52	0.28	-1.84
TM4b.psection	PUT.163A.14894 9777.506	7	125.47	3.37	0.05	121.07	128.56	0.61	0.28	2.16
TM4b.psection	PZE.109108323	9	138.35	5.36	0.01	131.23	140.43	1.53	0.29	5.33
TM4b.psection	PZE.109108323	9	138.35	6.23	0.05	119.8	140.43	1.53	0.29	5.33
TM4b.psection	PZE.109108323	9	138.35	4.04	NA	127.16	142.12	1.53	0.29	5.33
TM5.psection	PZE.101048857	1	64.45	3.4	NA	63.94	64.45	-2.46	0.58	-4.26
TM5.psection	PZE.101134573	1	134.61	3.38	0.05	133.66	134.61	0.86	0.59	1.45
TM5.psection	SYNGENTA145 08	5	166.22	5.55	0.01	162.51	173.5	-2.61	0.58	-4.52
TM5.psection	PZE.105154210	5	170.22	4.01	NA	163.84	176.33	-2.59	0.57	-4.51
TM5.psection	PZE.109096501	9	120.83	3.34	0.05	119.8	125.21	-1.24	0.69	-1.81
TM5.psection	PZE.110067406	10	75.42	3.96	0.01	72.7	77.82	-2.52	0.57	-4.39
TM5.psection	PZE.110067406	10	75.42	4.01	0.05	72.7	84.68	-2.52	0.57	-4.39
TM5.psection	PZE.110067406	10	75.42	4.1	NA	71.89	81.48	-2.52	0.57	-4.39
TM5a.psection	PZE.101003026	1	5.37	4.62	0.01	5.37	12.66	0.54	0.14	3.82
TM5a.psection	PZE.101003026	1	5.37	4.62	0.05	5.37	12.66	0.54	0.14	3.82
TM5a.psection	PZE.102040312	2	64.35	3.36	NA	61.06	70.59	-0.59	0.15	-4.07
TM5a.psection	PZE.102043421	2	70.59	5.36	0.01	61.06	92.56	-0.57	0.15	-3.81
TM5a.psection	PZE.102043421	2	70.59	5.36	0.05	61.06	92.56	-0.57	0.15	-3.81
TM5a.psection	PZA02365.7	7	90.46	3.93	0.01	87.45	103.59	-0.47	0.15	-3.21
TM5a.psection	PZA02365.7	7	90.46	3.93	0.05	87.45	103.59	-0.47	0.15	-3.21
TM5b.psection	PZE.101048857	1	64.45	4.54	0.01	57.97	64.45	-2.81	0.55	-5.06
TM5b.psection	PZE.101048857	1	64.45	4.29	0.05	59.46	64.45	-2.81	0.55	-5.06
TM5b.psection	PZE.101048857	1	64.45	4.73	NA	60.85	64.45	-2.81	0.55	-5.06
TM5b.psection	PZE.102033041	2	54.19	4.18	0.01	49.18	56.65	2	0.58	3.42
TM5b.psection	PZE.102034918	2	55.38	3.15	0.05	54.19	55.38	2.08	0.58	3.57
TM5b.psection	PZE.104011522	4	30.57	3.1	NA	30.57	31.73	-2.3	0.56	-4.1
TM5b.psection	SYNGENTA145 08	5	166.22	7.77	0.01	163.29	169.3	-2.89	0.55	-5.22
TM5b.psection	SYNGENTA145 08	5	166.22	5.18	0.05	163.29	170.22	-2.89	0.55	-5.22
TM5b.psection	SYN14992	5	169.3	4.61	NA	163.84	173.5	-2.66	0.55	-4.8
TM5b.psection	PZE.106000060	6	0	3.22	NA	0	0.48	-2.23	0.56	-3.96
TM5b.psection	PZE.107069959	7	89.81	5.83	0.05	86.69	91.74	0.83	0.59	1.4
TM5b.psection	PZE.108058477	8	69.92	3.42	0.05	69.08	75.64	0.86	0.58	1.48
TM5b.psection	PZE.109096501	9	120.83	4.67	0.05	119.8	133.08	-1.46	0.66	-2.19
TM5b.psection	PZE.109100121	9	125.21	3.14	0.01	124.7	127.63	-2.08	0.68	-3.04
TM5b.psection	PZE.110067406	10	75.42	3.57	0.01	73.28	76.05	-2.31	0.56	-4.11
TM5b.psection	PZE.110067406	10	75.42	4.33	0.05	72.7	84.68	-2.31	0.56	-4.11
TM5b.psection	PZE.110067406	10	75.42	3.6	NA	72.7	81.48	-2.31	0.56	-4.11
TM8.psection	PUT.163A.71767 261.3524	10	35.3	3.71	0.01	33.37	39	-0.07	0.02	-3.87
TM8.psection	PUT.163A.71767 261.3524	10	35.3	3.7	0.05	33.37	39	-0.07	0.02	-3.87
TM8.psection	PUT.163A.71767 261.3524	10	35.3	3.05	NA	35.3	35.3	-0.07	0.02	-3.87
TRD1.psection	PZE.101120125	1	95.26	4.56	0.01	89.31	114.52	0	0	-3.23
TRD1.psection	PZE.101197402	1	207.82	3.92	0.05	198.7	225.11	0	0	2.28
TRD1.psection	PZE.101209792	1	225.11	3.35	0.01	222.2	225.11	0	0	1.85
TRD1.psection	PZE.104096885	4	104.56	4.49	0.01	100.98	107.54	0	0	3.91
TRD1.psection	PZE.104096885	4	104.56	3.57	0.05	100.98	107.54	0	0	3.91
TRD1.psection	PZE.104097424	4	105.87	3.1	NA	104.56	105.87	0	0	4.03
TRD1.psection	PZE.105129479	5	145.51	3.67	0.01	142.9	147.19	0	0	-4.06
TRD1.psection	PZE.105129479	5	145.51	4.08	0.05	141.19	150.89	0	0	-4.06
TRD1.psection	PZE.105129479	5	145.51	3.3	NA	145.51	145.51	0	0	-4.06
TRD2.psection	PZE.102138112	2	156	3.44	0.05	154.22	165.95	0	0	-3.7
TRD2.psection	PZE.102158439	2	179.97	3.49	0.01	178.43	183.1	0	0	-3.94
TRD2.psection	PZE.102158439	2	179.97	3.77	0.05	177.01	181.58	0	0	-3.94





## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
TRD2.psection	PZE.102158439	2	179.97	3.19	NA	179.97	179.97	0	0	-3.94
TRD3.psection	SYN38137	2	30.09	3.72	0.01	27.03	42.32	-0.09	0.03	-2.91
TRD3.psection	PZE.102019019	2	33.11	4.72	0.05	27.03	46.38	-0.08	0.03	-2.36
TRD3.psection	PZE.102140935	2	162.79	4.36	0.01	154.22	171.5	-0.11	0.03	-3.3
TRD3.psection	PZE.102142638	2	165.95	3.23	0.05	162.79	167.55	-0.09	0.03	-2.84
TRD3.psection	PZE.102158439	2	179.97	4.6	0.01	177.01	187.96	-0.11	0.03	-3.62
TRD3.psection	PZE.103098779	3	95.45	5.18	0.01	93.1	100.07	0.12	0.03	3.98
TRD3.psection	PZE.103098779	3	95.45	3.17	0.05	95.45	95.45	0.12	0.03	3.98
TRD3.psection	PZE.103098779	3	95.45	3.13	NA	95.45	95.45	0.12	0.03	3.98
TRD3.psection	PZE.105123093	5	140	4.47	0.05	137.51	147.19	-0.08	0.03	-2.41
TRD3.psection	PZE.107074405	7	94.77	3.91	0.05	92.91	98.37	0.08	0.03	2.41
TRD3.psection	PUT.163A.71767 261.3524	10	35.3	3.74	0.01	33.37	39	-0.12	0.03	-3.91
TRD3.psection	PUT.163A.71767 261.3524	10	35.3	3.14	NA	34.68	37.49	-0.12	0.03	-3.91
TRD6.psection	PZE.102158439	2	179.97	3.51	0.01	170.45	184.37	-0.55	0.21	-2.66
TRD6.psection	PZE.102158439	2	179.97	3.37	0.05	178.43	184.37	-0.55	0.21	-2.66
TRD6.psection	PZE.105098158	5	114.76	3.35	0.01	114.2	115.17	0.26	0.21	1.24
TRD6.psection	PZE.110014712	10	39	3.83	0.01	29.71	41.54	-0.63	0.21	-3.09
TRD6.psection	PZE.110014712	10	39	3.41	0.05	33.89	39	-0.64	0.21	-3.12
TRD7.psection	PZE.101048857	1	64.45	3.09	0.01	62.38	64.45	-0.48	0.14	-3.47
TRD7.psection	PZE.101087443	1	105.18	3.15	0.05	105.18	105.73	-0.33	0.14	-2.32
TRD7.psection	PZE.109019686	9	55.21	3.22	0.05	53.85	55.21	0.41	0.14	2.99
TRD8.psection	PZE.102023677	2	42.32	3.64	0.05	39.3	46.38	-0.03	0.03	-1.11
TRD8.psection	PZE.102043421	2	70.59	4.74	0.05	70.59	75.02	0.07	0.03	2.81
TRD8.psection	PUT.163A.60343 349.2488	2	94.95	3.22	0.01	94.95	94.95	0.09	0.03	3.41
TRD8.psection	PUT.163A.60343 349.2488	2	94.95	4.37	0.05	88.81	94.95	0.09	0.03	3.41
TRD9.psection	PZE.101201482	1	214.84	4.08	0.05	210.7	218.77	0.09	0.03	2.69
TRD9.psection	PUT.163A.14895 1459.516	1	218.77	4.04	0.01	212.89	222.2	0.11	0.03	3.18
TRD9.psection	PZE.102165328	2	186.12	6.37	0.05	176.37	187.96	-0.11	0.03	-3.18
TRD9.psection	SYN15076	2	187.96	4.37	0.01	178.43	192.58	-0.13	0.03	-3.78
TRD9.psection	PZE.103098779	3	95.45	3.26	0.05	95.45	95.45	0.07	0.03	2.04
TRD9.psection	PZE.106083170	6	89.68	4.81	0.01	88.35	96.65	0.12	0.03	3.42
TRD9.psection	PZE.106102395	6	110.62	3.81	0.01	105.82	112.17	0.11	0.03	3.3
TRD9.psection	PZE.106102395	6	110.62	3.8	0.05	89.68	121.17	0.11	0.03	3.3
TRD9.psection	PZE.109095932	9	119.8	3.3	NA	119.8	123.34	-0.16	0.04	-4.13
TRD9.psection	PZE.109099586	9	124.7	4.76	0.01	119.8	127.63	-0.15	0.04	-3.78
TRD9.psection	PZE.110100195	10	120.38	3.66	0.01	118.99	120.77	-0.12	0.03	-3.59
TRL2.psection	PZA00237.6	2	25.44	3.07	0.01	25.44	25.44	0	0	2.61
TRL2.psection	PZA00237.6	2	25.44	3.56	0.05	23.77	27.9	0	0	2.62
TRL2.psection	PZE.102135758	2	149.63	4.22	0.05	146.98	156	0	0	2.65
TRL2.psection	PZE.102136218	2	151.73	3.68	0.01	147.87	156	0	0	2.3
TRL2.psection	PZE.102175641	2	204.58	3.29	0.01	202.49	205.21	0	0	-2.01
TRL2.psection	PZE.102175641	2	204.58	4.95	0.05	200.05	207.36	0	0	-2.01
TRL2.psection	PZE.107074405	7	94.77	3.75	0.05	92.91	98.37	0	0	-3.56
TRL2.psection	PZE.107075781	7	95.56	3.09	0.01	94.77	95.93	0	0	-3.68
TRL4.psection	PZE.101120125	1	95.26	3.05	0.05	95.26	95.26	0.25	0.12	2.13
TRL4.psection	PZE.101087443	1	105.18	3.05	0.05	105.18	105.18	0.41	0.12	3.53
TRL4.psection	PZA00237.6	2	25.44	4.91	0.05	23.77	31.08	0.29	0.12	2.52
TRL4.psection	SYN38137	2	30.09	3.13	0.01	29.53	30.09	0.31	0.12	2.7
TRL4.psection	PZE.102135758	2	149.63	3.78	0.01	147.87	154.22	0.42	0.11	3.73
TRL4.psection	PZE.102137410	2	154.22	4.11	0.05	148.35	165.95	0.35	0.11	3.01
TRL4.psection	PZA03293.2	2	200.05	3.2	0.05	200.05	200.05	0	0.12	0.01
TRL4.psection	PUT.163A.60348 955.2602	5	59.71	3.15	0.05	59.34	59.71	-0.16	0.12	-1.35
TRL4.psection	PZE.105054383	5	79.64	3.47	0.05	74.61	79.64	-0.22	0.12	-1.83
TRL4.psection	PZE.105129479	5	145.51	5.2	0.05	142.9	154.62	0.36	0.11	3.12
TRL4.psection	PZE.105133673	5	150.43	3.54	0.01	147.19	154.62	0.43	0.11	3.8
TRL4.psection	PZE.107083382	7	104.8	3.18	0.05	104.8	105.32	-0.14	0.12	-1.19
TRL5.psection	SYN6208	1	25.23	4.93	0.01	22.89	31.2	0.03	0.01	2.88
TRL5.psection	SYN6208	1	25.23	4.78	0.05	24.19	31.61	0.03	0.01	2.88
TRL5.psection	PZE.101087443	1	105.18	5.39	0.01	100.18	107.26	0.04	0.01	3.52
TRL5.psection	PZE.101087443	1	105.18	5.14	0.05	98.57	110.17	0.04	0.01	3.52
TRL5.psection	PZE.102130219	2	139.95	3.21	0.01	139.55	139.95	0.02	0.01	1.56
TRL5.psection	PZE.102135758	2	149.63	4.62	0.01	148.35	156	0.03	0.01	2.91
TRL5.psection	PZE.102135758	2	149.63	5.26	0.05	138.6	154.22	0.03	0.01	2.91



## Annexes

Caractères	Marqueurs	Chr	Genetics Position (cM)	LOD	Cofacteurs	Début	Fin	Effet estimé	SE	t
TRL5.psection	PZE.104036198	4	59.82	4.04	0.01	57.79	60.92	0.01	0.01	1.18
TRL5.psection	PZE.104036198	4	59.82	4.05	0.05	58.68	60.92	0.01	0.01	1.18
TRL5.psection	PZE.104096885	4	104.56	3.68	0.05	103.17	106.4	-0.02	0.01	-1.53
TRL5.psection	PUT.163A.31441 039.1952	4	181.02	3.54	0.05	178.57	185.94	0.02	0.01	1.41
TRL5.psection	SYN18496	7	30.09	4.23	0.01	23.51	32.02	-0.03	0.01	-2.4
TRL5.psection	SYN18496	7	30.09	6.2	0.05	27.44	32.02	-0.03	0.01	-2.4
TRL5.psection	PZE.108097730	8	100.4	3.57	0.05	96.95	101.96	-0.02	0.01	-1.92
TRL6.psection	SYN18170	8	25.53	3.49	0.01	15.76	27.55	0	0	4.34
TRL6.psection	SYN18170	8	25.53	3.49	0.05	15.76	27.55	0	0	4.34
TRL6.psection	SYN18170	8	25.53	3.55	NA	15.76	27.55	0	0	4.34
TRL7.psection	PZE.108009968	8	29.12	3.38	0.01	25.53	29.12	0.01	0	3.9
TRL7.psection	PZE.108009968	8	29.12	3.32	0.05	25.53	29.12	0.01	0	3.9
TRL7.psection	PZE.110056957	10	64.51	3.26	0.05	57.75	64.51	0.01	0	3.28

Annexe 8 : Traces LOD des QTLs des caractères agronomiques.

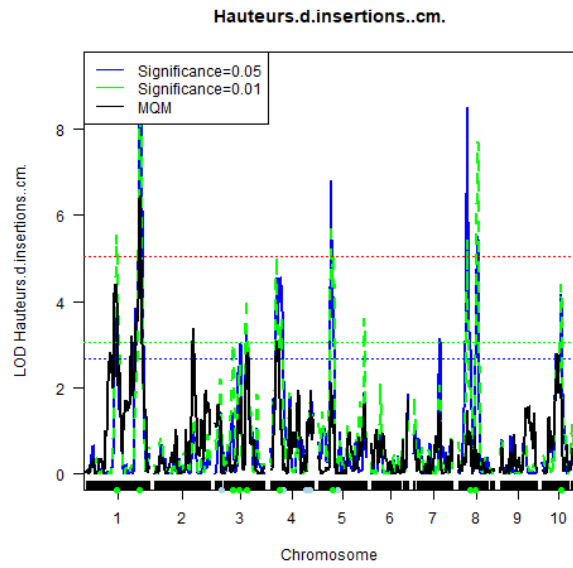
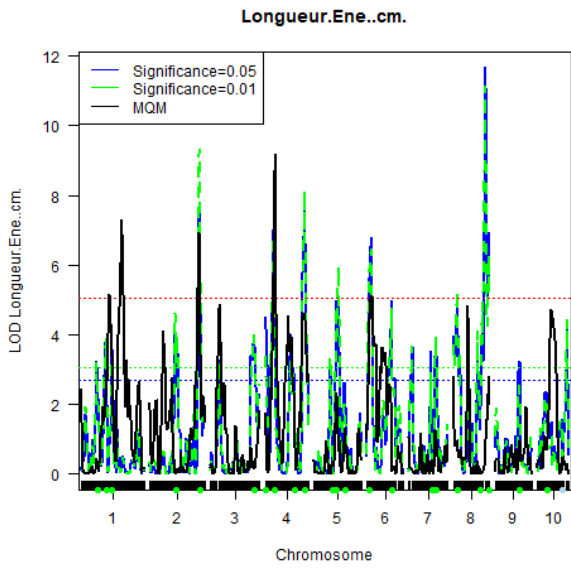
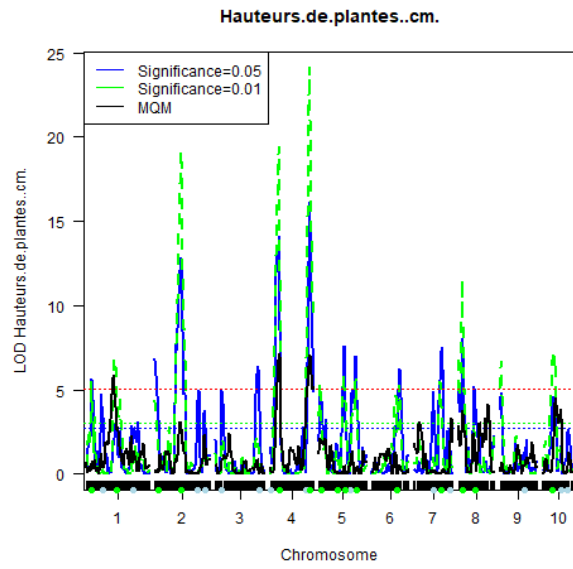
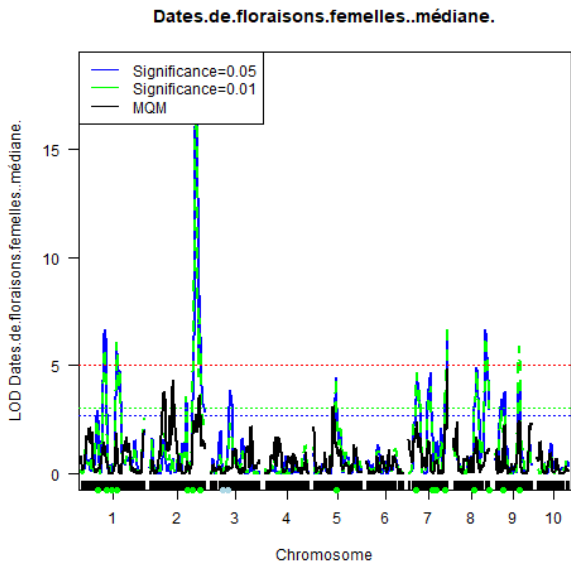


Figure 3 : Traces LOD des QTLs des digestibilités et des caractères biochimique de la paroi.

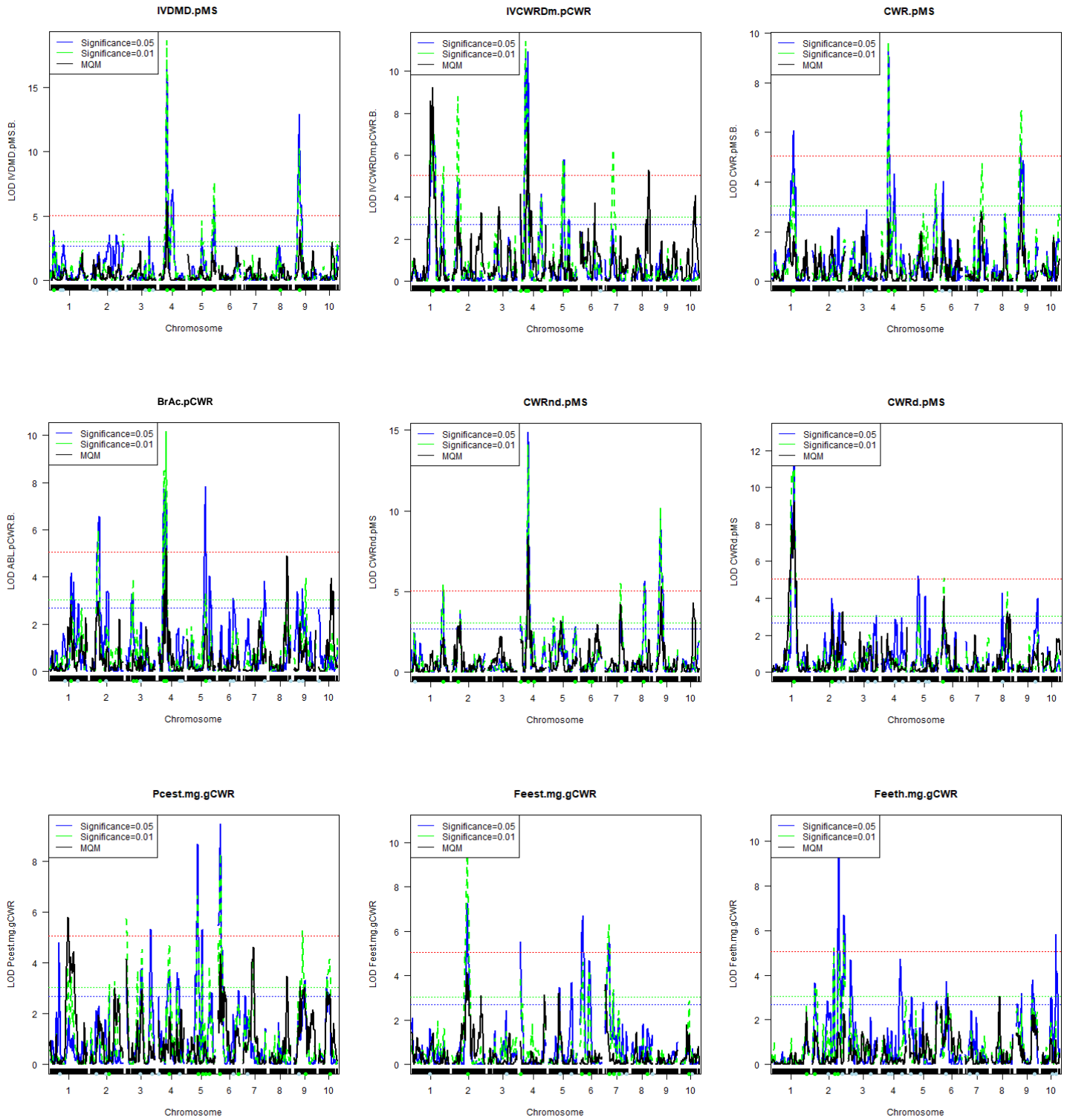
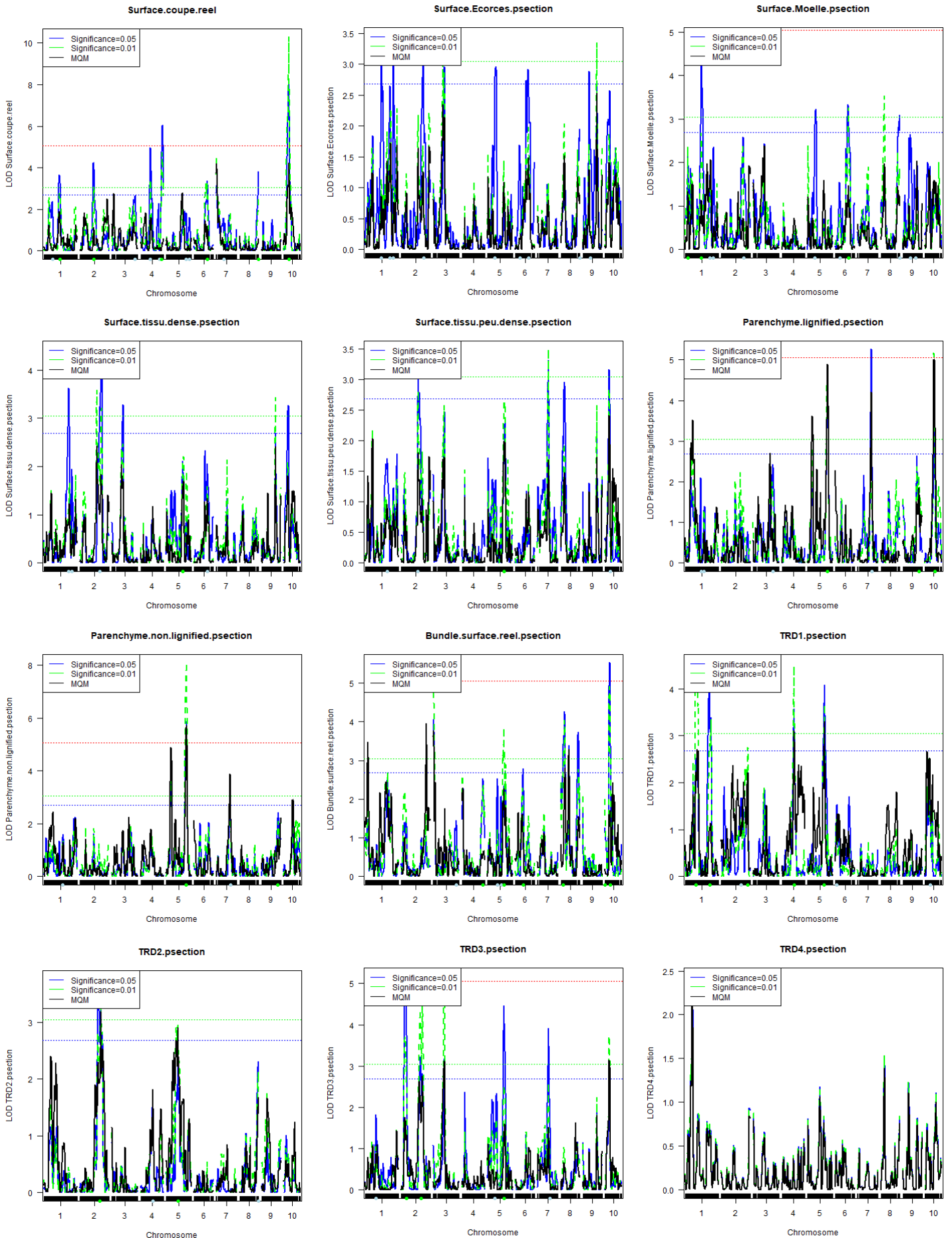
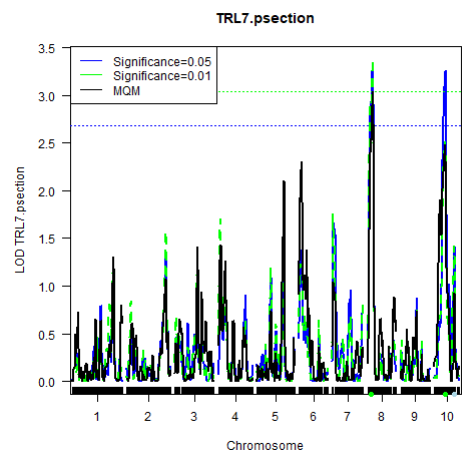
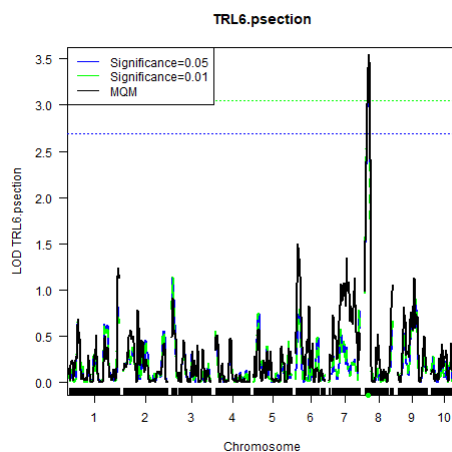
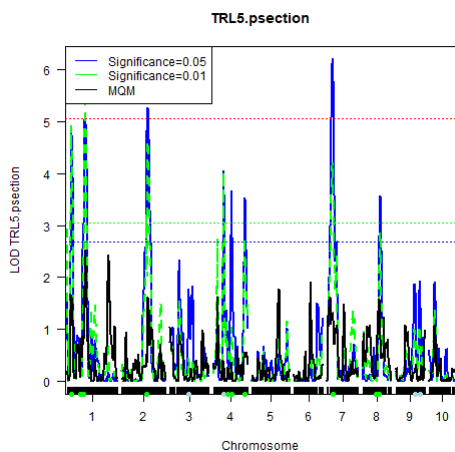
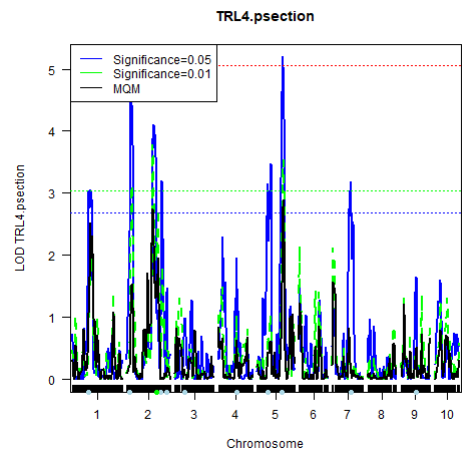
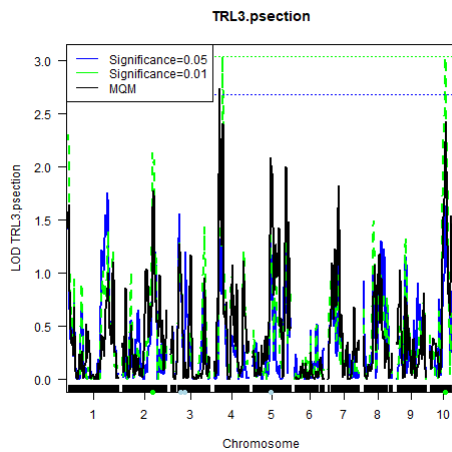
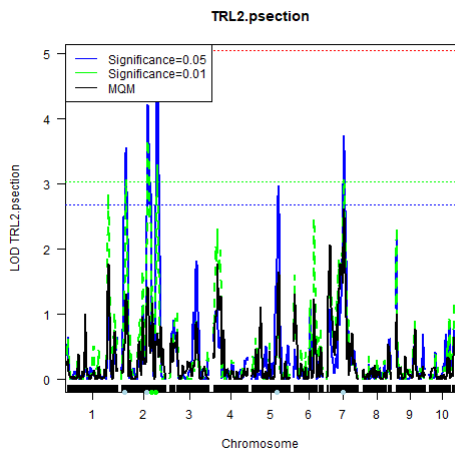
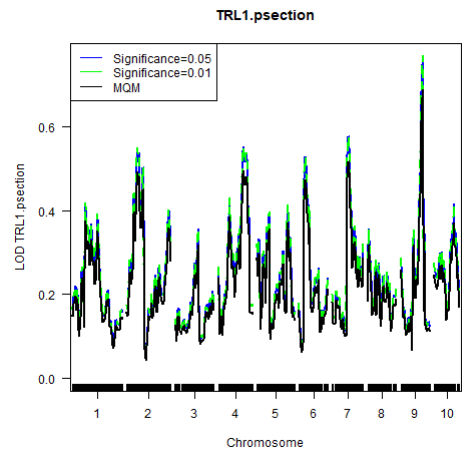
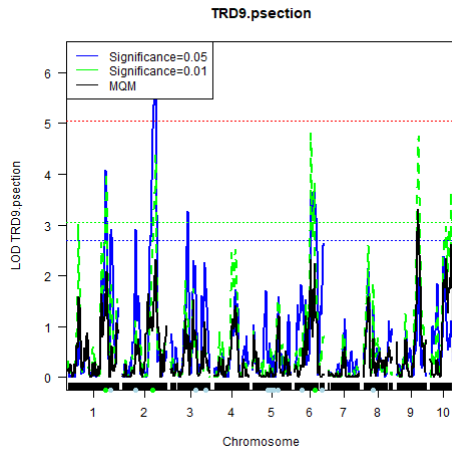
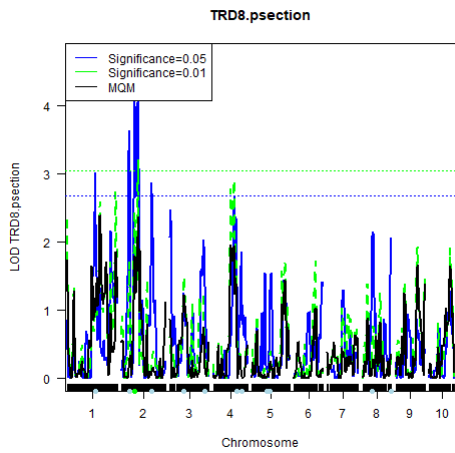
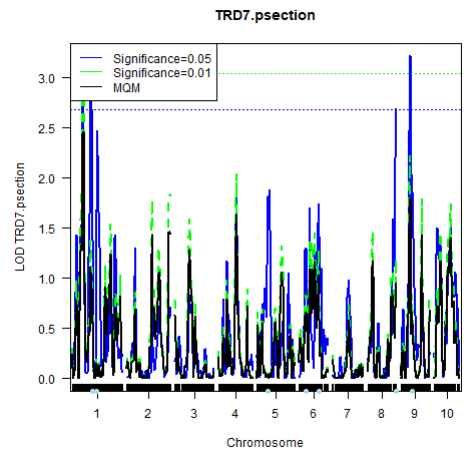
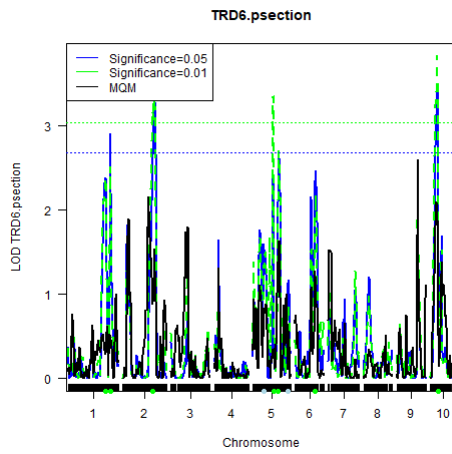
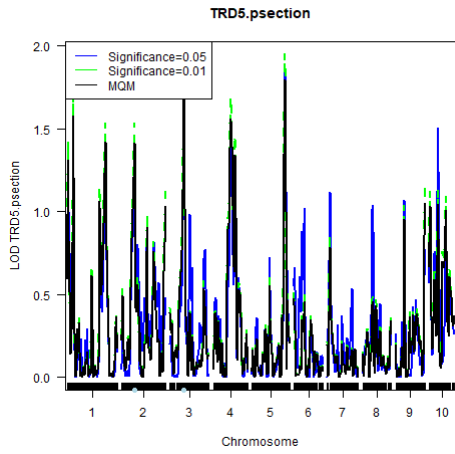


Figure 4 : Traces LOD des QTLs des caractères histologiques.

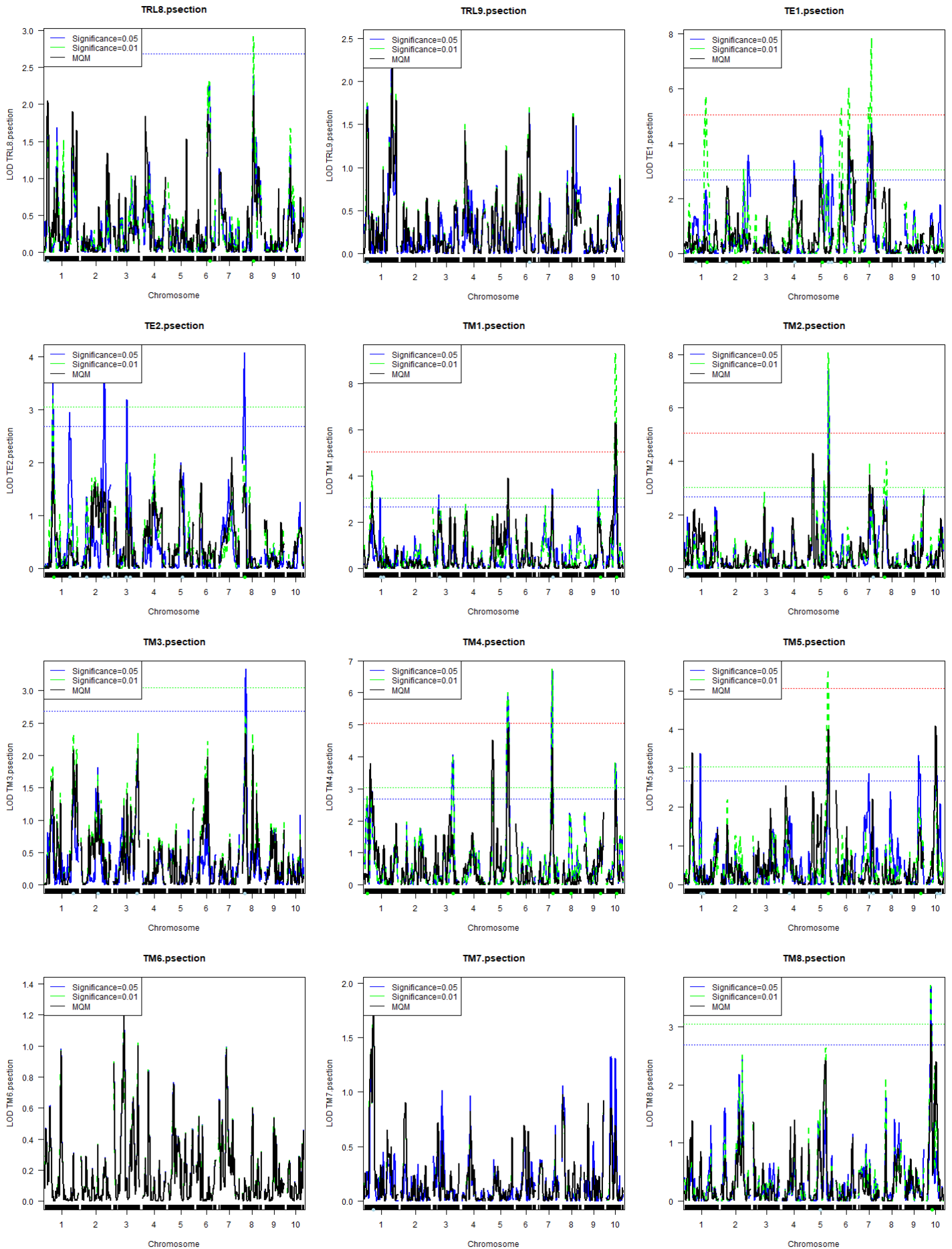


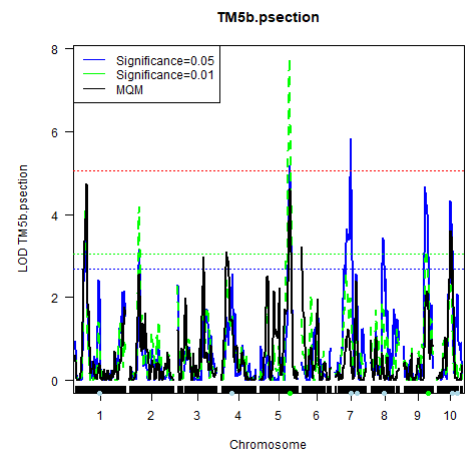
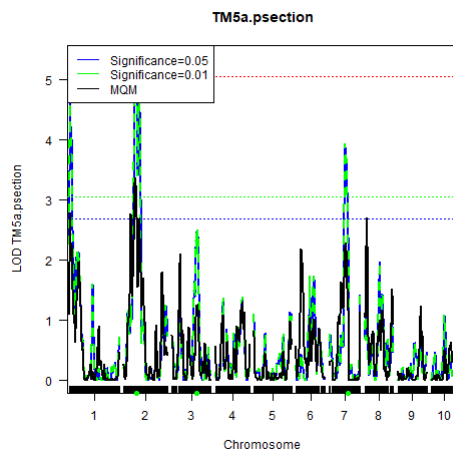
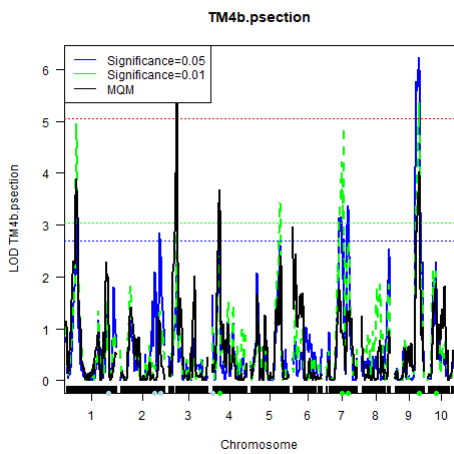
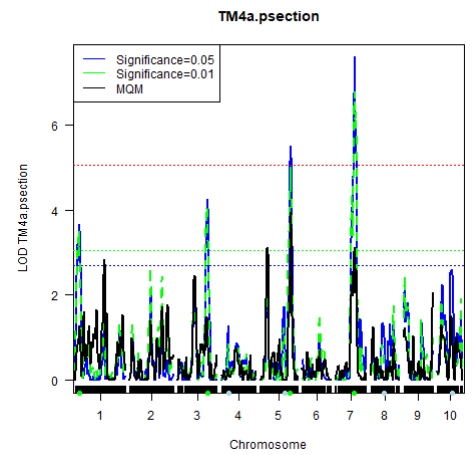
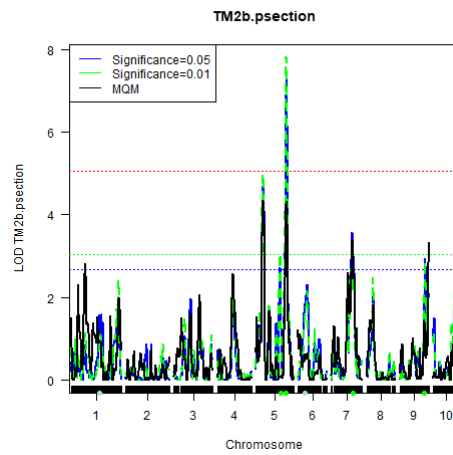
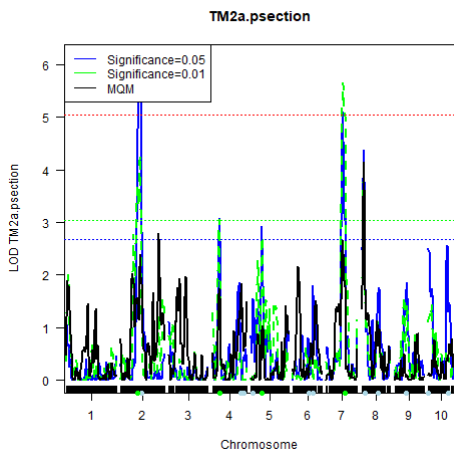
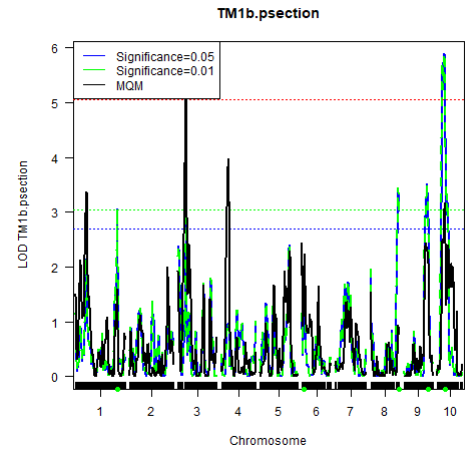
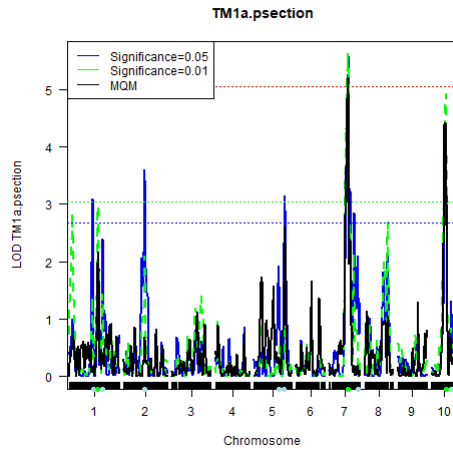
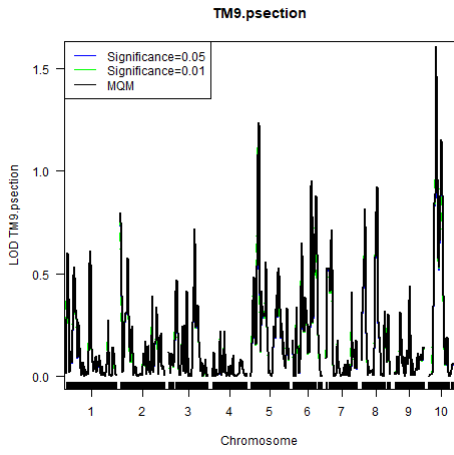
# Annexes





# Annexes







**Titre :** 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.

**Mots clés :** maïs, digestibilité, parois, histologie, biochimie, génétique

**Résumé :** Cette thèse CIFRE s'inscrit dans le cadre du projet DECLIC (New sources of cell wall degradability improvement and better understanding of degradability using cytologic approaches on lignocellulosic biomass and quantifications of ferulic and coumaric acids in maize) financé par sept entreprises de sélection du maïs membres de Promaïs (Maisadour Semences, Caussade Semences, Euralis Semences, Bayer, KWS, RAGT Semences et Limagrain). L'objectif central de cette thèse est de mieux comprendre comment les spécificités de la paroi du maïs, notamment les quantités élevées d'acides p-hydroxycinnamiques, la structure de la lignine et la distribution tissulaire de la lignine impactent la digestibilité de la paroi. Cette thèse permettra ainsi de fournir des résultats et outils pour améliorer la digestibilité de la paroi et la qualité de l'ensilage dans les programmes de sélection du maïs tout en veillant à conserver de bons rendements.

Dans la première partie de ce travail nous présentons le développement de deux outils haut débit. Depuis 1998, la valeur « Unité Fourragère Laitière, UFL » est utilisée comme critère d'inscription des variétés de maïs ensilage au catalogue français. L'estimation de cette valeur énergétique repose principalement sur la digestibilité de la matière sèche estimée par le protocole Aufrère. Nous apportons dans ce travail un éclairage sur le rôle clé de l'étape de gélatinisation dans ce protocole et proposons surtout une version améliorée fidèle, fiable, haut débit et facile à mettre en œuvre dans tous les laboratoires analytiques. Le second développement analytique concerne la mise au point d'une méthode automatique d'analyse d'images de coupes d'entrenœuds colorées au fasma et qui s'appuie sur les propriétés H, S et V de chaque pixel de l'image. La méthode proposée segmente automatiquement 44 tissus distincts : 29 tissus dans l'écorce, 10 tissus dans la moelle et 5 tissus dans les faisceaux.

Fort de ces deux méthodes haut débit, nous avons caractérisés 80 hybrides modernes de maïs fourrages précoces fournis par les partenaires privés du projet pour leurs digestibilités, leur composition biochimique et la répartition tissulaire de leur lignification. Nous avons ainsi montré que trois paramètres biochimiques : la teneur en lignine dans la paroi, la structure des lignines et leur p-coumaroylation et trois paramètres histologiques : TM2b, TM5b et TB5 avaient un rôle important dans l'explication des variations de digestibilité de paroi. Nous avons ainsi décrit l'idéotype de maïs de bonne digestibilité comme un maïs limitant sa teneur en lignine dans la paroi dans une gamme déjà restreinte par la sélection, privilégiant des lignines condensées et peu p-coumaroylées et maximisant la proportion de tissus non lignifiés très digestibles dans sa moelle.

Au sein d'une population de lignées recombinantes issue du croisement entre F4 (lignée cornée de bonne digestibilité à la moelle bleue) et F7 (lignée cornée de bonne digestibilité à la moelle rouge) nous avons étudié le déterminisme génétique des caractères liés à la digestibilité, la composition des parois et la répartition tissulaire de la lignification. Nous avons ainsi mis en évidence de nombreux QTLs ainsi que des clusters importants en sélection pour la digestibilité. Nous avons surtout décrypté le mécanisme de coloration bleue ou rouge de la moelle qui s'appuie sur 3 QTLs situés sur le bas du chromosome 5, le haut du chromosome 5 et le chromosome 7.

Dans une dernière partie, nous avons discuté de l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse et les avons mis en regard des questions d'amélioration de la digestibilité et du rendement dans les programmes de sélection du maïs fourrage. Nous avons particulièrement mis l'accent sur l'importance et sur le pilotage de la coloration bleue de la moelle pour assurer à la fois une bonne digestibilité et de bonnes propriétés agronomiques aux maïs fourrage de demain.

**Title :** Biochemical and histological traits involved in variations in cell wall digestibility: from the study of their variability to that of their genetic determinism. Identification of the major targets for improving digestibility in a context of high yield in modern forage maize hybrids.

**Keywords :** maize, digestibility, cell wall, histology, biochemistry, genetic

**Abstract :** This CIFRE thesis is part of the DECLIC project (New sources of cell wall degradability improvement and better understanding of degradability using cytologic approaches on lignocellulosic biomass and quantifications of ferulic and coumaric acids in maize) financed by seven maize breeding companies that are members of Promaïs (Maisadour Semences, Caussade Semences, Euralis Semences, Bayer, KWS, RAGT Semences and Limagrain). The central objective of this thesis is to better understand how the specificities of the maize cell wall, notably the high quantities of p-hydroxycinnamic acids, the structure of the lignin and the tissue distribution of the lignin impact the cell wall digestibility. This thesis will thus provide results and tools to improve cell wall digestibility and silage quality in maize breeding programs while maintaining good yields.

In the first part of this work we present the development of two high throughput tools. Since 1998, the "Unité Fourragère Laitière, UFL" value has been used as a criterion for the registration of silage maize varieties in the French catalog. The estimation of this energy value is mainly based on the dry matter digestibility estimated by the Aufrère protocol. In this work, we shed light on the key role of the gelatinization step in this protocol and propose an improved version that is faithful, reliable, high throughput and easy to implement in all analytical laboratories. The second analytical development concerns the development of an automatic method for the analysis of fasma-stained images of internode sections based on the H, S and V properties of each image pixel. The proposed method automatically segments 44 distinct tissues: 29 tissues in the rind, 10 tissues in the pith and 5 tissues in the bundles.

Using these two high-throughput methods, we characterized 80 modern early forage maize hybrids provided by the private partners of the project for their digestibilities, biochemical composition and tissue distribution of their lignification. We showed that three biochemical parameters: lignin content in the cell wall, lignin structure and p-coumaroylation and three histological parameters: TM2b, TM5b and TB5 had an important role in the explanation of cell wall digestibility variations. We thus described the maize ideotype of good digestibility as a maize limiting its lignin content in the cell wall in a range already restricted by selection, favoring condensed and low p-coumaroylated lignins and maximizing the proportion of highly digestible nonlignified tissues in its pith.

In a population of recombinant lines resulting from the cross between F4 (flint line of good digestibility and with a blue pith) and F7 (flint line of good digestibility and with a red pith), we studied the genetic determinism of traits related to digestibility, cell wall composition and tissue distribution of lignification. We have identified numerous QTLs as well as important clusters in selection for digestibility. Most importantly, we deciphered the mechanism of blue or red coloration of the pith which relies on 3 QTLs located on the bottom of chromosome 5, the top of chromosome 5 and chromosome 7.

In a final section, we discussed all the results obtained in this thesis work and put them in relation to the issues of digestibility and yield improvement in forage maize breeding programs. In particular, we emphasized the importance and the control of blue coloration of the pith to ensure both good digestibility and good agronomic properties of future forage maize.