



**HAL**  
open science

# Bases génétiques des variations pour la structure histologique des tiges de luzerne (*Medicago sativa* L.)

F. Guines

► **To cite this version:**

F. Guines. Bases génétiques des variations pour la structure histologique des tiges de luzerne (*Medicago sativa* L.). Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 2002. Français. NNT: . tel-02831558

**HAL Id: tel-02831558**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02831558>**

Submitted on 7 Jun 2020

**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.





ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

N°

|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

*Discipline Biologie et Agronomie*

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Françoise GUINES**

Le 25 juin 2002

Titre :

**BASES GENETIQUES DES VARIATIONS POUR LA STRUCTURE HISTOLOGIQUE DES TIGES DE  
LUZERNE (*Medicago sativa* L.)**

Préparée à l'Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères, INRA, 86600 Lusignan

**Jury :**

Mr	G. Thomas,	Professeur ENSAR	Président du jury
Mme	P. Fleurat Lessard,	Chargée de Recherche CNRS	Rapporteur
Mr	G. Charmet,	Directeur de Recherche INRA	Rapporteur
Mme	M.T. Misset,	Professeur Université RENNES I	Examinatrice
Mr	J.M. Allirand,	Ingénieur de Recherche INRA	Examineur
Mr	C. Huyghe,	Directeur de Recherche INRA	Directeur de thèse
Mme	B. Julier,	Chargée de Recherche INRA	Co-directrice de thèse





## REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse n'est pas le résultat d'une seule personne mais celui d'une équipe entière. Je tiens à en remercier toutes les personnes qui ont participé ou contribué au bon déroulement de cette thèse.

Dans un tout premier temps, j'aimerais remercier Christian Huyghe, mon Directeur de thèse qui m'a permis il y a 3 ans de cela de m'engager dans cette longue aventure qu'est la thèse. Son sens critique a permis à cette thèse d'évoluer. Je le remercie également pour sa disponibilité malgré sa lourde tâche de Directeur d'Unité. J'aimerais tout particulièrement remercier Bernadette Julier, ma co-directrice de thèse qui a encadré ce travail pendant 3 années et qui m'a encouragé à publier les résultats de cette thèse. Je la remercie également pour m'avoir fait participer à des congrès internationaux, je pense en particulier aux Etats-Unis et à L'Espagne, et pour son attention particulière lors du travail de rédaction, et aussi pour m'avoir laissé une grande autonomie dans la gestion de mon projet de thèse tout en étant très présente.

Je remercie les membres du comité de thèse : Grégoire Thomas, Joëlle Ronfort, Brigitte Doreau, Jean Michel Allirand et Yves Barrière pour leurs conseils avisés et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. J'adresse un remerciement particulier à Gilles Charmet et Pierrette Fleurat Lessard pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, et à Grégoire Thomas de présider le jury.

J'adresse ici toute ma gratitude à tous les membres de l'équipe luzerne : à Joëlle Jousse et Aline Gilly pour m'avoir épaulé pendant les expérimentations à l'extérieur et le prélèvement des tiges, à Christian Ecalle pour m'avoir fait partager son savoir sur la luzerne et pour sa patience à rechercher des informations dans ces boîtes à archives, je lui souhaite une belle retraite bien remplie de bonnes choses, à Françoise Durand pour son aide pendant les périodes de prélèvement et pour m'avoir remonté le moral quand il était bien bas. Le reste de l'équipe ne m'en voudra pas si je remercie tout particulièrement Philippe Cormenier qui s'est énormément investi dans ce travail, il a réalisé la plupart des coupes histologiques et a passé un grand nombre d'heures devant le logiciel d'analyse d'images. Je les remercie tous pour leur bonne humeur et leurs encouragements.

Je voudrais également remercier Jacques Papineau, ingénieur au laboratoire lupin pour les discussions intéressantes et ses encouragements.

Je remercie Pascal Poussot de l'Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères pour m'avoir fait partager ses connaissances en analyse d'images, il m'a beaucoup aidé à améliorer les programmes, pour cela je le remercie de tout cœur.

J'ai également une pensée pour mes camarades de thèse. Je pense en particulier à Luz et Eduardo avec qui j'ai partagé trois années, je les remercie pour leur amitié et pour m'avoir fait partagé un peu de leur culture mexicaine. Merci à Eduardo pour sa bonne humeur et ses blagues. Un grand merci à Sylvie Marhadour qui a toujours été présente et avec qui j'ai partagé des angoisses et des joies de thésard. Je la remercie pour tous ses conseils, pour tous les échanges que l'on a eu mais surtout pour son amitié. Je ne saurais oublier l'aventure de la création de l'association des stagiaires avec tout d'abord Angélique et Didier, et puis Thierry et Magali. J'ai une pensée également pour Yoann Denion, je le remercie pour son amitié, pour les repas au bâtiment des stagiaires et les virées en canoë sur la Vonne. J'y associe également l'amitié de Marine. Je ne vais pas oublier Virginie qui est arrivé à Lusignan il y a un an de cela et qui m'a offert son amitié.

Je tiens également à remercier Philippe Barre, qui a participé aux réflexions sur la thèse et qui a bien voulu me donner un peu de son temps pour relire mon dernier article. J'aimerais également remercier Florence. Je les remercie tous les deux pour leur amitié, leur enthousiasme et pour les petites bouffes. Je leur souhaite tout plein de bonheur dans leur nouvelle tâche de parents de la petite Marie.

Enfin et surtout, je remercie mes parents qui n'ont cessé de m'encourager et de croire en moi. Ils m'ont toujours tout donné pour que je puisse réaliser ce que j'avais envie de faire, je crois que merci n'est pas un mot assez fort, il en faudrait un autre.

Une pensée tendre pour Sébastien, à qui je dédie ce travail.



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADS	= Acid Detergent Solution
ddl	= Nombre de degrés de liberté
DIAM	= Diamètre des tiges
DISTEP	= Distance entre l'épiderme et le parenchyme médullaire
DMS	= Digestibilité de la matière sèche
DPAR	= Densité surfacique des parois du xylème
D+	= Génotype de digestibilité faible (utilisé dans la description des caractères le long de la tige)
D-	= Génotype de meilleure digestibilité
EPECORCE	= Epaisseur de l'écorce
EPPAR	= Epaisseur des parois du xylème
FT	= Rapport feuilles/tiges
GLM	= Modèle linéaire généralisé
H	= Hauteur des tiges
LFX	= Surface moyenne de la lumière des vaisseaux du xylème
LK	= Lignine Klason
LVX	= Surface moyenne de la lumière des fibres du xylème
Mag	= Parent Magali de la population de cartographie
Mer	= Parent Mercedes de la population de cartographie
NDF	= Neutral Detergent Fiber
NDS	= Neutral Detergent Solution
PCT	= Solubilité enzymatique des tiges
PECORCE	= Proportion d'écorce
PPAR	= Proportion de parenchyme médullaire
PXYL	= Proportion de xylème
QTL	= Quantitative trait locus (locus impliqués dans la variation de caractères quantitatifs)



## LISTE DES ANNEXES

- Annexe 2.1 : Utilisation du vibratome. Bonnes pratiques de laboratoire, UGAPF-Lusignan, Histologie.
- Annexe 2.2 : Composition de la solution de Fasga (Tolivia et Tolivia, 1987)
- Annexe 2.3 : Définitions relatives au traitement des images par Optimas
- Annexe 2.4 : Exemple de macro principale permettant d'analyser les images au grossissement X30  
Exemple de fichier d'entrée  
Exemple de fichier de sortie
- Annexe 2.5 : Dosage des parois par la méthode de Van Soest
- Annexe 3.1 : Carrés moyens de l'analyse de variance par strate de 10 cm de hauteur pour tous les caractères histologiques mesurés pour le génotype D+ et le génotype D-
- Annexe 3.2 : Marqueurs significatifs ( $p < 0.05$ ) pour le parent Magali à l'issue de l'analyse de variance GLM  
Marqueurs significatifs ( $p < 0.05$ ) pour le parent Mercedes à l'issue de l'analyse de variance GLM
- Annexe 3.3 : Marqueurs significatifs ( $p < 0.05$ ) à l'issue du test non paramétrique de Wilcoxon de classement des données non appariées pour le rapport feuilles/tige (FT) pour les deux parents



**Ce travail a donné lieu à diverses communications :**

**Guines F., Julier B., Poussot P., Ecalte C., Huyghe C.** Spatial variation for morphological, chemical and quantitative histological traits along the stem of lucerne (*Medicago sativa* L.). (soumis à *Annals of Botany*).

**Guines F., Julier B., Ecalte C., Huyghe C.** Among and within-cultivar differences for histological traits of lucerne (*Medicago sativa* L.) stem. (soumis à *Euphytica*).

**Guines F., Julier B., Poussot P., Huyghe C.** 2001. Investigating variation for histological characters in alfalfa stems. XIV Eucarpia *Medicago* spp Group Meeting. Quality in lucerne and medics for animal production. 12-15 September 2001. Zaragoza-Lleida, Spain.

**Julier, B. Guines, F. Ecalte, C. Huyghe, C., 2001.** From description to explanation of variations in lucerne digestibility. XIV Eucarpia *Medicago* ssp Group Meeting. Quality in lucerne and medics for animal production. 12-15 September 2001. Zaragoza-Leida, Spain.

**Guines F., Julier B., Poussot P., Huyghe C., Cormenier P., Ecalte C., 2002.** Quantitative analysis of histological traits along the stem of lucerne. European Grassland Federation, 19<sup>th</sup> General Meeting, La Rochelle (France), 27-30 May 2002.

**Julier, B., F. Guines, T. Hugué, C. Hackett, S. Santoni, P. Barre, et C. Huyghe, 2002.** Mapping in autotetraploid alfalfa and identification of QTL of stem morphology and histology. North American Alfalfa Conference, Sacramento, Juillet 2002.

**Communications réalisées sur des travaux non présentés dans la thèse :**

**Guines F., Julier B., Ecalte C., Huyghe C, 2002.** Genetic control of quality traits of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 53 (4) : 401-407.

**Julier B., Guines F., Emile J.C., Huyghe C.** Variation for protein degradability in forage legumes. (soumis à *Australian Journal of Agricultural Research*).

**Guines F., Julier B., Huyghe C., 2000.** Inheritance of digestibility and fibre content in alfalfa. *Proceedings of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference*. 16-19 July, 2000. Madison, Wisconsin.

**Guines F., Julier B., Huyghe C., 2000.** Genetic variation for *in situ* kinetics of protein degradation in alfalfa. *Proceedings of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference*. 16-19 July, 2000. Madison, Wisconsin.

**Julier B., Guines F., Prospero J.M., Ecalte C., Huyghe C., 2002.** Variation for morphology and histology of the stems in the model legume species *M. truncatula*. European Grassland Federation, 19<sup>th</sup> General Meeting, La Rochelle (France), 27-30 May 2002.





# Table des Matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique	
La luzerne : croissance, anatomie des tiges et relation avec la qualité du fourrage	
<b>1. La luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.)</b>	<b>4</b>
1.1. Taxonomie de la luzerne	4
1.1.1. Le genre <i>Medicago</i>	4
1.1.2. Le complexe <i>Medicago sativa</i>	4
1.1.3. <i>Medicago sativa</i> L.	5
1.2. Evolution du complexe <i>Medicago sativa</i>	5
1.3. Origines de <i>Medicago sativa</i> ssp <i>sativa</i>	5
1.4. Importance économique de la luzerne	6
1.4.1. Qualité de la luzerne	6
1.4.2. Les surfaces cultivées	6
1.4.3. Les pratiques de récolte	7
1.5. La sélection de la luzerne	8
1.5.1. Les types de variétés commercialisées	8
1.5.2. Objectifs de sélection	8
<b>2. Croissance et structure d'un peuplement de luzerne</b>	<b>9</b>
<b>3. Qualité de la luzerne</b>	<b>10</b>
3.1. Valeur alimentaire de la luzerne	10
3.2. Relation entre croissance et qualité	11
3.2.1. Modèles de prévision de la valeur alimentaire	12
3.3. Variabilité génétique et déterminisme génétique de la valeur alimentaire de la luzerne	13
3.4. Sélection pour la valeur alimentaire	14
<b>4. Anatomie des tiges de luzerne</b>	<b>16</b>
4.1. Morphologie des tiges de luzerne et organisation tissulaire	16
4.1.1. Morphogenèse et morphologie de la tige	16
4.1.2. Histologie de la tige	17
4.1.3. Description et rôles des différents tissus	20
4.1.4. Facteurs influençant la différenciation des tissus vasculaires	22
4.2. Développement et lignification des parois cellulaires	25
4.2.1. Organisation de la paroi	25
4.2.2. Développement des parois et lignification dans les tiges de luzerne	28
4.3. Dégradabilité des tissus et accessibilité à la paroi	29
<b>5. Conclusion</b>	<b>30</b>

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

<b>1. Matériel Végétal</b>	<b>32</b>
1.1. Evolution des caractères histologiques, morphologiques et biochimiques le long des tiges de luzerne et mise au point de l'analyse d'images	32
1.2. Etude de la diversité génétique pour les caractères histologiques et morphologiques des tiges	33
1.2.1. Dispositif "inter-cultivars"	33
1.2.2. Dispositif "intra-cultivar"	34
1.3. Recherche de marqueurs associés (population F <sub>1</sub> )	34
1.3.1. Matériel végétal et dispositif expérimental	34
1.3.2. Mesures réalisées	35
<b>2. Méthodologies</b>	<b>36</b>
2.1. Coupes histologiques et coloration	36
2.2. L'analyse d'images	37
2.2.1. Utilisation de l'analyse d'images et justification du choix de la méthode	37
2.2.2. Généralités sur le traitement des images	39
2.2.2.1. Acquisition des images	39
2.2.2.2. Prétraitement des images et segmentation	39
2.2.2.3. Traitement des images et extraction des données	40
2.2.2.4. Optimas	40
2.2.3. Démarche générale de l'analyse des images des coupes de tige de luzerne	41
2.2.4. Traitement des images capturées au grossissement X 30 et caractères mesurés	42
2.2.5. Traitement des images capturées au grossissement X 80 et caractères mesurés	42
2.2.6. Traitement des images capturées au grossissement X 200 et caractères mesurés	42
2.2.7. Définition de nouveaux caractères	43
2.3. Mesure des caractères biochimiques	44
2.3.1. Détermination des teneurs en parois (NDF : Neutral Detergent Fiber)	44
2.3.2. Détermination des teneurs en Lignine Klason (LK)	44
2.3.3. Détermination de la solubilité enzymatique des tiges (PCT)	44
2.4. Méthodologie de la cartographie	45
<b>3. Analyses statistiques</b>	<b>46</b>
3.1. Description des caractères morphologiques et histologiques le long des tiges de luzerne	46
3.2. Etude de la diversité génétique	48
3.2.1. Traitement statistique pour l'essai entre cultivars	48
3.2.2. Traitement statistique pour l'essai intra-cultivar	48
3.3. Etude phénotypique de la population F <sub>1</sub>	48
3.3.1. Etude phénotypique	48
3.3.2. Recherche de marqueurs associés	49

## CHAPITRE III : Résultats et Discussion

<b>1. Description des caractères histologiques et biochimiques le long de la tige, relation avec la morphologie des tiges</b> .....	<b>53</b>
1.1.Morphologie des tiges.....	53
1.1.1. Longueur des entre-nœuds.....	53
1.1.2. Diamètre des entre-nœuds .....	53
1.1.3. Evolution de la matière sèche le long de la tige.....	54
1.2.Evolution des caractères biochimiques le long de la tige.....	54
1.2.1. Evolution des teneurs en NDF .....	54
1.2.2. Evolution des teneurs en lignine Klason (LK).....	54
1.3.Evolution des caractères histologiques le long de la tige.....	55
1.3.1. Evolution des caractères liés aux différents tissus constituant la tige.....	55
1.3.2. Evolution des caractères liés aux structures du xylème .....	56
1.3.3. Etude des relations entre caractères histologiques et biochimiques .....	57
1.4.Discussion .....	58
<b>2. Etude de la diversité génétique entre cultivars et à l'intérieur des cultivars</b> .....	<b>61</b>
2.1.Variabilité pour les caractères observés .....	61
2.1.1. Caractères morphologiques .....	61
2.1.2. Caractères histologiques .....	62
2.2.Corrélations entre les caractères histologiques et morphologiques.....	65
2.3.Discussion .....	65
<b>3. Recherche de marqueurs associés ("QTLs") aux caractères mesurés</b> .....	<b>67</b>
3.1.Variabilité génétique dans la population de cartographie .....	67
3.1.1. Description des valeurs phénotypiques.....	67
3.1.2. Corrélations phénotypiques et génétiques .....	69
3.1.3. Héritabilité des caractères.....	71
3.2.Recherche de marqueurs (QTLs).....	71
3.2.1. Caractères liés à la morphologie des tiges .....	71
3.2.2. Caractères histologiques liés à la proportion des différents tissus de la tige .....	73
3.2.3. Caractères histologiques liés aux différents éléments du xylème.....	73
3.2.4. Solubilité enzymatique des tiges.....	74
3.2.5. Colocalisations des marqueurs .....	75
3.3.Discussion .....	75
<b>DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES</b> .....	<b>81</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>89</b>
<b>Annexes</b>	



INTRODUCTION GENERALE



## INTRODUCTION

La luzerne représente actuellement dans le monde près de 32 millions d'hectares, dont 13 millions en Amérique du Nord et 500 000 en France. La luzerne est une plante fourragère principalement destinée à l'alimentation des ruminants. L'utilisation de la luzerne est limitée par la valeur énergétique modérée de ce fourrage dans les rations des ruminants à fort niveau de production. Il convient donc d'améliorer sa digestibilité à même niveau de production. En effet, une meilleure digestibilité permet une augmentation de la production laitière de vaches laitières (Émile et al., 1997). La luzerne possède par ailleurs de nombreux avantages agronomiques (pérennité, rusticité, production estivale, économie d'intrants) et zootechniques (richesse en protéines, richesse en substances minérales, forte ingestibilité). De plus dans un contexte socio-économique qui se caractérise par une préoccupation forte de la protection de l'environnement, et de la sécurité alimentaire, la luzerne produit beaucoup de protéines avec un impact faible sur l'environnement.

La luzerne est utilisée à l'échelle du peuplement dont la structure est déterminée par le nombre de plantes et de tiges par mètre carré, et le nombre de tiges par plante. Les tiges constituent l'élément fondamental du peuplement dont la digestibilité diminue fortement avec la croissance en hauteur, alors que les feuilles ont une digestibilité constante et élevée. Au cours de la croissance, les tiges sont caractérisées par une augmentation croissante des proportions de tissus conducteurs et également des tissus de soutien. En effet, la proportion des différents tissus de la tige joue un rôle déterminant dans sa dégradabilité et par conséquent sur la qualité globale du fourrage. Dans ce cadre général, ce travail s'est focalisé sur l'étude des tiges et a consisté à acquérir des connaissances sur leurs structures histologiques et sur la variabilité génétique de ces structures.

L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer les bases génétiques des variations pour les structures histologiques des tiges de luzerne et d'établir la relation avec la digestibilité des tiges.

Ainsi les questions de recherche relatives à ce travail sont :

- (i) Comment évoluent les caractères histologiques le long des tiges de luzerne, y a-t-il une variabilité due à la position verticale sur la tige? Quelle relation y a-t-il avec la morphologie des tiges (longueur des entre-nœuds et diamètre)?
- (ii) Quelle est la variabilité génétique disponible pour les caractères morphologiques et histologiques des tiges?



- (iii) Quelles zones du génome sont impliquées dans les variations des caractères morphologiques, histologiques et biochimiques et quelles sont les relations entre ces caractères?

Cette thèse se divise en 4 chapitres.

Le premier chapitre constitue une synthèse bibliographique qui fait l'état des connaissances acquises sur la luzerne, son fonctionnement en peuplement et sa croissance. Dans cette synthèse, la relation entre la croissance et la qualité de la luzerne est étudiée plus en détail, et l'anatomie des tiges de luzerne est abordée en décrivant la structure, le rôle et les éléments constitutifs de chacun des tissus.

Le deuxième chapitre décrit le matériel végétal et les méthodes ayant été utilisés dans cette thèse permettant de répondre aux différentes questions de recherche posées ci-dessus. Dans ce chapitre, des rappels bibliographiques seront faits pour justifier l'utilisation de l'analyse d'images dans notre étude, et de la méthode de recherche de marqueurs associés aux caractères mesurés. Le déroulement de l'analyse d'images est illustré en détail, ainsi que les analyses statistiques utilisées dans les différents dispositifs expérimentaux de cette étude.

Le troisième chapitre présente les résultats de ce travail. Il est composé de 3 parties :

(i) L'évolution des caractères histologiques et biochimique a été étudiée dans un premier temps le long de tiges caractérisées également pour leur morphologie. Cette partie montre les relations entre ces caractères et la morphologie des tiges. Pour ce faire, deux génotypes contrastés en digestibilité ont été évalués pour les caractères morphologiques, histologiques et biochimiques (teneur en parois et en lignine). Cette partie avait également pour but d'optimiser la méthodologie d'échantillonnage des tiges (nombre de tiges à prélever et position sur la tige pour quantifier les structures histologiques) pour évaluer la variabilité génétique. Cette connaissance approfondie des structures histologiques des tiges de luzerne permet d'aborder l'étude des bases génétiques.

(ii) La deuxième partie présente la variation génétique disponible entre et au sein de cultivars pour les caractères morphologiques et histologiques évalués en bas des tiges. Chez la luzerne, en raison de la nature allogame et tétraploïde de l'espèce et de la structure synthétique des variétés, la variabilité génétique intra cultivar est égale voire dans certains cas supérieure à la variabilité génétique inter cultivars pour certains caractères liés à la qualité du fourrage ou à la production de semences. Dans un contexte d'étude de la diversité génétique des caractères histologiques, il est donc nécessaire d'évaluer également les différences qui existent au sein de cultivars. La diversité génétique a été étudiée au niveau inter cultivars dans un dispositif comprenant 6 cultivars choisis pour leurs

digestibilités contrastées; et au sein de cultivars sur 2 cultivars choisis parmi les 6 précédents. La diversité génétique a été évaluée à la fois pour les caractères morphologiques et histologiques des tiges.

(ii) La troisième partie décrit les résultats de la recherche de marqueurs associés aux variations des caractères morphologiques, histologiques et à la solubilité enzymatique des tiges. Cette étude a été menée sur une population de cartographie en  $F_1$  issue d'un croisement contrôlé entre 2 parents provenant de deux cultivars différents. Dans un premier temps, la variabilité génétique présente au sein de la descendance a été évaluée, l'héritabilité au sens large des caractères mesurés calculée, et la recherche de marqueurs associés aux variations des caractères mesurés initiée. Les cartes des deux parents étant en cours de réalisation au laboratoire, la recherche de marqueurs et leur localisation ont été réalisées sur les cartes non saturées de marqueurs pour chacun des deux parents. Cette recherche de marqueurs associés aux caractères histologiques et morphologiques a permis de détecter des marqueurs responsables de la variation des caractères et d'estimer le pourcentage de variation phénotypique expliquée par chacun des marqueurs lorsqu'ils étaient associés de manière significative aux variations observées.

Les résultats sont discutés, puis synthétisés dans une discussion générale avant d'être mis en perspective dans la dernière partie.



## CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### La luzerne : croissance, anatomie des tiges et relation avec la qualité du fourrage.

<b>1. La luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.)</b>	<b>4</b>
1.1. Taxonomie de la luzerne	4
1.2. Evolution du complexe <i>Medicago sativa</i>	5
1.3. Origines de <i>Medicago sativa</i> ssp <i>sativa</i>	5
1.4. Importance économique de la luzerne	6
1.5. La sélection de la luzerne	8
<b>2. Croissance et structure d'un peuplement de luzerne</b>	<b>9</b>
<b>3. Qualité de la luzerne</b>	<b>10</b>
3.1. Valeur alimentaire de la luzerne	10
3.2. Relation entre croissance et qualité	11
3.3. Variabilité génétique et déterminisme génétique de la valeur alimentaire de la luzerne	13
3.4. Sélection pour la valeur alimentaire	14
<b>4. Anatomie des tiges de luzerne</b>	<b>16</b>
4.1. Morphologie des tiges de luzerne et organisation tissulaire	16
4.2. Développement et lignification des parois cellulaires	25
4.3. Dégradabilité des tissus et accessibilité à la paroi	29
<b>5. Conclusion</b>	<b>30</b>

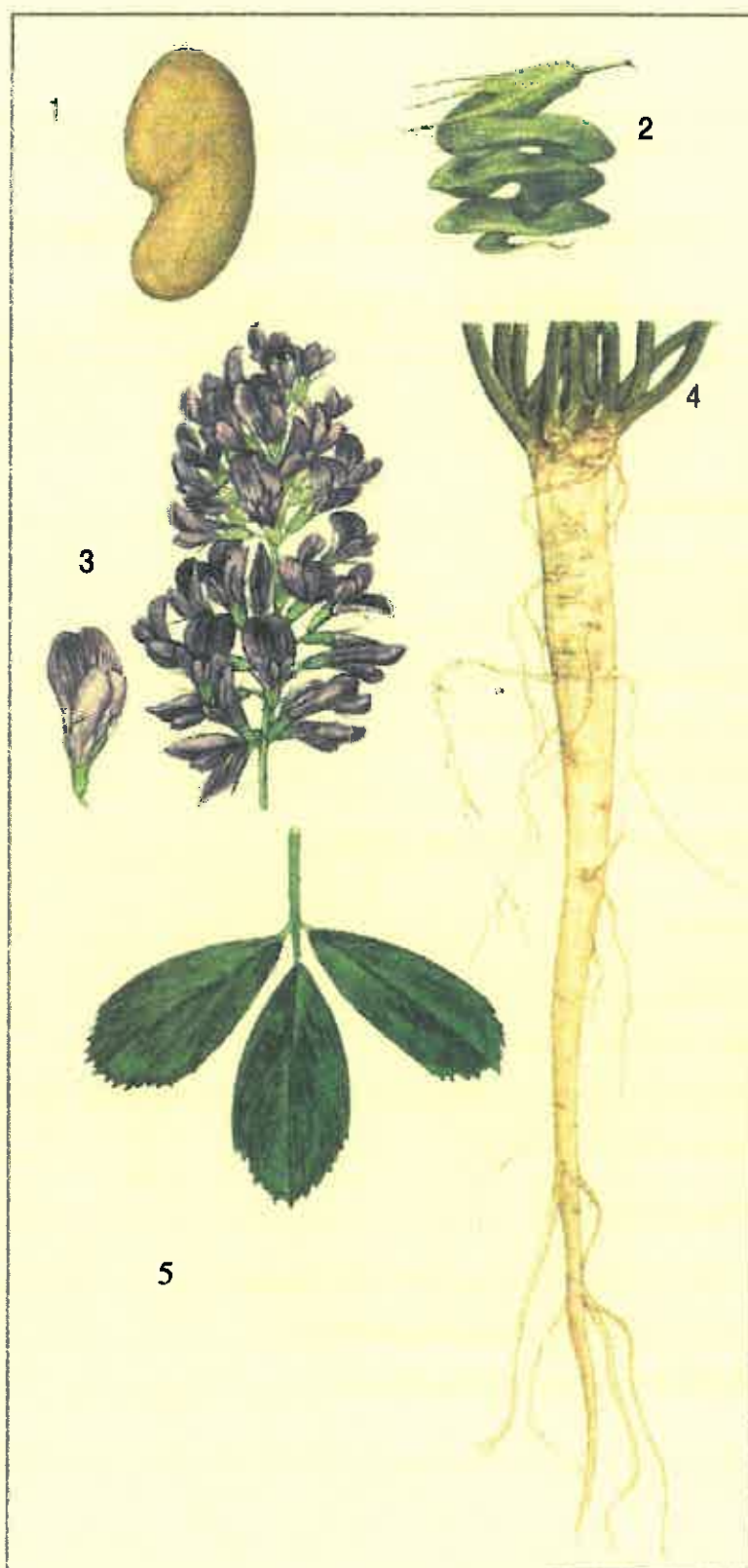


Figure 1.1 : La luzerne (*Medicago sativa* L.). 1. graine, 2. gousse, 3. inflorescence et fleur, 4. racine pivotante, 5. feuille trifoliolée

## 1. LA LUZERNE (*Medicago sativa* L.)

### 1.1. Taxonomie de la luzerne

#### 1.1.1. Le genre *Medicago*

Le genre *Medicago* appartient à l'ordre des Léguminosales, superfamille des légumineuses et sous-famille des Faboïdées, il est proche des genres *Melilotus* et *Trigonella*. Le genre *Medicago* a été classé en 4 sous-genres par Lesins et Lesins (1979) sur la base de la morphologie des gousses et des graines : *Lupularia*, *Orbicularia*, *Spirocarpos* et *Medicago*. Ces sous-genres comprennent au total 55 espèces dont 21 sont pérennes, 33 sont annuelles et une est de pérennité variable. Le sous-genre *Medicago* comprend 4 sections : *Falcago*, *Arborae*, *Marinae* et *Suffruticosae*. La section *Falcago* comporte 4 sous-sections : *Falcatae*, *Rupestres*, *Daghestanicae*, et *Papillosae* (Lesins et Lesins, 1979). La sous-section *Falcatae* comprend 5 espèces : *falcata*, *sativa*, *glomerata*, *glutinosa* et *prostata*. La couleur de la fleur et la forme des gousses sont les caractères qui permettent de distinguer les espèces de cette sous-section. Ces 5 espèces sont toutes pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, et elles ont une corolle jaune, violette ou bigarrée de jaune et de violet.

Le nombre chromosomique de base est  $x=8$ , excepté les espèces annuelles *M. constricta* Dur., *M. praecox* DC., *M. polymorpha* L., *M. rigidula* (L.) qui ont un nombre chromosomique de base  $x=7$ . Trois niveaux de ploïdie existent dans les différentes espèces du genre : diploïdes ( $2n=2x=14$  et  $2n=2x=16$ ), tétraploïdes ( $2n=4x=32$ ) pour la luzerne cultivée (*Medicago sativa*) et hexaploïdes ( $2n=6x=48$ ) (Quiros et Bauchan, 1988) mais la majorité des espèces sont diploïdes. A la base le genre devait être diploïde et les espèces tétraploïdes auraient dérivé d'une non-réduction des gamètes, donnant des plantes très vigoureuses et hétérozygotes capables de s'adapter et de coloniser de nouveaux habitats permettant d'accroître l'aire géographique du genre *Medicago* (Quiros et Bauchan, 1988).

#### 1.1.2. Le complexe *Medicago sativa*

Il existe de nombreuses possibilités d'inter-croisements entre les formes diploïdes et/ou tétraploïdes de *Medicago sativa*, que Lesins et Lesins (1979) décrivent comme un complexe d'espèces, mais plus de la moitié des écotypes de luzerne cultivée actuellement est originaire des formes pérennes tétraploïdes allogames de *M. sativa* et *M. falcata*. Certaines classifications du complexe se font en espèces (Lesins et Lesins, 1979), d'autres se font en sous-espèces (Quiros et Bauchan, 1988; Tutin, 1968; Gunn et al., 1978).

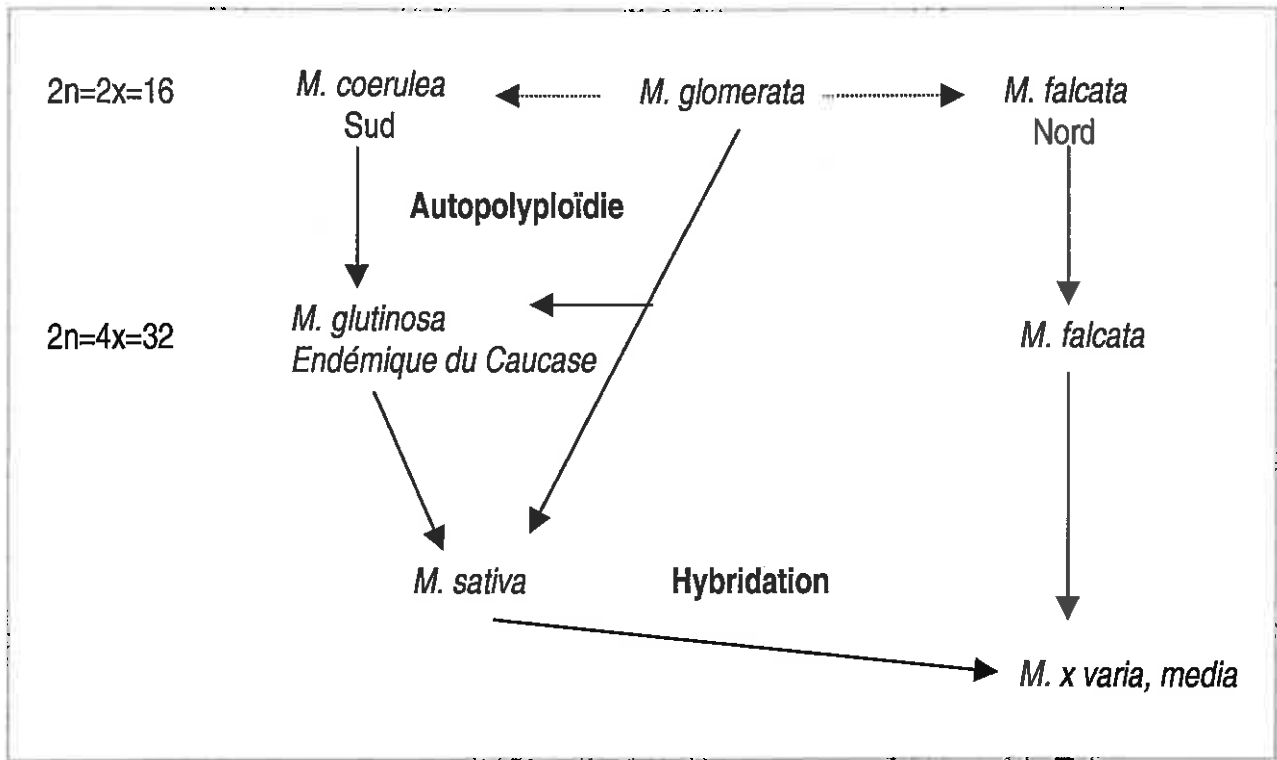


Figure 1.2 : Evolution du complexe *Medicago sativa* (Quiros et Bauchan, 1988)



### 1.1.3. *Medicago sativa* L.

La forme tétraploïde est dénommée *M. sativa ssp sativa*, et la forme diploïde est dénommée *M. sativa ssp coerulea*. La sous-espèce *sativa* est caractérisée par des fleurs violettes ou bleues, une racine pivotante, un port dressé, et des gousses en spirale (Whyte et al., 1953) (figure 1.1). Elle est peu dormante et a une résistance variable au froid.

### 1.2. Evolution du complexe *Medicago sativa*

Lesins et Lesins (1979) ont proposé un schéma possible d'évolution du complexe *M. sativa* (figure 1.2). Ils proposent que *M. glomerata* distribué sur tout le Caucase, caractérisé par des fleurs jaunes, soit l'ancêtre commun des diploïdes du complexe, d'où dérivent deux populations ancestrales qui ont été séparées par isolement spatial au cours de l'ère : *coerulea* (au sud) et *falcata* (au nord). *M. sativa* et *M. falcata* sont deux espèces très proches, et donc interfertiles pour donner une large gamme d'hybrides englobés sous le nom de *Medicago x varia* Martyn ou *Medicago media*. Ces hybrides forment des populations naturelles de pays et des variétés créées par les sélectionneurs pour des utilisations fourragères. En France, les populations locales sont constituées de mélanges en proportions variables de *M. sativa* et d'hybrides. Trois groupes peuvent être distingués : les types Provence (type *sativa* et peu de *varia*), les types Flamands (type *Medicago x varia*), et les types Marais de l'Ouest (type *varia* plus marqué) (Mauriès, 1994).

### 1.3. Origines de *Medicago sativa ssp sativa*

A partir d'études phylogénétiques de la luzerne et d'autres légumineuses et d'après Sinskaya (1950) et Michaud et al. (1988) la luzerne aurait deux centres d'origines. Le premier est la région montagneuse transcaucasienne, au climat continental marqué, qui a donné naissance aux luzernes modernes européennes. Le deuxième centre géographique d'origine cité par Sinskaya (1950) est l'Asie Centrale. La plus vieille référence connue indique que la luzerne était utilisée comme fourrage il y a environ 3300 ans. Au cours d'excavations archéologiques dans une région de la Turquie, des tablettes de brique hittites (1400-1200 avant JC) indiquent que les animaux étaient nourris avec de la luzerne pendant tout l'hiver. D'après Klinkowski (1933) et Michaud et al. (1988), la luzerne fut introduite d'Espagne en France, vers 1550 et ensuite disséminée sur toute l'Europe. La luzerne fut introduite en Amérique par le biais des colonisations par les Portugais et les Espagnols au seizième siècle, et également au Mexique et au Pérou. La luzerne fut introduite du Mexique au Texas, en Arizona, au Nouveau-Mexique et en Californie par des missionnaires. La luzerne trouve son plus grand développement dans les zones tempérées chaudes des Etats-Unis, d'Europe, d'Amérique du Sud, Asie, Japon, Australie, Nouvelle-Zélande, Afrique et Argentine (Mauriès, 1994).



Tableau 1.1 : Evolution des surfaces cultivées (en culture pure) de luzerne en France

Surface en ha	1979	1984	1989	1994	1999	2000
Luzerne	712757	548707	462138	424482	358118	353827
Trèfle violet	242855	105160	69586	53570	43778	44503
Autres légumineuses	43005		48297	44745	34051	34410
Total prairies artificielles	998617	653867	580021	522797	435947	435947

(Données Agreste, 1980, 1985, 1990, 1995 et 2000)

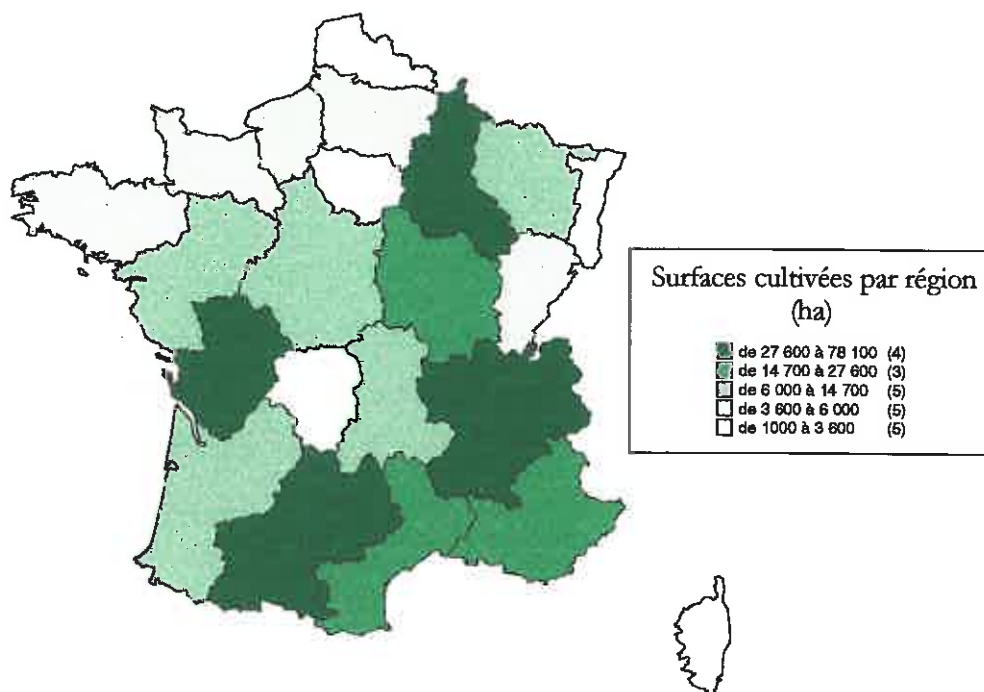


Figure 1.3 : Production de luzerne (en hectares) par région (données Agreste, 2000)

## 1.4. Importance économique de la luzerne

Dans un contexte socio-économique qui se caractérise par une préoccupation forte liée à la protection de l'environnement, et à la sécurité alimentaire, la luzerne joue un rôle important. En France, elle joue un rôle important comme précédent culturel. En effet, elle améliore la structure du sol grâce à son important système racinaire. La luzerne permet également une limitation du lessivage des nitrates. Cette épuration s'explique par un prélèvement préférentiel de l'azote nitrique du sol sur l'azote d'origine symbiotique

### 1.4.1. Qualité de la luzerne

La luzerne est une source majeure de protéines avec ses 2,5 tonnes / ha de protéines (Mauriès, 1994). La luzerne a une très bonne composition en acides aminés, ce qui lui donne d'autant plus d'intérêt lorsqu'elle est distribuée à des animaux à forte production. Cela en fait une culture de choix dans les systèmes d'élevage. Cependant, la luzerne possède une valeur énergétique modérée. La valeur énergétique d'un fourrage dépend de sa digestibilité, c'est à dire de son aptitude à être dégradé dans le tube digestif de l'animal. La digestibilité des feuilles varie très peu au cours du temps et est environ de 80% (Buxton et al., 1985; Marten et al., 1988), alors que la digestibilité des tiges diminue fortement avec la maturité (Buxton et al., 1987; Marten et al., 1988). Les parois qui accumulent des polysaccharides et de la lignine ont une teneur qui augmente et qui contribue à diminuer la digestibilité des tiges (Buxton et Brasche, 1991; Buxton et Russell, 1988; Sanderson et al., 1988). Cette fraction lignifiée diminue l'accessibilité des microorganismes aux polysaccharides (Jung et Deetz, 1993).

Cette diminution de digestibilité résulte également de l'évolution histologique de la tige, caractérisée par une augmentation croissante des proportions de tissus conducteurs au cours de la croissance, mais également des tissus de soutien. Lemaire et Allirand (1993) ont établi une relation entre la croissance de la partie aérienne et la digestibilité. Ces aspects de croissance et de qualité du fourrage seront développés plus précisément dans une prochaine partie (chapitre I 3.2).

### 1.4.2. Les surfaces cultivées

Au total, la luzerne représente actuellement dans le monde près de 32 millions d'hectares, dont 13 millions en Amérique du Nord, et 400 à 600 000 hectares en France (Mauriès, 1994).

Les surfaces cultivées en culture pure sont en diminution continue depuis 1979. Les surfaces sont passées de 712 757 ha en 1979 à 353 827 ha en 2000 (tableau 1.1). Les zones les plus importantes de la production se situent en Champagne-Ardenne (22 % de la production française) où la luzerne est largement prédominante du fait de son statut de culture industrielle destinée à la

déshydratation. Vient ensuite la région Midi-Pyrénées (19,7 % de la production française), la région Poitou-Charentes (11,3 % de la production française), et la région Rhône-Alpes (7,8 %) (figure 1.3). Les zones actuelles d'élevage laitiers (Basse-Normandie, Nord-Pas-de-Calais, Lorraine, Rhône Alpes, Auvergne) sont celles où la culture de la luzerne peut être problématique (sols acides ou conditions climatiques défavorables au séchage du foin) (Mauriès, 1994). La luzerne peut être également utilisée en association. Le plus souvent les luzernes sont semées avec du dactyle. Les cultures en association représentent environ 250 000 hectares. La production de luzerne se fait en dehors des zones traditionnelles d'élevage au climat souvent défavorable, ce qui explique également en partie la diminution des surfaces cultivées. Les raisons de ce déclin sont aussi dues à l'apparition et au développement important des systèmes fourragers plus simples à conduire à base d'ensilage de maïs, complétés par du tourteau de soja et faisant appel aux engrais azotés de synthèse. Cela entraîne une importation massive de protéines et un coût énergétique de synthèse des engrais azotés.

#### **1.4.3. Les pratiques de récolte**

Les pratiques de récoltes varient d'une région à l'autre. Les parcelles sont récoltées pour des utilisations différentes selon leur cycle d'exploitation. Par exemple, en Bretagne, le premier cycle de récolte est destiné à l'ensilage du fait du rendement élevé qui empêche la réalisation de foin ou de pâturage. Le deuxième cycle est récolté en foin à et à partir du troisième cycle, l'affouragement ou le pâturage est prioritaire. Une même parcelle est de cette façon récoltée de différentes manières.

Près de  $\frac{3}{4}$  des surfaces de luzerne pure sont utilisées en foin (73%). Cependant, la production de foin et d'ensilage de luzerne préfanée dans les zones laitières est délicate du fait des conditions climatiques défavorables au début des premières coupes (de meilleure qualité nutritionnelle). La luzerne déshydratée constitue une solution de substitution du foin; elle représente 12% de la production. En effet, la luzerne déshydratée convaincra de plus en plus d'éleveurs laitiers (PLM, mai 2001) selon une enquête réalisée par le Syndicat National des Déshydrateurs de France (SNDP). La luzerne déshydratée semble reconnue également comme une alternative à l'utilisation des farines animales et comme source de protéines sûre. La luzerne est très peu utilisée en pâturage (4%) et en vert (2%) du fait des risques de météorisation des ruminants la consommant et également très peu en ensilage (9%). Ces données datent de 1982 (communication SCEES) et les surfaces de luzerne ont globalement diminué alors que la production de la déshydratation est restée stable.

## 1.5. La sélection de la luzerne

### 1.5.1. Les types de variétés commercialisées

Autrefois populations de pays, dont chaque agriculteur produisait les semences, les variétés sont maintenant des variétés synthétiques. Toutefois la possibilité d'utiliser des hybrides a été évaluée. La création variétale en France et en Europe repose sur l'exploitation des effets d'aptitude générale à la combinaison (AGC) exprimés au sein de ces structures synthétiques (Génier et al., 1992). Une variété synthétique est une population artificielle résultant de la multiplication sexuée pendant un nombre déterminé de générations de la descendance en fécondation libre d'un nombre limité de constituants (clones, familles) qui sont choisis pour certains caractères de valeur propre et de valeur en croisement (Gallais, 1990). Les variétés synthétiques permettent une certaine utilisation du phénomène d'hétérosis chez les plantes allogames, là où l'hybridation est difficile à contrôler à grande échelle et entraîne un fort taux de consanguinité. Au cours de la synthèse, un nombre déterminé de parents sont intercroisés en isolement ou en polycross, on obtient alors la première génération synthétique SYN1, qui constitue les semences de pré-base. La génération suivante de multiplication de la descendance (SYN2) fournira les semences de base et la suivante (SYN3) les semences commerciales (Gallais, 1990). Le maintien des variétés synthétiques demande de soit conserver les constituants de départ, soit conserver un stock important de semences de base.

### 1.5.2. Objectifs de sélection

Les objectifs de sélection ont beaucoup évolué depuis la mise en place du catalogue officiel des variétés de luzerne en 1970. Le premier critère pris en compte pour l'inscription des variétés était le rendement en matière sèche en culture pure. D'autres critères ont été progressivement pris en compte tels que la résistance à la verse, résistance aux maladies (*Verticillium*), résistance aux nématodes des tiges, teneur en protéines. Les besoins des agriculteurs entraînent l'apparition de nouveaux critères de sélection (face à l'apparition de nouvelles maladies par exemple ou de nouveaux ravageurs). Depuis quelques années, la valeur énergétique des variétés de luzerne est une préoccupation forte des sélectionneurs et du SNDF (Syndicat National des Déshydrateurs de France). De ce fait, la valeur énergétique est de plus en plus prise en compte dans les programmes de sélection mais n'est pas encore prise en compte pour l'inscription des variétés au catalogue.

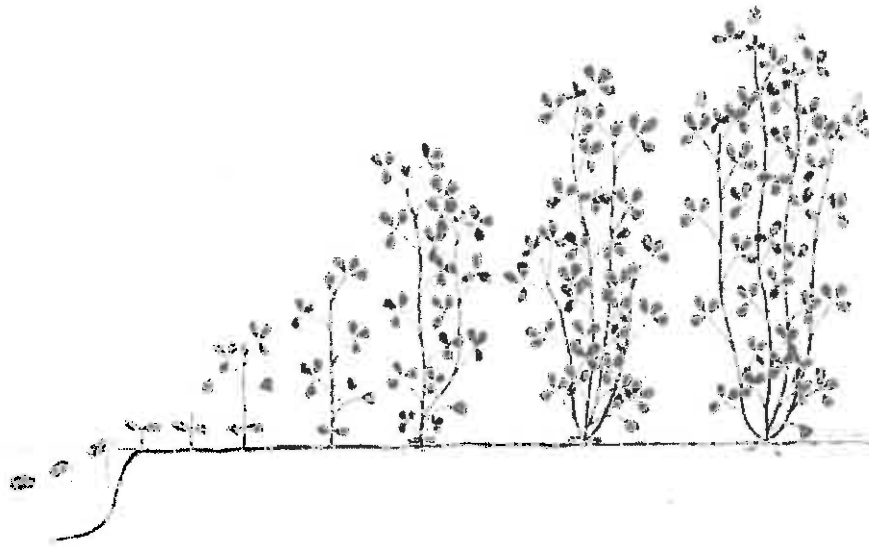


Figure 1.4 : Développement d'une plante de luzerne (Martensen, cité dans Teuber et Brick, 1988)

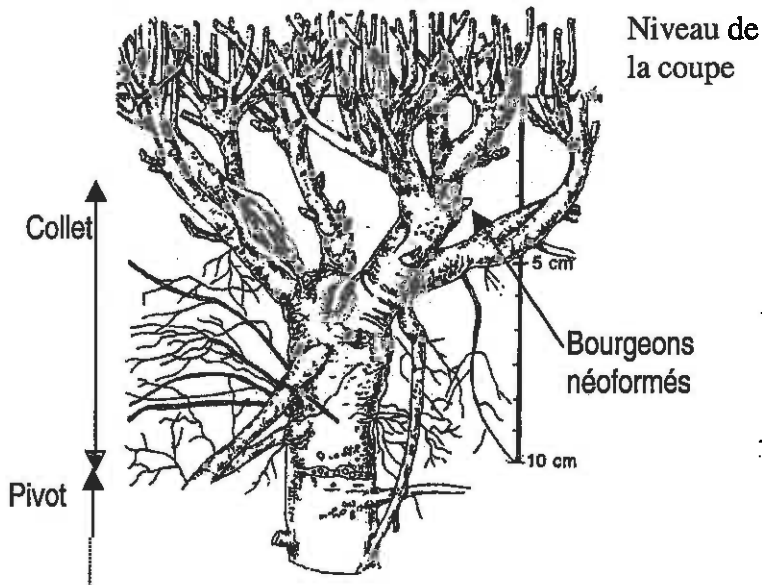


Figure 1.5 : Pivot et collet d'un pied de luzerne adulte (MoKeyeva, cité dans Teuber et Brick, 1988)

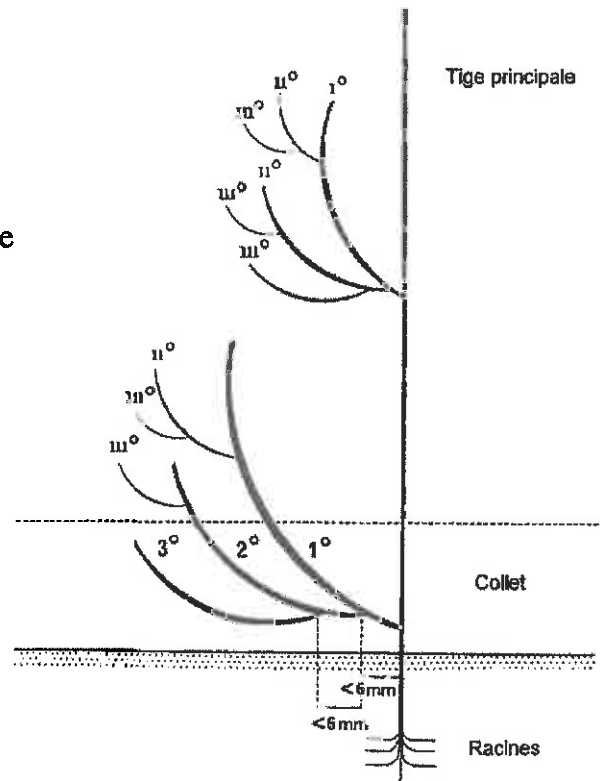


Figure 1.6 : Développement des tiges de luzerne (Musgrave et Langer, 1977)

## 2. CROISSANCE ET STRUCTURE D'UN PEUPEMENT DE LUZERNE

Dans cette partie je ne décrirai pas la morphologie des graines et leur germination, ni la morphologie des racines. Cette étude portant sur la tige feuillée, la description morphologique et anatomique sera limitée à cette partie de la plante.

A la levée, deux cotylédons émergent et la première feuille unifoliolée est émise. L'axe primaire s'allonge et développe des feuilles alternées trifoliolées (figure 1.4) (Teuber et Brick, 1988). Le bourgeon axillaire de la première feuille unifoliolée se développe ensuite pour donner la première tige secondaire (Foord, 1985). Deux autres tiges vont se développer à la suite depuis le niveau des cotylédons. Cet ensemble de tiges va former le collet primaire (figure 1.5). Un développement plus important du collet peut avoir lieu à partir des nœuds situés en dessous de 6 mm de chaque côté du collet primaire, et au niveau de la zone des chaumes des tiges primaires en dessous de la hauteur de coupe (figure 1.5). Stewart (1926) inclut dans la définition du collet uniquement les portions de tiges pérennes. Simonds (1935) y inclut également la partie supérieure de la racine. La structure du collet est importante dans le développement de nouvelles tiges (Teuber et Brick, 1988). Ce développement suit un ordre précis. On distingue les tiges primaires, secondaires et tertiaires (figure 1.6). Si on laisse les plantules se développer sans les couper de nouvelles tiges secondaires vont se développer à partir des bourgeons axillaires des feuilles trifoliolées de la tige primaire, et éventuellement des tiges tertiaires qui se développent à partir de l'aisselle des feuilles des tiges secondaires (Teuber et Brick, 1988).

La luzerne développe en même temps une racine pivotante principale et des racines secondaires plus ou moins ramifiées (figure 1.1). Grove et Carlson (1972) considèrent que la première racine émerge près de l'hilum et pénètre dans le sol comme une racine pivotante non ramifiée.

Divers modèles ont été développés pour expliquer la croissance et la production d'un peuplement de luzerne. Gosse et al. (1988) ont établi un modèle de croissance basé sur la détermination de la quantité de rayonnement visible intercepté par le couvert végétal (PAR) pendant la repousse. Ce modèle ne prend pas en compte les différents types de tiges dans une plante mais considère un ensemble de plantes. Les différents modèles prennent en compte divers paramètres tels que le rayonnement visible intercepté (PAR) pour différentes repousses et les températures journalières (Gosse et al., 1984); la classification des tiges selon leur stade morphologique (Kalu et Fick, 1981) en relation avec les températures journalières (Sanderson et al., 1988; Sanderson et Wedin, 1989) mais également des paramètres climatiques et agronomiques tels que l'intervalle de coupe et l'état du sol (Fick, 1984). Le modèle développé par Allirand (1998) simule la croissance en dimensions et en masse de tous les phytomères des axes aériens, ainsi que la croissance en masse des organes souterrains,



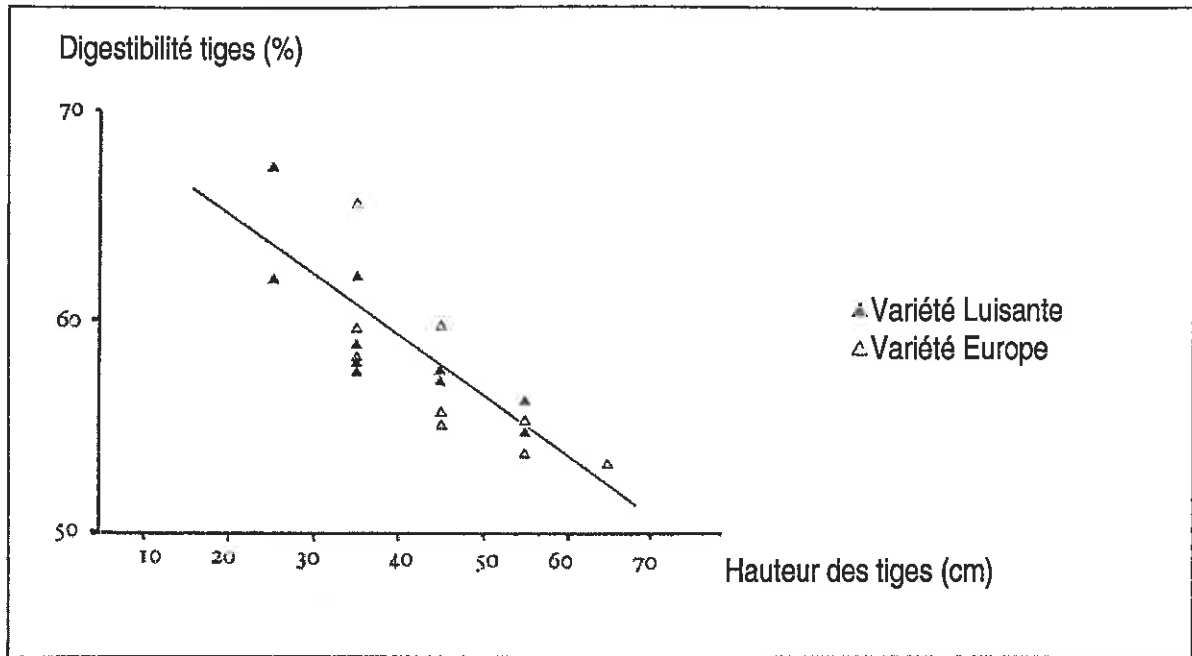


Figure 1.7 : Digestibilité des tiges dominantes du peuplement en fonction de leur hauteur au cours d'une repousse pour deux variétés de luzerne (Luisante et Europe) (Lemaire et Allirand, 1993).

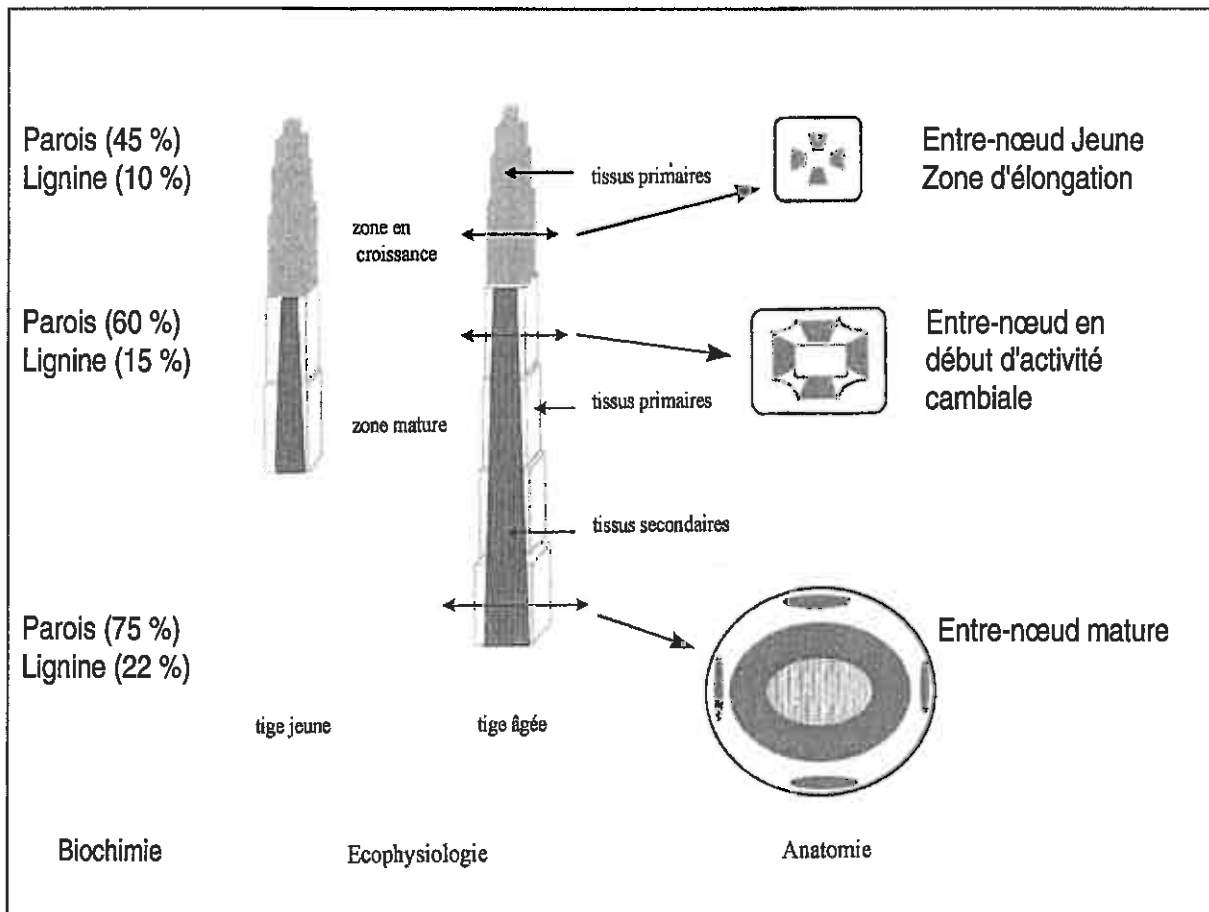


Figure 1.8 : Les différents niveaux d'étude de la tige : biochimique, écophysologique, et anatomique (Vallet, 1997)

pour un individu en fonction de la température et du rayonnement. Il prend en compte les lois d'action de la température gouvernant l'activité des méristèmes et la croissance des différents axes.

### 3. QUALITE DE LA LUZERNE

La structure aérienne du peuplement détermine sa valeur d'usage en terme de quantité et de valeur alimentaire de la biomasse récoltée, mais aussi en terme de souplesse d'exploitation, et de durée de vie au cours de son exploitation. La quantité de biomasse récoltée est liée à la croissance et à la structure des parties aériennes du peuplement. Dans le cas d'un fourrage, la qualité détermine les performances de l'animal auquel il est distribué (elle est fonction des concentrations en nutriments, de l'ingestibilité, et de la digestibilité).

#### 3.1. Valeur alimentaire de la luzerne

La valeur alimentaire d'un fourrage est définie comme le produit de la valeur nutritive et de la quantité de matière sèche ingérée volontairement par l'animal lorsqu'il est nourri *ad libitum* (ingestibilité). La valeur nutritive de la luzerne est limitée par sa valeur énergétique (Demarquilly, 1966). La valeur énergétique d'un fourrage est l'énergie nette utilisée par l'animal pour sa croissance et son entretien. Elle correspond à l'énergie brute apportée par le fourrage après avoir soustrait les pertes d'énergie par les fécès, les gaz, l'urine, la chaleur corporelle et elle est déterminée à partir de la digestibilité de la matière organique (la valeur énergétique est exprimée en unités fourragères (UF) ; une unité fourragère étant définie comme le rapport entre l'énergie nette du fourrage et l'énergie apportée par un kg d'orge : aliment de référence).

La digestibilité de la matière sèche est définie par le pourcentage de matière sèche ingérée par l'animal qui est dégradé lors du transit dans le tube digestif.

La valeur azotée représente la teneur en matières azotées digestibles. Les protéines qui sont dégradés de manière importante dans le rumen contribuent majoritairement à la croissance des microorganismes du rumen mais peuvent être également perdues sous forme d'ammoniaque (Howarth et al., 1977). Dans ce contexte, la dégradation extensive des protéines dans le rumen conduit à une diminution de la valorisation des protéines par l'animal. La situation la plus profitable pour l'animal est qu'une partie des protéines aille directement dans le petit intestin où elle pourrait être dégradée en acides aminés valorisables par l'animal. Les protéines insolubles passant directement dans l'intestin sont appelées protéines digestibles dans l'intestin (PDI) dans le système français et "escape protein" ou "by-pass protein" dans le système américain.



### 3.2. Relation entre croissance et qualité

La composition morphologique du couvert définie par le rapport feuilles-tiges (F/T) de la biomasse récoltée, et la composition histologique et biochimique des organes (teneur en fibres, en tissus lignifiés, en protéines,...) influe sur les deux composantes importantes de la valeur alimentaire : teneur en protéines et digestibilité (Wilman et Altimimi, 1984; Demarquilly, 1966). La digestibilité varie suivant le numéro des repousses et les années (Demarquilly, 1966). La teneur en protéines dépend du niveau de matière sèche accumulée, corrigé par le rapport F/T (Lemaire et al., 1985). La valeur alimentaire dépend également de la croissance (Greenwood et al., 1990; Lemaire et Allirand, 1993) et du génotype (Julier et Huyghe, 1997).

La digestibilité de la plante entière est liée à la hauteur des tiges dominantes (figure 1.7). Des grandes tiges auront des digestibilités plus faibles. La meilleure digestibilité observée de la variété Luisante est liée à la moindre taille des tiges. Il apparaît donc nécessaire de modifier la structure du peuplement en terme de hauteur de tiges et de leur nombre.

La croissance en hauteur de la tige peut être schématisée par l'ajout de segments matures à la base des tiges, de densité et de masse croissantes et de dégradabilité de plus en plus réduite conduisant à une diminution de la qualité globale des tiges (Vallet, 1997) (figure 1.8). Les teneurs en parois augmentent et contribuent à diminuer la digestibilité des tiges (Buxton et Russell, 1988; Sanderson et al., 1988; Broderick et Buxton, 1991). Cette fraction lignifiée diminue l'accessibilité des microorganismes aux polysaccharides (Jung et Deetz, 1993). Cette diminution de qualité globale est liée à une augmentation de 60% des concentrations en parois entre le stade début de bourgeonnement et le stade de formation des gousses (Albrecht et al., 1987). Dans les tiges courtes, les tissus jeunes en élongation sont très dégradables et représentent une part importante de la matière sèche des tiges. Quand la tige croît en hauteur, la partie en croissance représente une part décroissante de la matière sèche totale (Vallet, 1997). La qualité diminue par "dilution" des tissus primaires très digestibles dans des tissus secondaires de moins en moins dégradables (Vallet, 1997). Buxton et al. (1985) ont montré que les bas de tige de luzerne ont une digestibilité *in vitro* de la matière sèche inférieure à celle des hauts de tige. La digestibilité diminue en moyenne de 20 g/kg de matière sèche à chaque entre-nœud depuis le haut des tiges. La digestibilité des tiges change progressivement avec la maturité en même temps que la proportion de tiges dans le fourrage augmente.

Quant aux feuilles, leur digestibilité reste constante ou évolue très peu quelle que soit la maturité du fourrage (Terry et Tilley, 1964; Mowat et al., 1965; Albrecht et al., 1987). Les tiges de

luzerne même à des stades très précoces n'atteignent jamais les valeurs de digestibilité rencontrées pour les feuilles.

### 3.2.1. Modèles de prévision de la valeur alimentaire

Les modèles de prévision qui existent actuellement sont basés sur la description de la diminution des teneurs en matières azotées totales (MAT) ou de la digestibilité en fonction de l'âge de la repousse et en référence aux stades phénologiques de la plante.

Pour une variété donnée de luzerne, toute augmentation de croissance se traduit par une diminution de la teneur en azote de la matière sèche (N %) suivant la relation :

$$N \% = 4,8 (Msa)^{-0,32} \text{ avec } Msa : \text{ matière sèche aérienne (Lemaire et Allirand, 1993)}$$

La valeur énergétique de la luzerne est déterminée par sa composition morphologique et en particulier par le rapport feuilles/tiges (FT) suivant la relation :

$$FT = 1,7 (Msa)^{-0,6} \text{ (Lemaire et Allirand, 1993)}$$

Toute augmentation de production se traduit par une diminution du rapport FT (figure 1.9). Il est possible de relier la digestibilité (DIG) au pourcentage de feuilles dans le fourrage et au rapport FT suivant les relations suivantes :

$$DIG = 65,2 \times F\% + 36,5$$

$$DIG = [65,2 \times (FT) / (1+FT)] + 36,5$$

Lemaire et Allirand (1993) proposent d'améliorer génétiquement la qualité à niveau de productivité constante, en augmentant le nombre de tiges et en diminuant leur hauteur dans le peuplement. Cependant, d'après les connaissances sur les autres espèces, le maintien d'un nombre important de tiges de taille réduite peut se traduire par une diminution de la productivité du peuplement (Duru et Langlet, 1988). Ils proposent également de modifier la qualité intrinsèque des tiges de façon à obtenir une augmentation de digestibilité à hauteur constante.

Kalu et Fick (1981,1983) ont défini dix stades phénologiques de développement des tiges individuelles de luzerne (tableau 1.2) pour déterminer la qualité de la luzerne. Ils déterminent le poids des tiges d'un échantillon appartenant à un stade phénologique donné et ils déterminent le stade moyen par la relation

$$MSW = \sum_0^9 (S_i \cdot D_i / W), \text{ avec } MSW : \text{ Mean Stage by Weight, } S_i : \text{ le numéro du stade}$$

floral de 0 à 9,  $D_i$  : le poids sec des tiges au stade correspondant  $S_i$ , et  $W$  : le poids sec total des tiges de l'échantillon à tous les stades. Ce paramètre permet d'obtenir des équations de prédiction de la

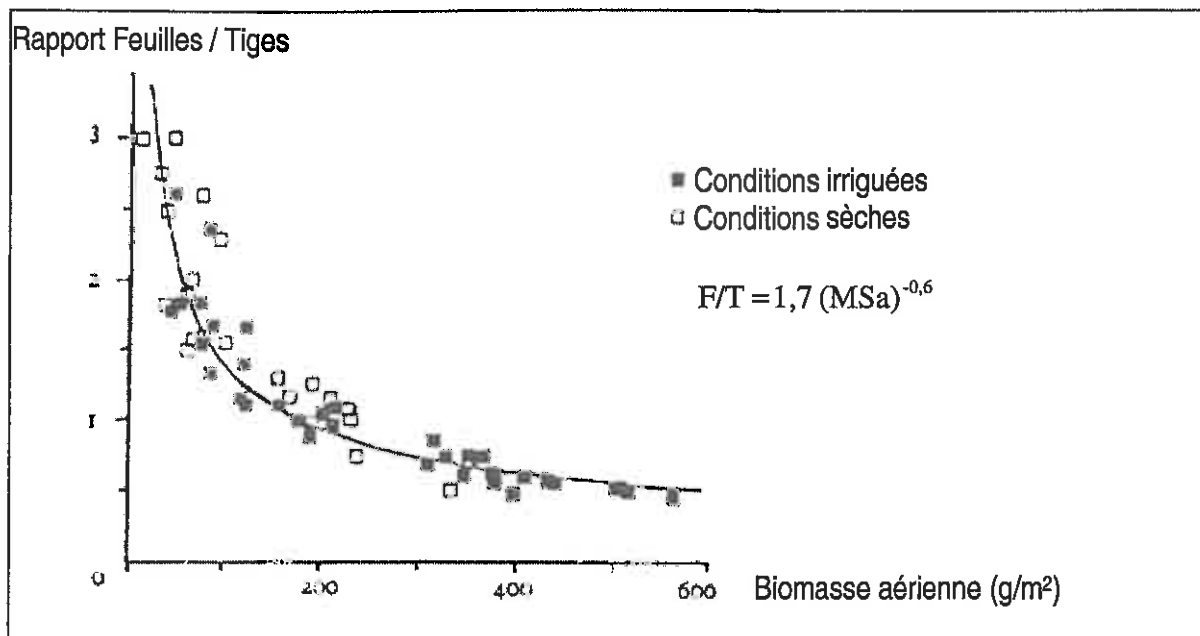


Figure 1.9 : Evolution du rapport feuilles/tiges (FT) au cours de repousses estivales de luzerne en fonction de la biomasse aérienne (Msa) en conditions irriguées ou sèches (Lemaire et Allirand, 1993).

Tableau 1.2 : Définition des stades morphologiques de développement de tiges individuelles de luzerne (d'après Kalu et Fick, 1983)

Stade	Nom du stade	Définition du stade
0	Végétatif jeune	Hauteur de tige $\leq 15$ cm; pas de bourgeons; fleurs, ou gosses
1	Végétatif moyen	Hauteur de tige 16 à 30 cm; pas de bourgeons; fleurs ou gosses
2	Végétatif vieux	Hauteur de tige $\geq 31$ cm; pas de bourgeons; fleurs ou gosses
3	Début bourgeonnement	1 à 2 nœuds avec bourgeons; pas de fleurs ou gosses
4	Fin bourgeonnement	$\geq 3$ nœuds avec des bourgeons; pas de fleurs ou gosses
5	Début floraison	1 nœud avec une fleur ouverte; pas de gosses
6	Fin floraison	$\geq 2$ nœuds avec des fleurs ouvertes;
7	Gosses jeunes	1 à 3 nœuds avec des gosses vertes
8	Gosses moyen	$\geq 4$ nœuds avec des gosses vertes
9	Gosses matures	nœuds avec des gosses matures brunes

digestibilité *in vitro* et de la teneur en azote (Onstad et Fick, 1983; Sanderson et Wedin, 1989; Fick et Janson, 1990).

### 3.3. Variabilité génétique et déterminisme génétique de la valeur alimentaire de la luzerne

Les programmes de sélection actuels visant à créer des variétés commerciales introduisent de plus en plus les aspects de valeur alimentaire pour améliorer la valeur énergétique de la luzerne.

Il existe un grand nombre de travaux sur la variabilité génétique de la digestibilité (mesurée *in vitro* par les techniques de solubilité enzymatique et par les techniques de digestion dans du jus de rumen) et des caractères associés telles que les teneurs en NDF (Neutral Detergent Fibre ou teneur en fibres), ADF (Acid Detergent Fibre ou teneur en hémicellulose+lignines), ADL (Acid Detergent Lignin ou teneur en lignines), teneur en lignines des parois. Ces différents travaux ont montré qu'il existe une gamme importante de variabilité génétique entre variétés pour la digestibilité et les autres caractères de qualité (Heinrichs et Troelsen, 1965; Heinrichs et al., 1969; Hill et Barnes, 1977; Buxton et al., 1987; Lenssen et al., 1991; Julier et al., 1995; Julier et al., 1996; Emile et al., 1997; Julier et al., 1999).

Les variétés de luzerne sont des populations synthétiques (voir explication dans le paragraphe 1.5 La sélection de la luzerne). Par ailleurs, l'allogamie de l'espèce et l'autotétraploïdie contribuent fortement à générer une variabilité génétique intra-population ou intra-variété importante. Julier et al. (2000) ont mis en évidence une variabilité génétique importante pour les caractères associés à la qualité : NDF, ADL, digestibilité, teneur en lignine des parois dans un échantillon de 11 populations représentées par des origines géographiques très diverses. Dans cet échantillon de 11 populations, la variance intra-population pour la digestibilité était aussi importante que la variabilité entre populations. La variance génétique intra-population représentait de 31 à 70% de la variance génétique totale dans cette étude et de 51 à 97% dans une étude comprenant 5 populations (Heinrichs et al., 1969).

S'il existe de nombreux travaux sur la variabilité génétique de la digestibilité, on trouve également quelques travaux sur le déterminisme génétique du caractère. En parallèle des travaux développés dans cette thèse, le déterminisme génétique de la digestibilité et de ses composantes a été étudié (Guines et al., 2002). Ces travaux ont mis en évidence l'importance de l'aptitude générale à la combinaison et la nature additive de la transmission du caractère de digestibilité et de ses caractères associés à la fois dans un dispositif dialléle 7x7 composé de 7 parents choisis chacun dans 7 populations différentes, et dans un dispositif factoriel 7x7 dont les 14 parents ont été choisis dans la population "Flamande". D'autres études génétiques ont été menées sur la digestibilité *in vitro* de la matière sèche (DMS), les teneurs en NDF, ADF et lignines, et sur la dégradabilité des protéines. Neff et

Simon (1986) ont montré que l'héritabilité au sens strict de la digestibilité de la matière organique (DMO) était de 0,84 en première année d'implantation de la luzerne et de 0 en deuxième année dans un dispositif diallèle impliquant 12 clones de luzerne comme parents. Ils ont également mis en évidence que l'hérédité de la digestibilité était principalement additive. Dans un dispositif polycross, ils ont observé une héritabilité au sens strict de l'ordre de 0,43 à 0,80 de la digestibilité de la matière organique. Hill et Barnes (1977) dans un dispositif de 4 diallèles déconnectés impliquant 5 parents choisis dans deux populations différentes ont trouvé des valeurs d'héritabilité au sens large relativement élevées pour les teneurs en lignines (0,48) et en protéines (0,64), mais au contraire des valeurs faibles pour la DMS (0,08). Ils en ont conclu d'après cette faible valeur d'héritabilité qu'aucune réponse à la sélection ne pouvait être attendue pour la DMS. Cependant les valeurs obtenues dans notre étude (Guines et al., 2002) montrent que l'héritabilité au sens strict est de 0,33 pour la DMS mesurée par la technique de solubilité enzymatique, 0,26 pour l'ADL, 0,39 pour le NDF et 0,38 pour l'ADF. Nous en avons conclu que les teneurs en NDF et en ADF sont des critères plus adaptés que la solubilité enzymatique dans un programme de sélection pour améliorer la valeur alimentaire. Même si les valeurs d'héritabilité sont relativement faibles, et compte tenu de la nature additive de la transmission des caractères, il existe une possibilité d'améliorer la valeur alimentaire.

#### 3.4. Sélection pour la valeur alimentaire

S'il existe une variabilité génétique importante pour la digestibilité de la luzerne et des caractères associés, il est possible d'améliorer ce caractère par sélection dans des dispositifs adaptés. Dans le passé, la sélection pour l'amélioration de la qualité du fourrage était basée sur la totalité du fourrage. Cependant, il existe une grande différence de qualité entre les feuilles et les tiges. C'est pourquoi, plus récemment la sélection pour améliorer la valeur alimentaire du fourrage s'est tournée vers l'amélioration de la qualité des tiges (Buxton, 1986).

Les gains génétiques pour la digestibilité *in vitro* de la matière sèche (DMS) ont atteint 0,7 à 4,7% par an (Casler, 2001) pour les fourrages en général. La sélection visant à améliorer la valeur alimentaire est souvent associée à des pertes de rendement, de résistance aux maladies, et de tolérance aux divers stress. Ces caractères peuvent être corrigés par une pression de sélection concomitante dans les programmes de sélection.

Une réduction génétique de la concentration en NDF entraîne une augmentation de la DMS (Shenk et Elliott, 1970; Casler, 2001). Cependant il a été observé chez des graminées que l'inverse n'est pas forcément vrai, la sélection pour une forte DMS ne conduit pas forcément à une diminution de la concentration en NDF et agit probablement sur des gènes contrôlant les concentrations ou

composition de lignine. De plus, la réduction des teneurs en NDF ne joue pas sur la digestibilité de la fraction NDF. L'augmentation observée de la DMS associée à une réduction de la fraction NDF résulte d'un phénomène de dilution dans lequel une concentration en sucres solubles hautement digestible est augmentée (Casler, 2000). Coors et al. (1986) après un cycle de sélection pour la valeur alimentaire de la luzerne ont obtenu une réduction des concentrations en parois totales, en lignine, et en quantité de parois lignifiées et une augmentation en protéines, hémicelluloses, digestibilité *in vitro* dans trois des quatre populations testées. Shenk et Elliott (1970) ont obtenu une réponse à la sélection pour la dégradation *in vitro* de la matière sèche après deux cycles de sélection divergente. Après une sélection pour de faibles concentrations en ADL dans le fourrage entier Jung et al. (1994) ont observé une augmentation de la teneur en lignine des parois des tiges.

Un certain nombre de travaux de sélection ont porté sur les modifications morphologiques obtenues après sélection pour augmenter la digestibilité. Kephart et al. (1990) après une sélection divergente pour la teneur en lignine du fourrage, ont montré que les génotypes sélectionnés pour une teneur en lignine plus faible avaient un rapport feuilles/tiges plus important, des tiges plus courtes, un rendement plus faible et un développement plus précoce. Le rapport feuilles /tiges étant plus important, la digestibilité est améliorée par "dilution" de la fraction NDF des tiges. Par ailleurs, les génotypes ayant une forte concentration en lignine présentaient des concentrations en NDF plus importantes dans les bas de tiges et dans la plante entière que les lignées sélectionnées pour une faible concentration en lignine. Kephart et al. (1990) ont observé pour les deux types de génotypes sélectionnés pour de fortes ou de faibles concentrations en lignine, des concentrations en NDF plus importantes en bas des tiges mais pas de différences entre génotypes en haut des tiges. Par contre, en ce qui concerne les concentrations en lignine des tiges, ils ont observé de plus fortes concentrations pour les génotypes sélectionnés pour de faibles concentrations en ADL que ce soit en haut ou en bas des tiges. La concentration en lignine ne paraît donc pas être le facteur principal limitant la digestibilité *in vitro* mais la concentration en NDF (Kephart et al., 1990). Shenk et Elliott (1970) ont également montré que des génotypes sélectionnés pour une forte digestibilité *in vitro* avaient de faibles concentrations en NDF et de plus fortes proportions de feuilles que les lignées sélectionnées pour une faible digestibilité *in vitro*. Shenk et Elliot (1971) ont montré grâce à des études histologiques de tiges de luzerne, que le nombre de faisceaux vasculaires était plus élevé dans des lignées sélectionnées pour une digestibilité élevée. Ceci suggère que l'augmentation du rapport feuilles/tiges dans les génotypes sélectionnés pour leur faible teneur en lignine, requiert plus de support vasculaire, ce qui pourrait expliquer la concentration plus importante de lignine dans les parois (Kephart et al., 1990). Ils suggèrent qu'une altération de la composition et l'arrangement tissulaire au sein des tiges en ayant un cambium moins actif et en



substituant l'anneau continu de xylème lignifié par des faisceaux isolés serait une des approches possibles pour améliorer la digestibilité. Une autre voie serait de développer des plantes ayant une vitesse de croissance des tiges très rapide qui pourraient être récoltées à un stade précoce.

Ces résultats montrent que non seulement la sélection pour améliorer la qualité du fourrage a un effet sur la morphologie de la plante (rapport feuilles/tiges, longueur des tiges), mais aussi un effet sur les composants des parois et sur l'agencement des tissus au sein des tiges.

## 4. ANATOMIE DES TIGES DE LUZERNE

### 4.1. Morphologie des tiges de luzerne et organisation tissulaire

#### 4.1.1. Morphogenèse et morphologie de la tige

La tige est schématiquement un axe feuillé dressé pourvu à son sommet d'un méristème apical. Chaque unité morphologique nommée phytomère est une entité constituée d'une feuille trifoliolée, d'un bourgeon axillaire et de l'entre-nœud sous-jacent (Bell, 1993). Dans ce travail, nous parlerons d'entre-nœuds pour définir la partie de tige située entre deux nœuds, le nœud étant défini comme l'endroit où s'insère la feuille. Les entre-nœuds sont le résultat d'une croissance dite intercalaire. Ils sont à l'origine de la croissance en hauteur de la tige et d'élévation des organes photosynthétiques pour une interception optimale de la lumière et l'élévation des organes reproducteurs pour assurer une bonne pollinisation (Morrison et al., 1994). Vallet (1997) a décrit la croissance de la tige comme étant le résultat d'un empilement d'unités morphologiques (entre-nœuds) dont les caractéristiques varient au cours de la croissance. La vitesse d'apparition des entre-nœuds est dépendante de la température. Dans un premier temps la feuille se développe puis intercepte la lumière pour la photosynthèse, les assimilats produits servent à la croissance de l'entre-nœud. Celle-ci ne commence que lorsque la feuille a atteint sa taille maximale. La croissance en longueur et en épaisseur résulte du fonctionnement de diverses zones bien définies appelées méristèmes. Il existe différents types de méristèmes : les méristèmes primaires (apicaux, méristèmes intercalaires caulinaires) responsables de la mise en place des tissus primaires, et les méristèmes secondaires cambiaux responsables de la mise en place des tissus secondaires de phloème et de xylème.

Le mécanisme d'élongation des entre-nœuds est similaire chez les monocotylédones et les dicotylédones. Le développement est acropétale chez les dicotylédones (c'est à dire que le méristème intercalaire est en haut de l'entre-nœud) et basipétale chez les monocotylédones (le méristème apical se trouve à la base de l'entre-nœud) (Evans, 1965; Kaufman et al., 1965). L'étude de Vallet (1997) sur l'évolution des entre-nœuds de luzerne depuis leur apparition jusqu'à leur maturation a permis de mettre

en évidence deux phases au cours du cycle de croissance. La première appelée phase d'élongation est caractérisée par la multiplication et la croissance cellulaire et est influencée par la température. La zone de croissance en longueur (croissance primaire) des tiges est caractérisée par une augmentation rapide de la longueur, du diamètre et du volume des 4 premiers entre-nœuds et a une longueur de 10 cm relativement constante d'une coupe à l'autre. La deuxième phase est appelée phase cambiale ou mature. Elle débute dès l'entre-nœud 5 et correspond à des phytomères ayant terminé leur croissance en longueur et commençant leur croissance secondaire. Les entre-nœuds sont caractérisés par une croissance en diamètre qui résulte d'une augmentation du compartiment parois (teneurs en parois, lignines, xylose et glucose) qui se traduit par le dépôt des parois secondaires dans les tissus mis en place par le cambium (xylème et phloème secondaire) (Vallet, 1997). La température agit sur la vitesse de croissance et la maturation des tiges avec une perte de qualité. Pour un entre-nœud donné, le diamètre est plus élevé à basse température (Wilson et al., 1991). Par contre, à même âge, les entre-nœuds ont un diamètre constant dans la zone mature quelle que soit la température considérée (15°C et 23 °C) (Vallet, 1997).

#### 4.1.2. Histologie de la tige

##### 4.1.2.1. Le système vasculaire des tiges

Les feuilles se développent à partir d'émergences situées sur les flancs du méristème. Ce développement induit la mise en place d'éléments conducteurs dans le cylindre méristématique. Les cordons procambiaux apparaissent, dans le sens d'allongement de la tige, d'où partent les ramifications dans les ébauches foliaires. Ces cordons procambiaux vont se différencier en faisceaux conducteurs de la sève brute ou protoxylème et conducteurs de la sève élaborée ou protophloème formé par les tubes criblés et les cellules-compagnes. Les tissus conducteurs de la tige sont associés en faisceaux. Ces faisceaux sont formés par deux tissus : le xylème et le phloème. On parle de faisceau mixte ou collatéral.

Le système vasculaire des spermatophytes pris dans sa globalité, est formé par un canal conducteur qui va de la racine jusqu'à la tige dans le sens de l'axe. Il est continu dans les feuilles et les ramifications par le biais de prolongements de l'axe principal de la tige (Winter, 2001). Chez les dicotylédones herbacées, les faisceaux sont reliés entre eux et forment un réseau. Au niveau d'insertion des feuilles, les cordons vasculaires dérivent des faisceaux de la tige pour se diriger vers les feuilles (Hayward, 1938). Cet ensemble forme une trace foliaire.



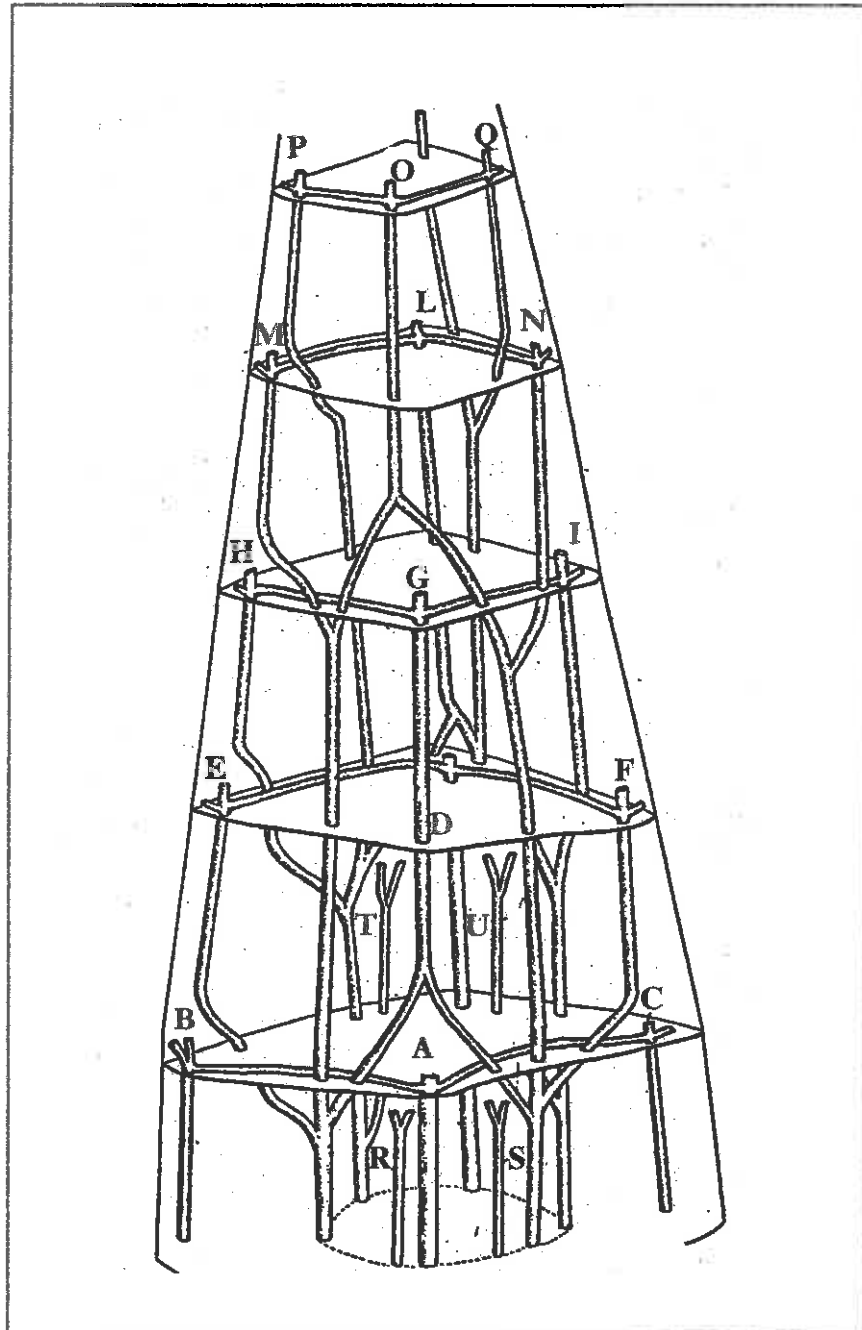


Figure 1.10 : Représentation schématique des faisceaux près de l'apex de tige montrant l'anatomie vasculaire de 5 entre-nœuds chez *Medicago lathyris*. Chaque feuille est fournie par un faisceau médian et 2 faisceaux latéraux. La phyllotaxie alternée des feuilles est indiquée par le départ des traces foliaires ABC, DEF, GHI, LMN, OPQ. Les faisceaux R, S, T et U fournissent les bourgeons axillaires (d'après Nägeli, 1858, dans Hayward, 1938).

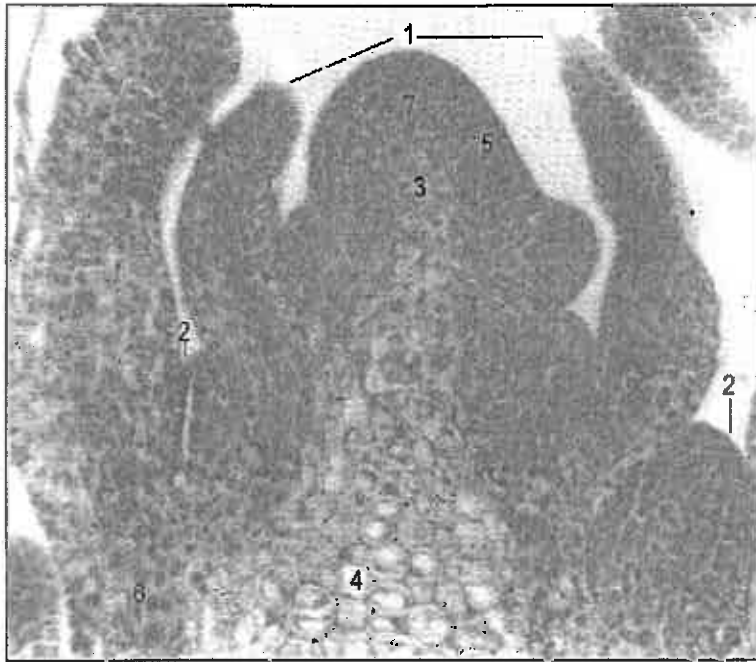
Nägeli (1858) a classifié le genre *Medicago*, sur la base de sa phyllotaxie et de l'anatomie vasculaire, dans le type où les feuilles sont alternées en deux lignes et la trace foliaire consiste en trois faisceaux par ligne qui alternent d'un nœud à l'autre (Winter, 2001) (figure 1.10). Le faisceau médian se divise à la base de chaque feuille en trois ramifications dont la plus petite entre dans le pétiole, pendant que les ramifications latérales forment les stipules. Le faisceau médian (O) descend à travers deux entre-nœuds sans se ramifier, puis se divise en deux ramifications qui rejoignent les faisceaux latéraux (M et N) de la ligne de traces foliaires suivantes. Le bourgeon axillaire est fourni par deux faisceaux s'allongeant séparément à travers un entre-nœud, et rejoint les faisceaux latéraux au niveau du nœud suivant produisant la feuille suivante. Le nombre de faisceaux augmente donc avec le nombre de feuilles.

#### 4.1.2.2. Différenciation des tissus et structures primaires de la tige

La luzerne a une croissance indéterminée : ses méristèmes ont une potentialité de croissance illimitée. Par conséquent, ses organes végétatifs s'allongent continuellement par croissance apicale accompagnée d'une augmentation en diamètre, et donc en volume. Les cellules qui se différencient au sein des zones apicales pour constituer les tissus primaires de la tige (xylème et phloème primaire, collenchyme, sclérenchyme, parenchyme) sont initiées dans les méristèmes des extrémités caulinaires (figure 1.11). Les feuilles et les bourgeons se développent sur les flancs du point végétatif caulinaire. Les apex caulinaires sont formés de cellules méristématiques médullaires et de cellules méristématiques de flanc. Chez les dicotylédones, le méristème médullaire va former le tissu primaire central ou encore moelle, et le méristème du flanc va former l'épiderme, le cortex et le procambium (ou futur cambium) (Nultsch, 1998) à l'origine du xylème et du phloème primaire.

#### 4.1.2.3. Croissance en épaisseur

Lorsque l'entre-nœud a atteint sa croissance maximale en longueur, et pour générer l'épaississement secondaire (croissance en épaisseur) dans la tige en maturation, un cambium ou zone génératrice libéro-ligneuse se met en place, en une assise continue entre les faisceaux de xylème et phloème primaire. Le cambium produit un xylème secondaire ou bois, vers l'intérieur et un phloème secondaire ou liber vers l'extérieur. L'ensemble de ces productions secondaires forme un manchon cylindrique. Dans le cas de la luzerne, le cambium est en position interfasciculaire et dérive des rayons de parenchyme qui retrouvent leur capacité de division : c'est donc un méristème secondaire. Le cambium se présente sous la forme d'une assise cylindrique annulaire de cellules cambiales avec une vacuole développée. Ces cellules, dont les extrémités se terminent en pointe sont appelées les cellules fusiformes.



- 1 Primordiums foliaires
- 2 Primordiums des bourgeons
- 3 Méristèmes médullaires
- 4 Moelle
- 5 Méristème de flanc
- 6 Procambium
- 7 Méristème apical

Figure 1.11 : Coupe longitudinale radiale du point végétatif caulinnaire de luzerne (d'après Dobrenz et al., 1965, cité dans Teuber et Brick, 1988).

#### 4.1.2.4. Evolution de l'histologie avec la croissance

Les jeunes tiges de luzerne sont pratiquement carrées avec une large zone de moelle ou parenchyme médullaire au centre, arrangé de façon compacte (figure 1.12). Les gros faisceaux conducteurs sont situés au niveau des angles de la tige avec des plus petits dans les intervalles. Les faisceaux sont constitués de phloème, qui est limité à l'extérieur par des fibres à parois épaisses du sclérenchyme. Le sclérenchyme avec les éléments du xylème et le collenchyme constituent le système de résistance mécanique de la tige. Les éléments du xylème primaire sont constitués d'éléments spiralés et le xylème secondaire, quant à lui est constitué par des travées de vaisseaux séparés par des fibres et du parenchyme. Le cortex est limité de manière centripète par les cellules de l'endoderme qui sont facilement reconnaissables par leur taille et leur contenu en amidon. Les angles de la jeune tige sont renforcés par du collenchyme dont les angles des cellules présentent des parois épaisses. Les cellules de l'épiderme sont allongées dans la direction axiale et ont une forme irrégulière. Avec l'achèvement des faisceaux conducteurs, se termine la différenciation des éléments de soutien de la tige. Ces éléments peuvent former une gaine sclérenchymateuse associée aux faisceaux conducteurs. L'écorce est un nom non technique qui définit l'ensemble du phloème primaire et du cortex, dans le cas de tiges ne possédant que des tissus primaires. Dans le cas où les tiges possèdent de tissus secondaires, l'écorce définit l'ensemble du phloème primaire et secondaire, le cortex et le périoderme (Esau, 1965).

Les tiges âgées ou les bas de tiges sont caractérisés par un cambium qui devient continu et forme un manchon de xylème secondaire vers l'intérieur et de phloème vers l'extérieur (Figure 1.13). Les entre-nœuds des bas des tiges sont ronds. Au cours de la maturation des tiges, des cellules parenchymateuses du côté interne des faisceaux peuvent devenir lignifiées, formant ainsi une zone continue de tissus en liaison avec le tissu formé par le cambium interfasciculaire. Par contre les cellules parenchymateuses de la moelle peuvent se rompre de telle sorte que la tige mature est souvent creuse. Lorsque la tige devient mature, le périoderme vient renforcer l'épiderme. C'est un tissu protecteur d'origine secondaire.

Jewett et Barnes (1992) ont montré qu'il existe de la variabilité génétique pour les structures histologiques des tiges de luzerne dans une étude incluant 12 populations. Ils ont montré que le nombre de faisceaux vasculaires, le rapport entre le diamètre de la moelle et de la tige, le pourcentage de surface lignifiée dans la tige étaient les caractères les plus adaptés pour montrer des différences parmi les populations étudiées. Ils ont également montré des corrélations significatives entre ces caractères et les teneurs en NDF, en ADF et la digestibilité *in vitro* de la matière sèche. De plus, l'évaluation de la

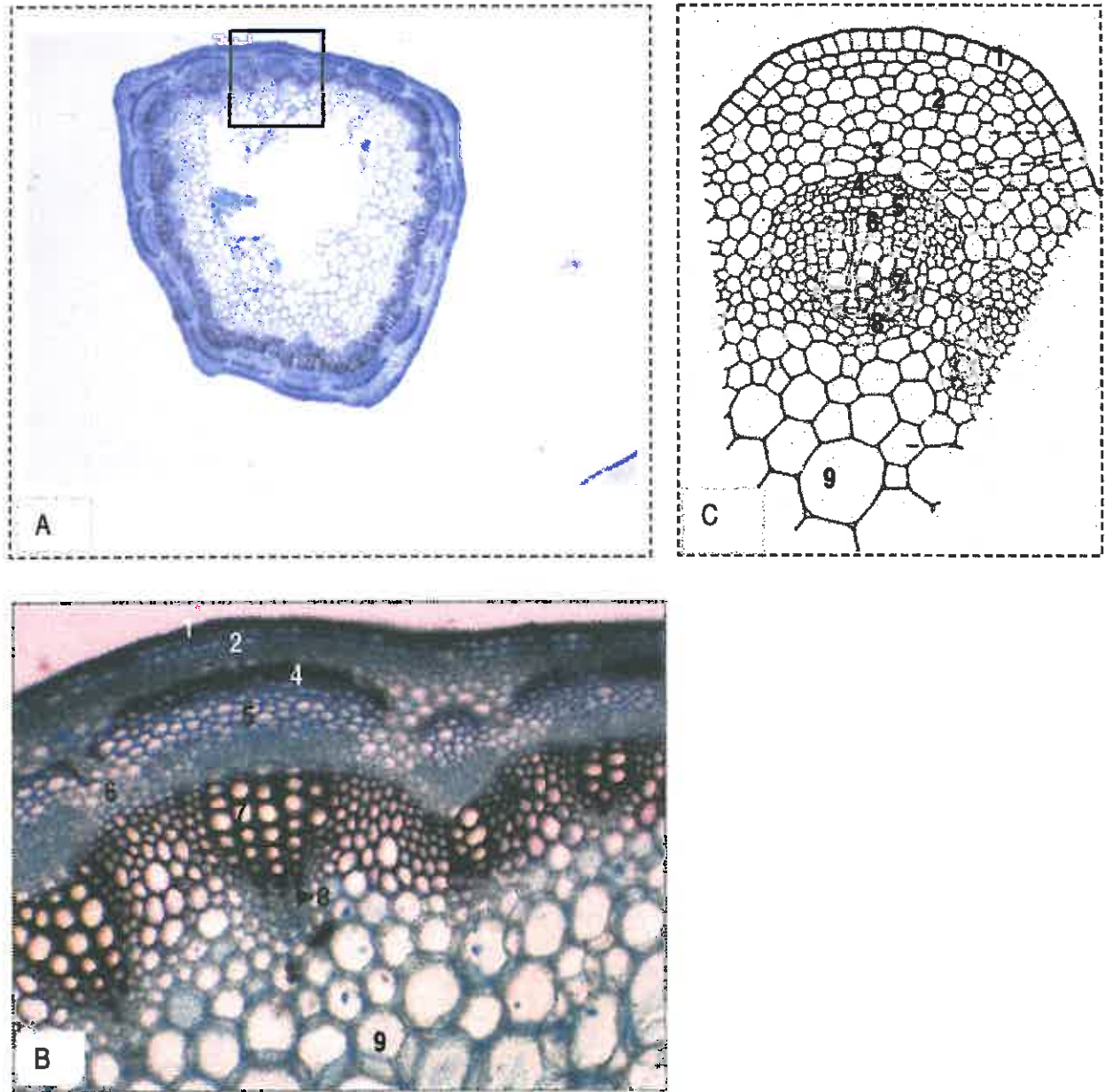


Figure 1.12 : A- Image d'une coupe transversale de jeune tige de luzerne (X 30). B- Détail d'un faisceau au grossissement X 200, C- Schéma d'un faisceau : 1 épiderme, 2 Collenchyme, 3 Endoderme, 4 Fibres supraphloémiennes, 5 Phloème, 6 Cambium, 7 Xylème secondaire, 8 Xylème primaire, 9 Parenchyme médullaire ou moelle (d'après Hayward, 1938)

descendance d'un croisement factoriel a montré des effets additifs pour l'hérédité du nombre de faisceaux vasculaires, et le rapport entre le diamètre de la moelle et de la tige.

#### 4.1.3. Description et rôles des différents tissus

Comme énoncé aux paragraphes précédents, il existe divers types tissulaires mis en place pour assurer une ou des fonctions spécifiques. Certains d'entre eux ont un rôle de revêtement, d'autres ont un rôle de soutien, de conduction et/ou de stockage de nutriments.

##### 4.1.3.1. L'épiderme

L'épiderme est un tissu de revêtement dont la paroi externe lignifiée et recouverte par une cuticule est très épaisse (Wilson, 1993). La présence de cutine à la surface des cellules rend l'épiderme imperméable et permet de conserver son eau. L'épiderme a également un rôle dans la transpiration, la protection mécanique, les échanges gazeux par l'intermédiaire des stomates, dans le stockage d'eau et de produits métaboliques (Esau, 1965). L'épiderme remplit également des fonctions de photosynthèse, de sécrétion, d'absorption, et de perception des stimuli. La surface externe de l'épiderme est rendue inaccessible à la digestion microbienne sauf par les stomates ou les brèches causées par la préhension ou la mastication (Monson et al., 1972).

##### 4.1.3.2. Le collenchyme

Le collenchyme est un tissu vivant composé de cellules allongées avec une paroi épaisse non lignifiée. La fonction primaire de ce tissu est le soutien (grâce à son arrangement au sein des autres tissus de la plante) des organes en croissance (Esau, 1965). L'épaississement de ses parois commence avant la fin de l'expansion cellulaire et est plus important si la plante est soumise à des contraintes mécaniques pendant son développement (Walker, 1960).

##### 4.1.3.3. Les fibres supraphloémiennes

Ces fibres sont de longues cellules (de l'ordre de 1200  $\mu\text{m}$  de long, Lawton et al., 1979) et étroites (5 - 20  $\mu\text{m}$  de diamètre). Elles possèdent des protoplastes morts, c'est ce qui les différencie du collenchyme et du parenchyme (Esau, 1965). Ces fibres sont constituées de cellules à parois épaisses, souvent lignifiées. Elles se situent dans le cortex de la tige au-dessus du phloème. Ces fibres ont essentiellement une fonction mécanique de soutien.



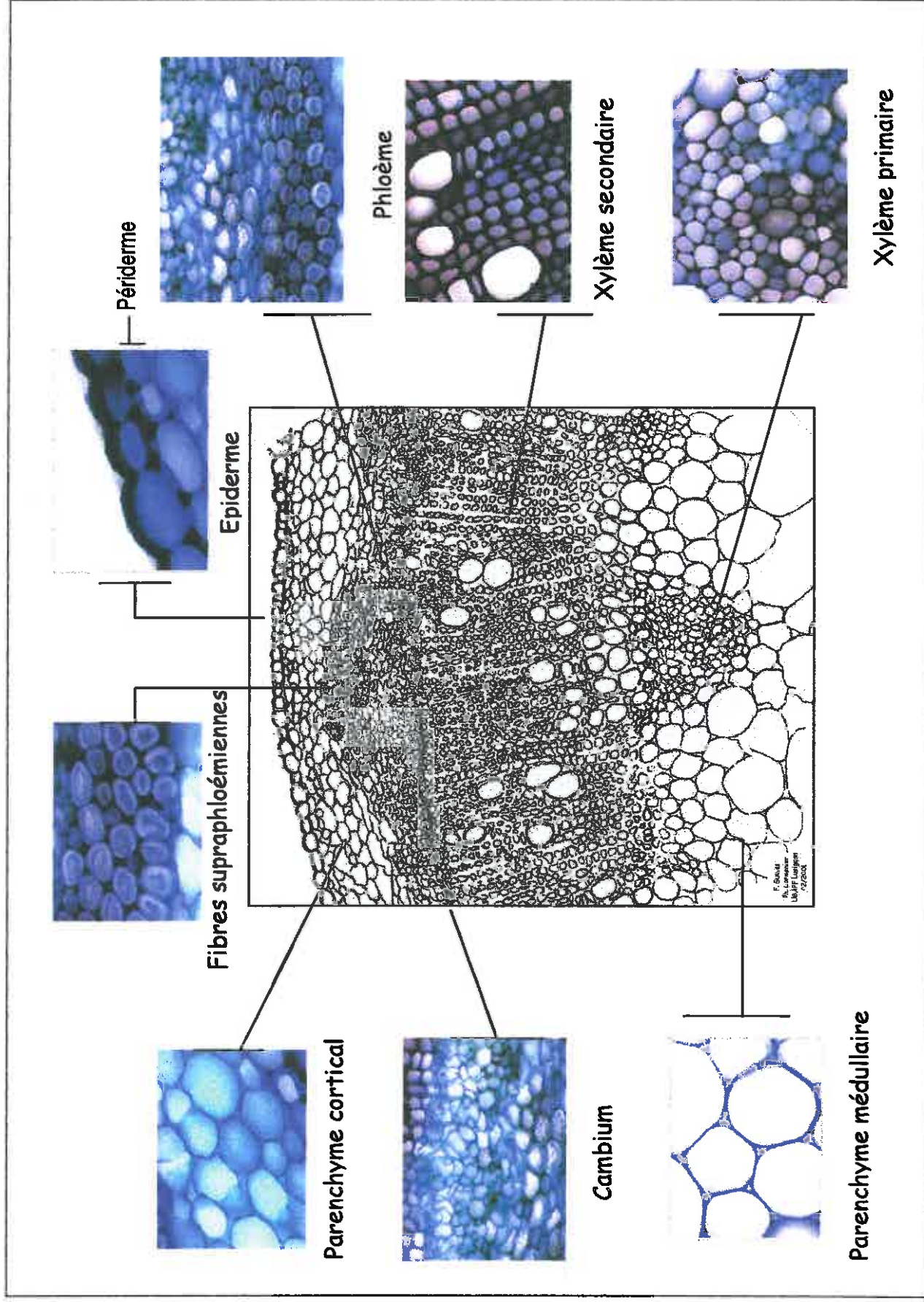


Figure 1.13 : Schéma d'un faisceau de tige de luzerne mature (adapté de Hayward, 1938). Les illustrations photographiques sont prises au microscope à un objectif X10

#### 4.1.3.4. Le phloème

Le phloème peut être d'origine primaire ou secondaire. C'est un tissu très hétérogène et complexe, constitué par des éléments criblés, du parenchyme, des fibres, et des cellules compagnes. Les tubes criblés sont disposés en rangées verticales et sont associés aux cellules compagnes et parenchymateuses (figure 1.14). Les cellules compagnes fournissent l'ATP aux tubes criblés et les cellules parenchymateuses ont un rôle intermédiaire de réserve. Le phloème est en évolution constante. Les cellules conductrices communiquent entre elles par des pores regroupés en plage. Les cellules de soutien sont des fibres. Le phloème permet le transport rapide (environ 1 mètre par heure) de la sève élaborée (sève phloémienne ou descendante) qui contient jusqu'à 250 mg par litre de sucres, d'autres substances nutritives et d'hormones végétales.

#### 4.1.3.5. Le xylème

Le terme xylème a été introduit par Nägeli (1858) et dérive du grec *xylos* qui signifie bois. Le xylème primaire est formé par du métaxylème et du protoxylème. Le protoxylème est le tissu qui apparaît au début de la différenciation vasculaire. Le métaxylème apparaît ensuite au cours du processus de différenciation lorsque la tige est en élongation et devient mature lorsque l'élongation est terminée. Le xylème est composé d'éléments lignifiés, pouvant contenir des fibres, des vaisseaux et des cellules du parenchyme (Esau, 1965; Grenet, 1997). Les trachéides et les vaisseaux du xylème sont des éléments lignifiés conducteurs de l'eau. Certains éléments des trachéides sont également impliqués dans le soutien. Ces cellules sont constituées par des unités cellulaires distinctes, perforées, réticulées, plus larges que les cellules voisines, allongées et placées verticalement les unes au bout des autres. Elles communiquent entre elles par leurs parois terminales perforées. Le xylème a pour fonction de conduire la sève brute (on parle aussi de sève xylémienne ascendante) et l'eau. Le xylème a également un rôle de stockage dans les cellules parenchymateuses rangées en files verticales, et dans le xylème secondaire en forme de rayons. Les fibres et les sclérites du xylème ont un rôle de soutien et de stockage de l'amidon (Esau, 1965). Les sclérites sont différenciées à partir d'éléments parenchymateux. Dans le xylème primaire, au niveau des trachéides il existe plusieurs types de développement de la paroi secondaire ce qui définit les différents types d'éléments des trachéides (Figure 1.15). Le dépôt successif d'éléments en anneau définit l'épaississement secondaire annelé; le dépôt en hélice continu définit le type spiralé, et l'épaississement en réseau constitue les types réticulés (Esau, 1965). Dans les éléments scalariformes, la paroi secondaire recouvre au moins la moitié de la paroi primaire et les ponctuations sont allongées horizontalement.



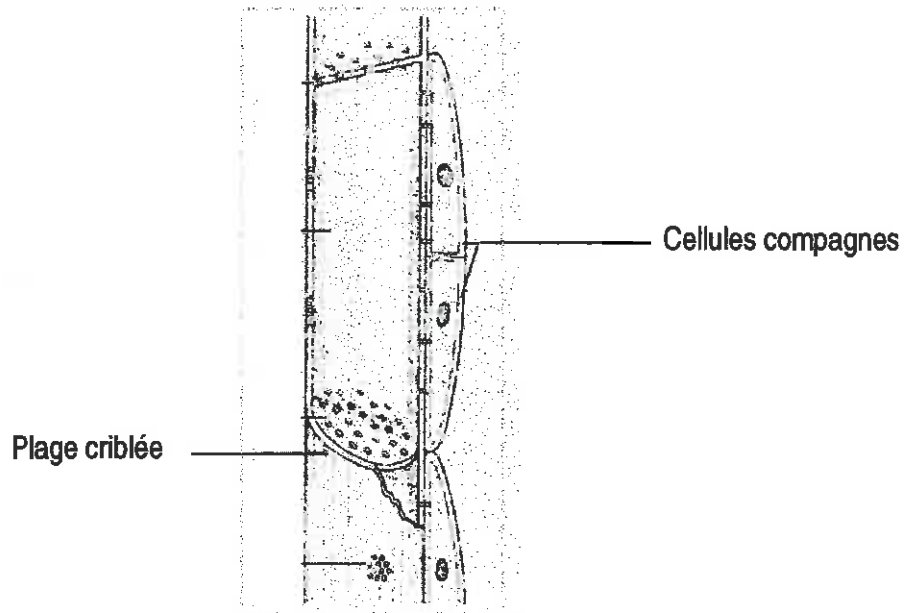


Figure 1.14 : Schéma d'un tube criblé du phloème en coupe longitudinale (adapté de Nultsch, 1998).

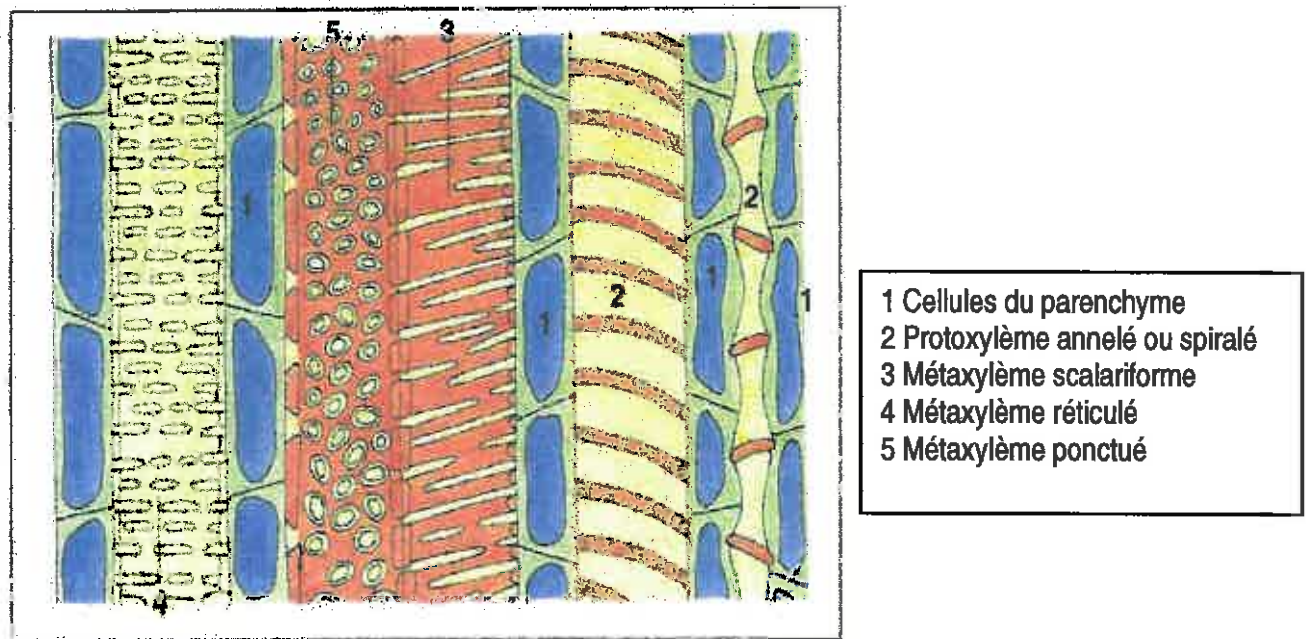


Figure 1.15 : Schéma d'une coupe longitudinale dans le xylème primaire d'une dicotylédone. (Bowes, 1996)

Le xylème et le phloème constituent les faisceaux conducteurs des tiges. Ensemble, ils forment ce que l'on appelle les tissus vasculaires.

#### 4.1.3.6. Le parenchyme

Les cellules du parenchyme ont une paroi pectocellulosique mince et une grosse vacuole. Elles forment un tissu continu dans le cortex, dans la moëlle, et le mésophylle foliaire, tandis qu'elles s'organisent en faisceaux verticaux et horizontaux dans le système conducteur. Dans les tiges des légumineuses, le parenchyme médullaire ne se lignifie pas (Akin et Robinson, 1982) et il est complètement digestible. Jung et Engels (2002) ont observé un épaissement léger des parois secondaires avec une lignification progressive "légère" dans les cellules du parenchyme médullaire allant des cellules à proximité du xylème vers les cellules du centre de la moëlle. Cependant chez les graminées il a été observé que les cellules du parenchyme développent une paroi secondaire épaisse pouvant se lignifier (Wilson et al., 1989). La lignification débute à la fin de l'élongation cellulaire. Cependant, le parenchyme n'est pas un tissu important dans la rigidité des tiges ou des feuilles car il est localisé au centre de la tige et à l'intérieur des tissus (Wilson, 1993).

Les caractéristiques de chacun des tissus et leurs rôles sont résumés dans le tableau 1.3 et une illustration photographique (figure 1.13) accompagne la description d'un faisceau conducteur en bas de tige (tissu âgé).

#### 4.1.4. Facteurs influençant la différenciation des tissus vasculaires

La complexité de la différenciation des tissus vasculaires a soulevé un grand nombre de questions sur les mécanismes possibles pouvant la contrôler et il existe un grand nombre de publications sur le sujet (Shininger, 1979; Sachs, 1981; Roberts et Miller, 1982; Groover et Jones, 1999).

##### 4.1.4.1. Signaux biochimiques contrôlant la différenciation du phloème et du xylème

La morphogénèse des plantes est gouvernée par la division cellulaire et l'expansion cellulaire. De nombreuses expériences suggèrent une régulation hormonale.

##### ◆ Induction par les feuilles et par l'auxine

Le développement des bourgeons et des jeunes feuilles stimule l'activation du cambium et la formation de phloème et de xylème (Shininger, 1979) dans les tiges.

Tableau 1.3 : Description des différents types tissulaires et types cellulaires correspondants, des tiges de légumineuses, et leurs fonctions

<i>Tissu</i>	<i>Composition cellulaire</i>	<i>Parois/lignification</i>	<i>Fonctions</i>
<b>Epiderme</b>		Paroi épaisse cutinisée	Transpiration, protection mécanique, échanges gazeux
<b>Collenchyme</b>	Cellules allongées	Paroi épaisse non lignifiée	Soutien des organes en croissance
<b>Fibres supraphloémiennes</b>	Fibres	Parois épaisses lignifiées primaires et secondaires	Fonction mécanique de soutien
<b>Parenchyme</b>	Cellule avec vacuole grosse	Parois pecto-cellulosiques minces non lignifiées	Stockage, photosynthèse
<b>Xylème</b>	Vaisseaux / trachéides	Secondaires lignifiées	Rôle mécanique et transport de la sève brute
	Parenchyme	Secondaires lignifiées	Réserve, stockage
	Fibres	Secondaires lignifiées	Soutien
<b>Phloème</b>	Fibres	Secondaires plus ou moins lignifiées	Soutien
	Cellules compagnes	Primaires minces	Fournit l'ATP aux tubes criblés
	Cellules parenchymateuses	Primaires minces	Réserve
	Tubes criblés	parois épaisses	Transport de nutriments

D'une manière générale, l'auxine et la gibérelline contrôlent l'activité cambiale (Aloni, 1987). L'auxine (ou Indole-3-acetic-acid; IAA), hormone produite par les jeunes feuilles est le principal facteur limitant et contrôlant ou régulant la régénération du phloème, du xylème et du cambium (Jacobs, 1952; Shininger, 1979). Par ailleurs, le xylème ne se différencie pas en absence de phloème, par contre le phloème peut quant à lui se différencier en absence de xylème. L'action de l'auxine seule conduit à une différenciation de peu de fibres du phloème, et celle de la gibérelline seule est nulle sur la différenciation des fibres du phloème. Cependant l'action simultanée des deux hormones conduit à une différenciation importante de beaucoup de fibres phloémiennes. Par ailleurs, Aloni (1987) a montré que ces deux hormones sont également requises pour la différenciation des fibres du xylème secondaire du peuplier. Chez le pois, l'action des deux hormones conduit à une production de xylème composé majoritairement de fibres. La gibérelline agit comme un stimulus supplémentaire dans la différenciation des fibres plutôt que dans la différenciation des éléments conducteurs (vaisseaux et trachéïdes).

#### ◆ Rôle des racines et des cytokinines

La présence des racines n'est pas requise pour la différenciation des tissus des tiges, ceci est vrai également pour la différenciation des tissus en culture. Cependant les racines ont deux fonctions majeures dans la différenciation des systèmes vasculaires : (1) les racines en agissant comme un puits pour le flux continu d'auxine produit par les feuilles orientent le processus de différenciation des tissus à partir des feuilles vers l'extrémité des racines; (2) les apex racinaires sont source de stimuli inductifs du développement vasculaire. Le stimulus majeur est la cytokinine. Plusieurs cytokinines induisent la différenciation du xylème : kinétine, zéatine. La zéatine remplace l'effet des racines sur la différenciation du phloème des entre-nœuds et induit la différenciation des fibres dans les cultures cellulaires (Aloni, 1987). La kinétine remplace l'effet des racines sur la différenciation des fibres dans les tiges de plantules dépourvues de racines.

#### ◆ Rôle de l'éthylène

L'éthylène est produit en réponse à des pressions externes et affecte la différenciation du xylème (Roberts et Miller, 1982). L'ajout d'inhibiteur de l'éthylène tel que l'argent entraîne une inhibition de la différenciation du xylème et de la lignification. L'éthylène joue également un rôle dans le contrôle de la lignification pendant la xylogénèse en induisant l'activité des peroxidases liées à la paroi cellulaire et l'activité de la PAL (1-phenylalanine ammonia-lyase) (Miller et al., 1985). La PAL convertit la phénylalanine en acide cinnamique dans la voie de biosynthèse de la lignine. Dans des systèmes de cultures *in vitro* l'éthylène agit en synergie avec l'auxine et les cytokinines (Roberts et Miller, 1982).

#### ◆ Rôle de la division cellulaire

Le phloème et le xylème se différencient à partir d'éléments continuellement produits dans le procambium ou dans le cambium par le processus de division cellulaire. La synthèse d'ADN est très souvent observée au cours de la différenciation tissulaire, ce qui résulte de l'endopolyploïdie (Aloni, 1987). Certaines expériences menées sur des explants de racine de pois et de *Coleus* ont montré que la division cellulaire devait avoir lieu avant la différenciation et que l'inhibition de la synthèse d'ADN empêchait la formation des trachéides (Fosket, 1970; Shininger, 1975). D'autres expériences menées sur des cellules de mésophylle de *Zinnia elegans* (Fukuda et Komamine, 1980) ont montré que la synthèse d'ADN n'est pas essentielle pour la différenciation des trachéides.

#### 4.1.4.2. Bases moléculaires du développement des tissus vasculaires

Les travaux les plus récents utilisent le modèle *Arabidopsis thaliana* pour étudier la différenciation des tissus vasculaires (Kuriyama et Fukuda, 2000). Un certain nombre de stratégies ont été utilisées telles que la caractérisation de gènes dans des cultures de trachéides en différenciation (Fukuda, 1997), la production de plantes transgéniques (Scarpella et al., 2000) et la détection de mutants dont la mise en place des tissus vasculaires est altérée (Turner et Somerville, 1997; Zhong et al., 1997; Caño-Delgado et al., 2000). La présence de plusieurs gènes différents dans le génome d'*Arabidopsis* liés au développement des tissus vasculaires indique que l'établissement du processus de vascularisation est sujet à des régulations génétiques complexes (Carland et al., 1999; Berleth et al., 2000; Deyholos et al., 2000; Koizumi et al., 2000). Le modèle *Arabidopsis* est très utilisé pour ce genre d'étude, mais également pour l'étude du contrôle génétique de l'élongation cellulaire (Collett et al., 2000), de l'activité cambiale, du développement des fibres du xylème secondaire et de la lignification (Altamura et al., 2001; Lev-Yadun et Flaishman, 2001).

Pour comprendre le contrôle génétique de la mise en place et de la différenciation des tissus vasculaires, la stratégie la plus prometteuse semble être l'analyse des mutants (Altamura et al., 2001). Pour interpréter les défauts observés chez les mutants, il est nécessaire d'avoir une connaissance détaillée de l'anatomie des différents organes d'*Arabidopsis thaliana*. Chez les dicotylédones, la mise en place du système vasculaire des tiges est associée avec celle des racines, ce qui permet une continuité de l'axe racine-tige. Cependant, les résultats obtenus à partir de travaux d'anatomie descriptive de la hampe florale d'*Arabidopsis* sont controversés. Certains travaux ont montré qu'il n'y avait pas de croissance secondaire (Dharmawardhana et al., 1992) alors que d'autres ont montré de la croissance secondaire au niveau racinaire (Dolan et al., 1993; Dolan et Roberts, 1995) et au niveau de l'hypocotyle (Busse et Evert, 1999). Les travaux de Lev-Yadun (1994) ont mis en évidence l'existence d'une activité cambiale accompagnée de la formation de xylème secondaire à la fois au niveau des hampes florales

et des racines. Les travaux les plus récents sur ce sujet (Altamura et al., 2001) ont montré une activité cambiale et une présence de suber qui révèle une activité du phellogène, méristème latéral permettant également le développement de tissus secondaires (Esau, 1965).

#### **4.2. Développement et lignification des parois cellulaires**

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les tissus répondent à différentes fonctions. Chez les plantes, la disposition des différents tissus varie selon le genre, l'espèce et l'adaptation au milieu. Ces tissus sont des assemblages de cellules spécialisées dont la structure et la morphologie sont adaptés au rôle qui leur est imparti. Les cellules végétales sont entourées par une paroi cellulaire dont la structure et la composition chimique diffèrent d'un type cellulaire à un autre et d'un tissu à un autre.

Peu de travaux sont répertoriés sur la mise en place des parois et de la lignification dans les tiges de luzerne. On trouve principalement les travaux récents de Engels et Jung (1998) et ceux de Vallet et al. (1996). Dans cette partie, je décrirai tout d'abord l'organisation des parois et leur mise en place, puis le processus de lignification de ces parois, et enfin la mise en place des parois et leur lignification au sein du sclérenchyme et du xylème dans les tiges de luzerne.

##### **4.2.1. Organisation de la paroi**

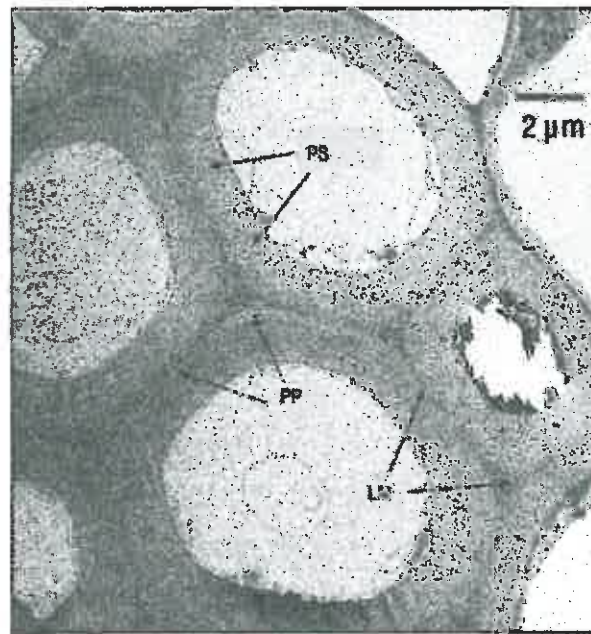
Les cellules végétales déposent leurs parois en une série de couches. Les premières couches sont déposées lors de la division cellulaire, et la cellule met en place par la suite du matériel entre la membrane plasmique et les couches successives. Trois couches successives et bien distinctes peuvent être identifiées par microscopie électronique (figure 1.16) : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire. Les parois végétales représentent 20 à 30% de la matière sèche de l'appareil végétatif des plantes fourragères et constituent la principale source d'énergie pour le ruminant. Chez la luzerne, les parois représentent 43% de la matière sèche de la plante dont 20% sont constituées par de la lignine brute, 32% par des hémicelluloses et 48% par de la cellulose (Mauriès, 1994).

###### **4.2.1.1. La paroi primaire**

Le développement d'une paroi primaire rigide autour des protoplastes fait partie intégrante de l'évolution des plantes. Ce dépôt a lieu pendant la période d'élongation cellulaire. La paroi primaire est très plastique et élastique ce qui permet de ne pas limiter la croissance (Carpita et Gibeaut, 1993).

Sa structure basique est constituée de microfibrilles de cellulose incluses dans une matrice amorphe de composition variable en hémicellulose, pectines, et protéines (figure 1.17) (Carpita et





PS : paroi secondaire  
PP : paroi primaire  
LM : lamelle moyenne

Figure 1.16 : Aspects microscopiques d'une cellule végétale de feuille de blé, au niveau du sclérenchyme (d'après Brett et Waldron, 1992).

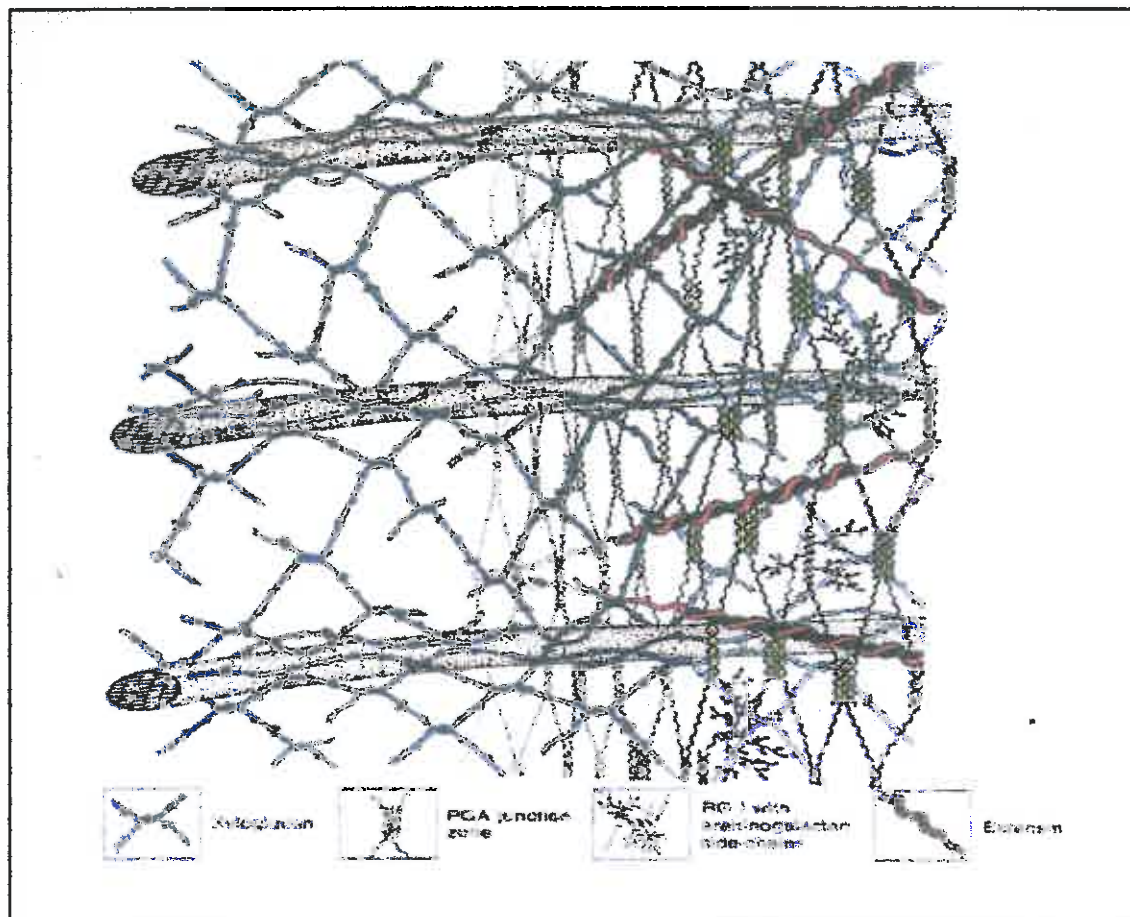


Figure 1.17 : Association entre la cellulose et les autres polysaccharides de la paroi primaire des dicotylédones (Carpita et Gibeault, 1993).

Gibeault, 1993). Les parois primaires sont séparées entre elles par une lamelle moyenne constituée de matériel amorphe. Dans un faible nombre de cellules où les parois sont uniquement constituées de parois primaires et de lamelles moyennes, la paroi est fine (0.1 à 0.2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) et non lignifiée (Wilson, 1993). Ces cellules sont essentiellement situées dans les zones parenchymateuses ou épidermales des feuilles de graminées et sont rapidement dégradées lors de la digestion (Wilson, 1993). A la fin de l'élongation cellulaire, la paroi primaire perd son élasticité, la teneur en eau de la cellule diminue et débute alors la mise en place d'une paroi secondaire.

#### 4.2.1.2. La paroi secondaire

Elle est déposée du côté interne de la paroi primaire quand l'élongation cellulaire a cessé, et se développe aux dépens de la lumière cellulaire. Elle est constituée de trois couches successives (S1, S2 et S3) : de l'extérieur vers l'intérieur (figure 1.18). La paroi secondaire est épaisse et peut atteindre de 1 à 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ces trois couches se différencient par l'orientation des microfibrilles de cellulose (Harris, 1990). Elle a un rôle dans la rigidité de la plante et permet de répondre à un certain nombre de contraintes : tension, forces compressives (Wilson, 1993). Elle est souvent peu hydratée et la présence de polymères phénoliques (lignines) peut renforcer sa solidité et son imperméabilité (Roland, 1980). Selon la partie de la plante et le type de tissus, les parois ne sont pas toutes lignifiées.

#### 4.2.1.3. Processus de lignification

Dans la littérature, il existe un grand nombre d'articles sur la voie de biosynthèse des lignines, et sur la composition biochimique des lignines. On peut citer ceux de Baucher et al. (1998), Boudet (1998), Grima-Pettenati et Goffner (1999), Sato et al. (2001), Lewis et al. (1999). Volontairement, je ne décrirai pas dans cette partie la voie de biosynthèse des lignines et les différents niveaux de régulation de cette voie, ni la composition biochimique des lignines. Cette partie fait uniquement le point sur le processus dynamique de mise en place de la lignine au niveau des parois.

##### ◆ Définition de la lignine

La présence de lignine est limitée exclusivement aux végétaux ayant un système vasculaire (ptéridophytes, gymnospermes et angiospermes). Les lignines ont joué un rôle primordial dans l'adaptation des plantes à la vie terrestre en leur fournissant un support mécanique, mais également des éléments permettant de conduire l'eau et les minéraux, et aussi permettant leur défense contre des attaques pathogènes (Boudet et al., 1996).



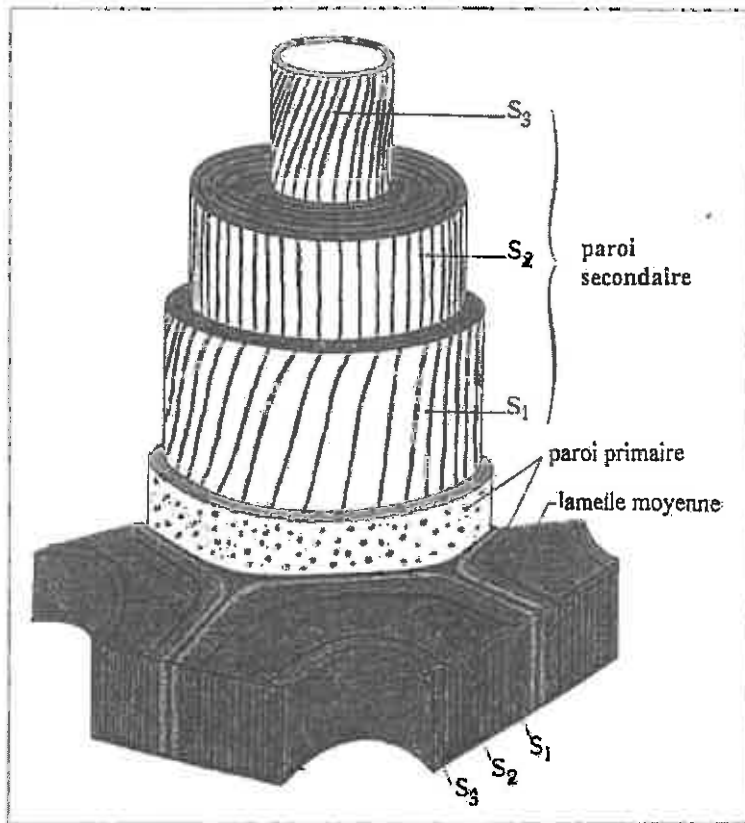


Figure 1.18 : Schéma représentant les différentes couches constituant les parois des cellules végétales (d'après Roland, 1980)

Les lignines sont déposées dans les parois des tissus impliqués dans le support mécanique ou dans la conduction de l'eau (principalement le xylème, mais aussi le sclérenchyme et les fibres du phloème). La lignine joue également un rôle dans les mécanismes de défenses face à un bio-agresseur. C'est une barrière physico-chimique contre les pathogènes, et elle peut être synthétisée *de novo* en réponse à un stress, telles que blessure ou infection par un pathogène (Vance et al., 1980; Lewis et Yamamoto, 1990).

La lignine est un biopolymère complexe issue de la polymérisation de trois acides phénoliques : acide para-coumarique, acide férulique, et acide synapique, qui diffèrent par leur degré de méthylation. Des changements de proportion relative de ces monomères peuvent être observés au sein de la même plante en fonction du type tissulaire et cellulaire et en fonction des conditions environnementales (stress biotiques et mécaniques) (Boudet, 2000). La figure 1.19 montre la complexité de la voie de biosynthèse des lignines et les différents niveaux de régulation. Les sous-unités de la lignine sont au nombre de trois; hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) et syringyl (S) qui dérivent de la polymérisation oxydative des acides phénoliques. Les proportions relatives des sous-unités S et G de la lignine déterminent les propriétés physiques de la lignine et son impact sur les processus de fabrication de pâte à papier et de digestibilité des fourrages. La concentration en lignine (Albrecht et al., 1987; Jung et al., 1997) et le rapport S/G (Sewalt et al., 1997) ont été corrélés négativement avec la digestibilité des fourrages par les ruminants (Buxton et Russell, 1988). On observe pour une cellule donnée un enrichissement progressif en unités S dans la paroi secondaire signifiant que le rapport S/G est un signal à la fois d'évolution et de maturité des lignines et de la plante (Buxton et Russell, 1988).

Chez les dicotylédones, les unités composant les lignines sont les unités S et G (Baucher et al., 1998), et chez les monocotylédones la lignine est constituée par les unités H, G et S. Chez *Medicago sativa* L., la lignine est composée à 64 % d'unités G et à 36 % d'unités S (Monties, 1994).

#### ◆ Dépôt des lignines

Le dépôt des lignines débute quand la croissance cellulaire est achevée et quand la paroi commence à s'épaissir. La lignification des parois secondaires du xylème chez le pin a été analysée par micro-autoradiographie, et montre que le dépôt de lignine se fait en trois étapes distinctes qui sont toujours précédées par le dépôt de carbohydrates (Terashima et al., 1988). La première étape débute par le dépôt aux coins de la paroi primaire (après le début de formation de la couche S1 de la paroi secondaire) et dans la lamelle moyenne. La seconde étape de lignification intervient après le dépôt de cellulose et hémicellulose dans la couche S2. La plus importante partie de la lignification a lieu après

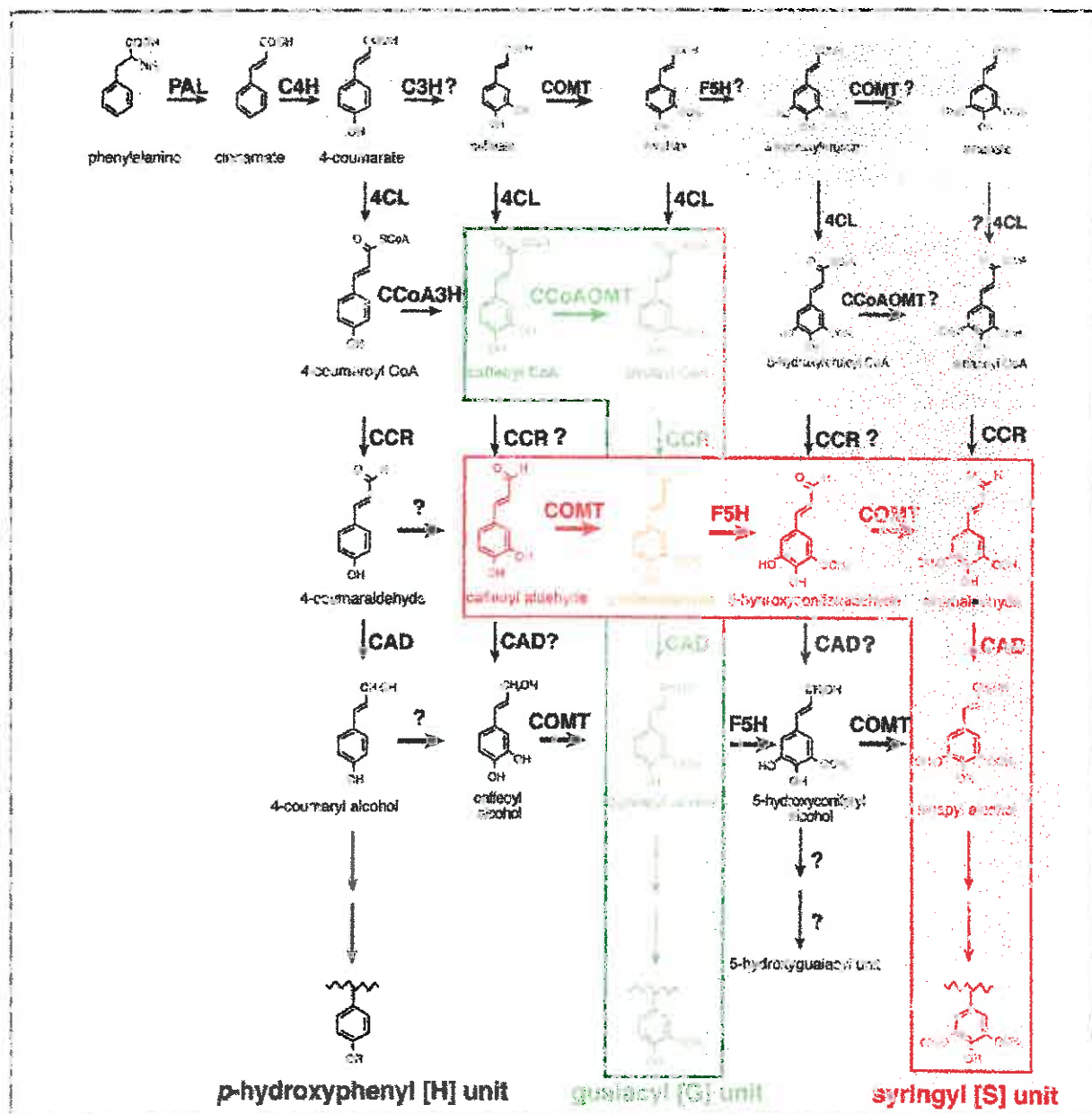


Figure 1.19 : Voie de biosynthèse des monolignols de la lignine. La voie en vert est la voie conduisant à la sous unité guaiacyl (G) et faisant intervenir la CCoAOMT. La voie en rouge indique une nouvelle voie de biosynthèse des sous-unités syringyl (S) où intervient la COMT dans les deux étapes de méthylation. La voie orange est potentiellement commune à la biosynthèse des deux sous-unités S et G (Parvathi et al., 2000).

que les microfibrilles de cellulose ont été déposées dans la couche S3 (Terashima et al., 1988; Dean et Eriksson, 1992).

#### 4.2.2. Développement des parois et lignification dans les tiges de luzerne

##### ◆ Au niveau du xylème

Le développement des parois et leur lignification dans les tiges de luzerne au niveau du xylème ont été étudiés par Engels et Jung (1998) au niveau du septième entre-nœud à partir du bas de la tige prélevé à cinq stades différents (de l'entre-nœud en élongation au stade d'entre-nœud mature). Le processus de lignification au cours du développement des vaisseaux et des fibres du xylème dans les tiges de luzerne est le même. La lignification débute dans la paroi primaire et progresse vers la paroi secondaire. Le début de l'épaississement de la paroi secondaire dans les tissus du xylème à la fin de l'élongation cellulaire est toujours accompagné par un dépôt de lignines dans la lamelle moyenne et dans la paroi primaire, comme l'ont déjà décrit Terashima (1990), Terashima et al. (1993) et Vallet et al. (1996). Le processus de développement des parois secondaires et de leur lignification est très rapide dans le xylème secondaire et dans les fibres de xylème. Certaines cellules des fibres du xylème secondaire déposent une couche supplémentaire très dégradable contre la paroi secondaire très lignifiée.

##### ◆ Au niveau des fibres supraphloémiennes

Dans le sclérenchyme, Engels et Jung (1998) ont observé un processus de développement des parois en trois étapes. La première étape est caractérisée par un épaississement local de la paroi primaire; la seconde est caractérisée par la lignification des couches fines de la paroi primaire sur la face luminale formant un anneau lignifié dans la partie extérieure du phloème primaire, et la troisième étape est caractérisée par le dépôt d'une paroi secondaire épaisse non lignifiée (en accord avec Wilson, 1993). La lignification des parois primaires est incomplète et ne se produit pas dans la lamelle moyenne si la paroi primaire est très épaisse à cause des peroxydases servant à la polymérisation des lignines.

Cependant, Vallet et al. (1996) ont montré que la lignification des fibres supraphloémiennes commence du côté extérieur de la paroi secondaire et progresse vers le côté interne (côté de la lumière) de la paroi secondaire mais également vers l'extérieur dans la paroi primaire (figure 1.20) en accord avec les résultats de Calvin (1967).

##### ◆ Composition biochimique des parois

Vallet (1997) a montré que les teneurs en parois augmentent des entre-nœuds jeunes vers les entre-nœuds matures, d'environ 50% à 75%, et de même les teneurs en lignines des parois

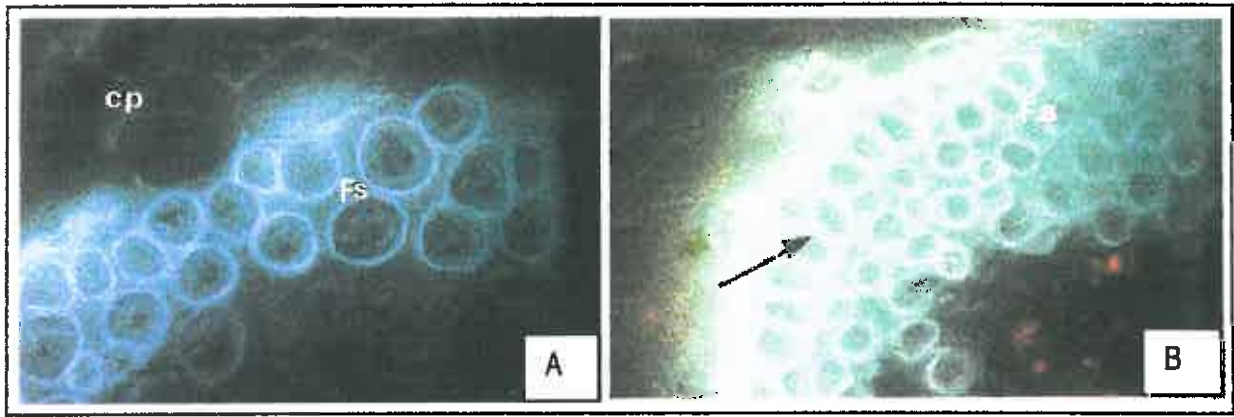


Figure 1.20 : Observation microscopique en fluorescence des fibres supraphloémiennes au niveau de l'entre-nœud 9 d'une tige de luzerne. La lignine des parois est autofluorescente. A : Seules les parois primaires fluorescent au niveau des fibres supraphloémiennes en début de différenciation. B : Fibres supraphloémiennes totalement différenciées, la fluorescence est observée également au niveau des parois secondaires. cp : parenchyme cortical, FS : fibres supraphloémiennes (Vallet et al., 1996).

augmentent de 10% à 21% dans les entre-nœuds matures. Par ailleurs, la zone en croissance est caractérisée par un dépôt de lignines de type G (guaïacyl), alors que rapidement après la mise en place du cambium, les lignines déposées contiennent une plus forte proportion d'unités S (syringyl). Le rapport S/G augmente alors et passe de 0,18 à 0,50 alors que dans la zone mature, la composition monomérique évolue peu.

#### 4.3. Dégradabilité des tissus et accessibilité à la paroi

La lamelle moyenne des parois constitue un ciment totalement indigestible entre les cellules adjacentes, réduisant les espaces intracellulaires (lumières cellulaires) (Chesson et al., 1986; Wilson, 1991) sans doute du à une très forte lignification et/ou une forte liaison entre les lignines et les polysaccharides des parois. Ceci rend difficile la mastication et la rumination ainsi que la rupture par les microorganismes du rumen. Les bactéries du rumen doivent avoir accès à la paroi pour les digérer. Wilson (1993) montre que les microorganismes, en raison de ces lamelles moyennes fortement lignifiées, n'ont pas accès à la surface externe de la paroi (qui est plus grande) et donc que la dégradation ne peut généralement s'effectuer qu'à partir la lumière de la cellule (surface plus réduite) ou par les plasmodesmes, à condition qu'une rupture mécanique des cellules ait eu lieu. Les microorganismes progresseraient de la paroi secondaire vers la paroi primaire. Pour les cellules à parois fines, comme les cellules du mésophylle et du parenchyme, la digestion peut avoir lieu par proximité des enzymes de la paroi (Akin, 1980). Par contre, pour les cellules à parois épaisses comme dans le xylème et dans les fibres supraphloémiennes, les bactéries doivent avoir un accès direct à la paroi et y adhérer (Akin, 1980; Cheng et al., 1983) (figure 1.22). De ce fait dans les fibres supraphloémiennes qui sont longues et dont la surface des lumière est faible, les microorganismes ont des mouvements limités et lents entraînant ainsi une faible dégradation. Le taux de digestion est alors relié à la surface d'exposition disponible des parois. Si la surface d'exposition de la paroi est importante, il existe également un autre facteur. Le rapport entre la surface offerte et le volume de la cellule pour les différents types cellulaires joue un rôle très important dans l'accessibilité des microorganismes à la paroi (Fisher et al., 1989).

La cuticule d'un épiderme intact empêche l'accès des bactéries vers l'intérieur des feuilles ou des tiges (Chesson et Forsberg, 1988). Cependant une fois que la cuticule est rompu par mastication, les bactéries du rumen ont accès aux cellules de l'intérieur des tiges. Le premier facteur limitant la digestion des parois est la présence de lignine mais également les liaisons de la lignine avec les polysaccharides des parois (Hatfield, 1989). Beaucoup de travaux ont été conduits sur la relation entre la composition biochimique des parois et la digestibilité (Carpita et Gibeaut, 1993; Jung et Deetz, 1993; Besle et al., 1994). Cependant, l'anatomie des plantes et la proportion des différents tissus influencent également la



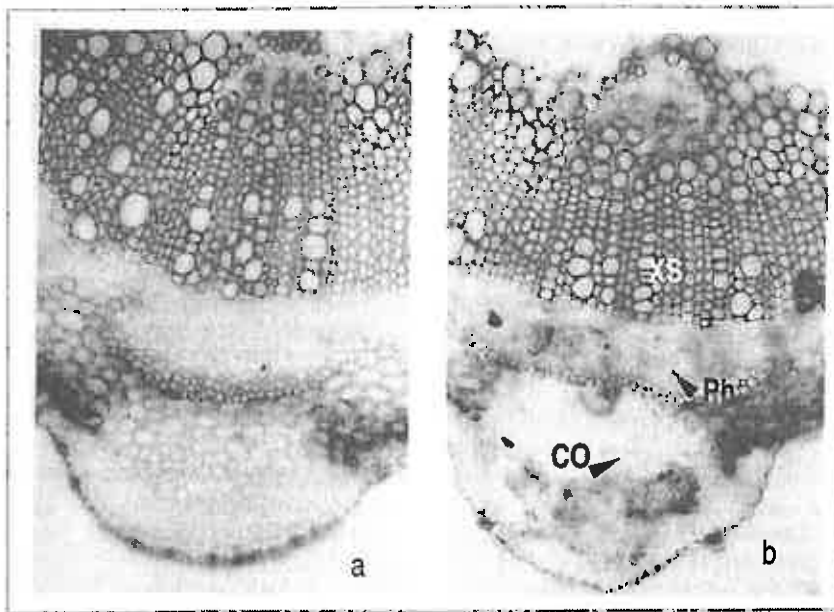


Figure 1.21 : Faisceau de tige de luzerne non digéré (a), et faisceau ayant subi une digestion pendant 48h dans du jus de rumen (coupes de  $100\ \mu\text{m}$  d'épaisseur) (Wilson, 1993). Le collenchyme (CO) et le phloème (PH) sont digérés.

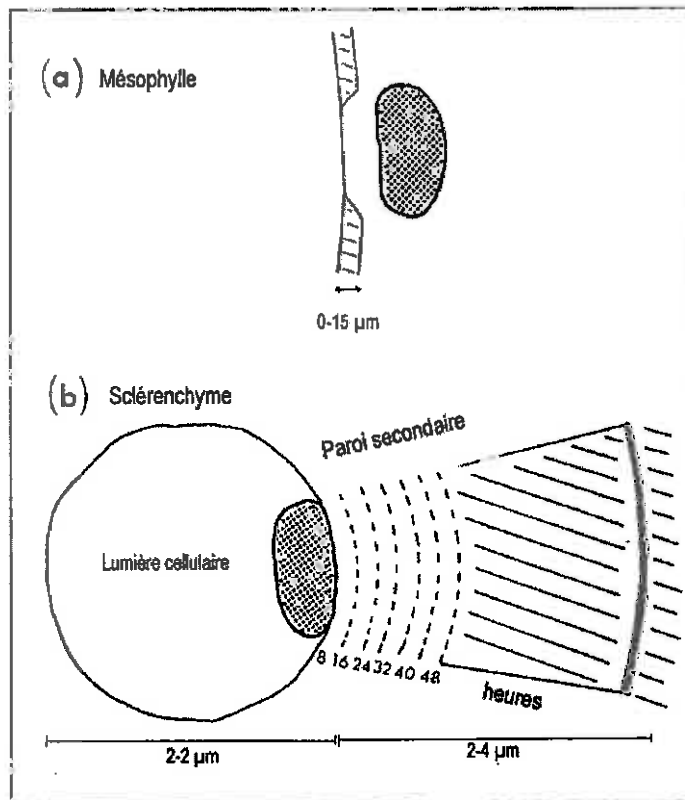


Figure 1.22 : Représentation schématique de la digestion d'une paroi primaire du mésophylle par une bactérie du côté externe de la paroi (a), et comparaison avec la digestion d'une paroi secondaire de sclérenchyme du côté interne au niveau de la lumière cellulaire (b), montrant la progression de la digestion vers la paroi primaire pendant 8 à 48 heures (d'après Wilson et Mertens, 1995).

digestibilité des fourrages dans le rumen par les microorganismes (Akin, 1979; Wilson et Mertens, 1995). La structure anatomique des fibres influence l'accessibilité des parois aux microorganismes du rumen. D'un point de vue de la dégradabilité des parois, on peut considérer qu'il existe deux types de cellules (Wilson, 1991) dans les tissus des tiges de légumineuses : les cellules de l'anneau de xylème fortement lignifiées qui paraissent 100% indigestibles, et les cellules du reste des tissus qui paraissent digestibles à 100%. Dans les tiges matures pratiquement toute la lignine est concentrée dans l'anneau de xylème, et dans les fibres supraphloémiennes avec quelques exceptions dans les fibres du phloème. Une telle concentration de lignine peut expliquer le manque apparent de digestion des parois du xylème lors d'expériences de digestion *in vitro* dans du jus de rumen (figure 1.21), même sur des coupes fines (0,1mm) de tiges qui sont censées éliminer les problèmes d'accessibilité des microorganismes (Wilson et al., 1991). Jung et Engels (2002) ont montré que le développement important du xylème secondaire dans les tiges matures de luzerne entraîne une diminution importante de la dégradabilité des tiges. Les problèmes d'inaccessibilité des microorganismes aux parois du xylème devraient être faibles du point de vue de Wilson et Mertens (1995) car le xylème en tant que tissu vasculaire possède des cellules qui sont majoritairement mortes sans parois terminales, ce qui rend plus facile l'entrée des microorganismes du rumen. La faible digestion des éléments du xylème est donc vraisemblablement liée aux concentrations importantes de lignines et non pas à un problème d'accessibilité des parois. Les tissus non lignifiés du parenchyme médullaire et du parenchyme cortical sont digérés rapidement et complètement, contribuant ainsi au fort taux de digestion observé chez les légumineuses (Besle et al., 1994). La lignine des tiges des graminées quant à elle est distribuée (avec de plus faibles concentrations) dans la plupart des tissus (Wilson, 1993).

## 5. CONCLUSION

La valeur d'usage du peuplement dépend de la quantité et de la qualité de la biomasse récoltable, de la souplesse d'exploitation et de la durée de vie de la luzernière conditionnée par la compétition entre plantes mais également entre tiges d'une même plante. La quantité de biomasse récoltable est liée à la croissance et à la structure spatiale des parties aériennes (feuilles et tiges). La qualité de la biomasse récoltée est liée à la composition morphologique (rapport feuilles / tiges), biochimique et histologique des différentes parties aériennes de la plante (teneurs en fibres, en lignine, pourcentage de tissus lignifiés). Elle dépend aussi de la croissance et du génotype (variabilité génétique). La croissance des dicotylédones s'accompagne du fonctionnement d'un méristème secondaire (le cambium) qui met en place des tissus secondaires (xylème et phloème) responsables de l'augmentation du diamètre des tiges. Le xylème secondaire est très lignifié dans les tiges matures et limite fortement la dégradation des tiges de luzerne, alors que la digestibilité des feuilles évolue peu



quelle que soit la maturité de la plante. La croissance en hauteur se traduit par un ajout de segments matures avec une augmentation des teneurs en parois et en lignines, conduisant à une diminution de la qualité moyenne des tiges.

Cette synthèse montre également que la diminution de la qualité du fourrage résulte de deux événements au cours de la maturation des plantes : i) au cours de la maturation des légumineuses, le rapport feuilles/tiges diminue car le taux de développement des tiges est plus rapide que celui des feuilles, et les feuilles du bas tombent à cause de la sénescence, ii) la maturation des tiges est accompagnée par une augmentation des teneurs en parois et une diminution de la dégradabilité des parois par les ruminants. La proportion des différents tissus de la tige impliqués dans le soutien et dans le transport d'eau et de nutriments joue un rôle important dans sa dégradabilité. Les études déjà menées sur les tiges de luzerne apportent des éléments de connaissance sur le développement des parois et leur mode de lignification dans les différents tissus constituant les tiges. Par ailleurs, diverses études liées à la compréhension des différences de digestibilité se sont focalisées sur des études biochimiques de composition des lignines, et on connaît peu de choses sur l'histologie des tiges de luzerne. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la distribution spatiale des tissus lignifiés dans les tiges et la forme des cellules affecterait la digestibilité des polysaccharides pendant la dégradation dans le rumen. Ce travail de thèse s'est donc penché sur la quantification des diverses structures histologiques des tiges de luzerne (les différents tissus composant les tiges et les divers éléments constituant le xylème) à l'aide de l'analyse d'images sur des coupes transversales, et sur l'étude de leur variabilité génétique.

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

<b>1. Matériel Végétal</b>	<b>32</b>
1.1.Evolution des caractères histologiques, morphologiques et biochimiques le long des tiges de luzerne et mise au point de l'analyse d'images .....	32
1.2.Etude de la diversité génétique pour les caractères histologiques et morphologiques des tiges	33
1.3.Recherche de marqueurs associés (population F <sub>1</sub> ).....	34
<b>2. Méthodologies</b>	<b>36</b>
2.1.Coupes histologiques et coloration .....	36
2.2.L'analyse d'images .....	37
2.3.Mesure des caractères biochimiques .....	44
2.4.Méthodologie de la cartographie .....	45
<b>3. Analyses statistiques</b>	<b>46</b>
3.1.Description des caractères morphologiques et histologiques le long des tiges de luzerne.....	46
3.2.Etude de la diversité génétique.....	48
3.3.Etude phénotypique de la population F <sub>1</sub> .....	48

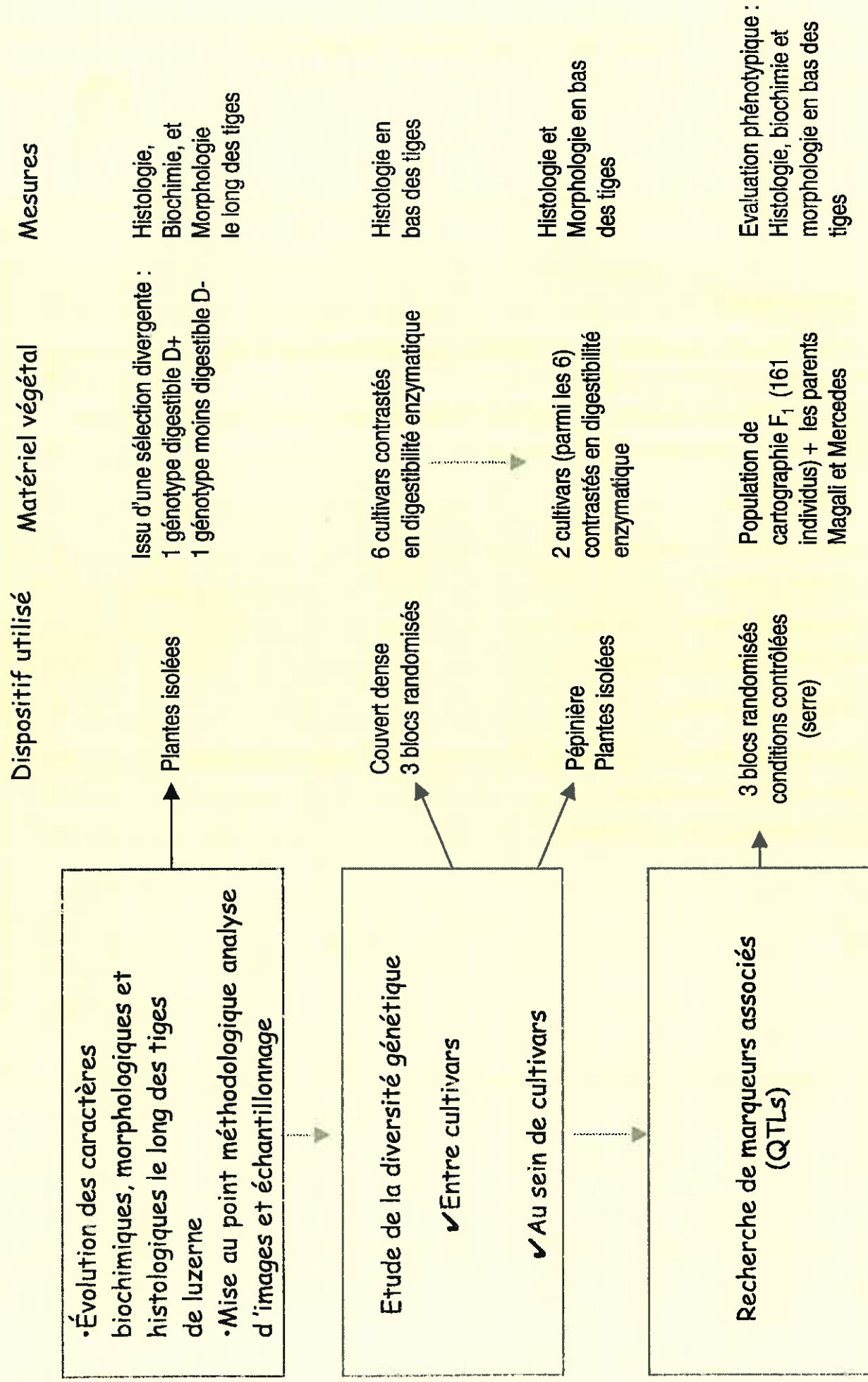


Figure 2.1 : Schéma global résumant les différentes parties de la thèse, et du matériel végétal et dispositifs correspondant à chaque partie

## 1. MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal utilisé est décrit pour chaque expérimentation : (1) l'évolution des caractères histologiques, morphologiques et biochimiques le long des tiges de luzerne, (2) la description de la diversité génétique entre et au sein de cultivars, et (3) la recherche de marqueurs associés aux caractères mesurés. Le matériel ayant servi à décrire l'évolution des caractères histologiques le long de la tige a été utilisé pour la mise au point de l'analyse d'images. La figure 2.1 donne une vue d'ensemble du matériel végétal utilisé et des mesures réalisées dans chacune des parties de la thèse.

### 1.1. Evolution des caractères histologiques, morphologiques et biochimiques le long des tiges de luzerne et mise au point de l'analyse d'images

Pour ce travail de description des caractères histologiques le long de la tige et de mise au point des techniques d'analyse d'images, nous avons choisi du matériel contrasté pour la digestibilité, le but étant de valider les profils d'évolution des différents caractères mesurés sur des génotypes différents. De la même façon pour l'analyse d'images, il nous fallait du matériel très contrasté dans le but de développer un outil qui soit utilisable sur une gamme de matériel végétal large pour les valeurs de digestibilité (le but étant ensuite d'évaluer la diversité génétique des caractères histologiques sur des populations choisies pour leur différence de digestibilité). Nous avons donc orienté notre choix vers deux génotypes issus d'une sélection divergente pour la digestibilité de la plante entière. Le fait que l'analyse soit réalisée le long de la tige où l'on rencontre des structures histologiques très différentes que l'on soit en haut des tiges (croissance en longueur), ou dans le bas de tiges matures, permet également de valider la méthode sur des organisations structurales très différentes.

La figure 2.2 illustre l'origine des génotypes choisis dans cette étude. De 1995 à 1997, 11 populations représentées chacune par 7 à 20 génotypes ont été évaluées pour la digestibilité du fourrage entier (Julier et al., 2000) par la méthode de prédiction par spectroscopie dans le proche infra rouge. A l'issue de ces analyses, 2 plantes digestibles et 2 moins digestibles ont été choisies dans chacune des 11 populations et mises en 2 polycross en 1997 : un polycross de digestibilité élevée et un polycross de faible digestibilité. Chaque polycross comprenait 22 plantes. Vingt plantes de la descendance de chaque polycross ont été implantées dans une pépinière de plantes isolées en 1998. En 1999, les 40 plantes ont été évaluées pour le NDF (Neutral Detergent Fibre ou teneur en parois) et l'ADL (Acid Detergent Lignin ou teneur en lignine) en 2 coupes. Un génotype de chaque polycross a été choisi sur la base des valeurs de teneurs en NDF, et de teneurs en ADL. Les deux génotypes nommés D+ et D- présentent une différence de 9,6 points de teneur en NDF exprimé en % de matière sèche, et

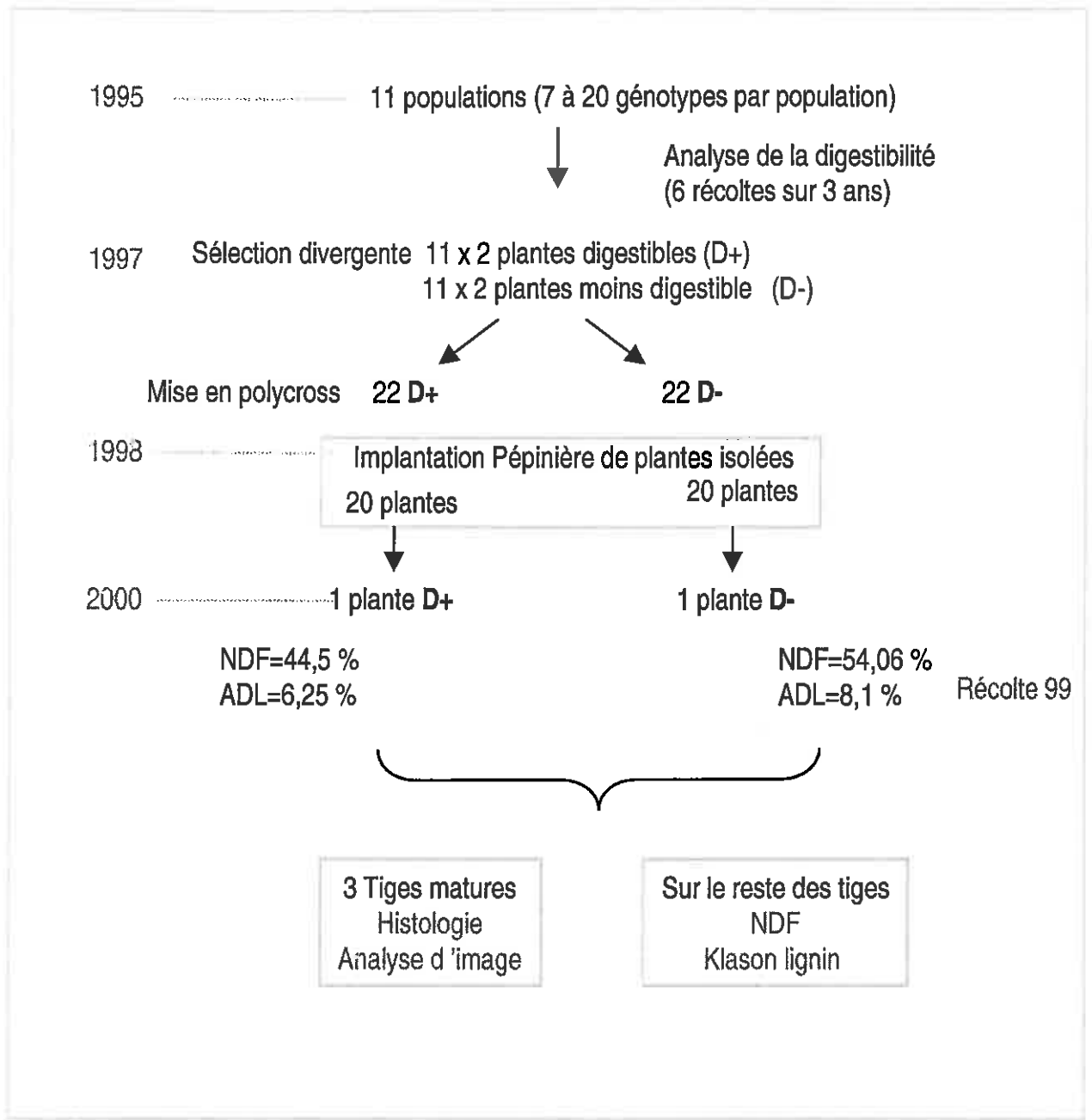


Figure 2.2 : Origine des deux géotypes D+ et D- pour étudier l'évolution des caractères histologiques, biochimiques et morphologiques le long de la tige

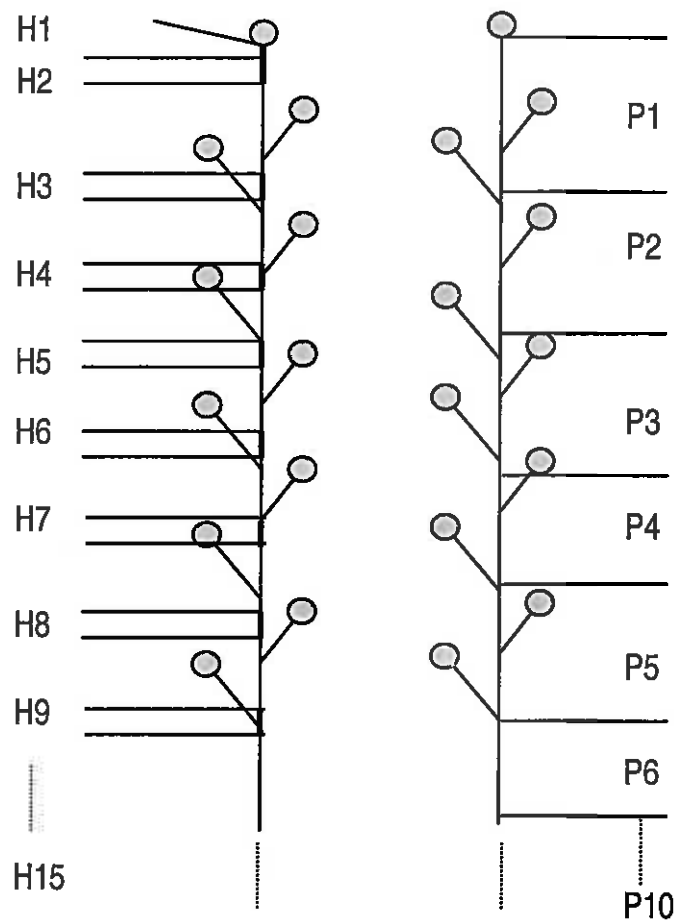


Figure 2.3 : Représentation schématique du mode de prélèvement des portions (H) de 2 cm de tige pour l'analyse histologique tous les 5 cm, et pour l'analyse chimique des teneurs en NDF et en lignine Klason tous les 10 cm (P).

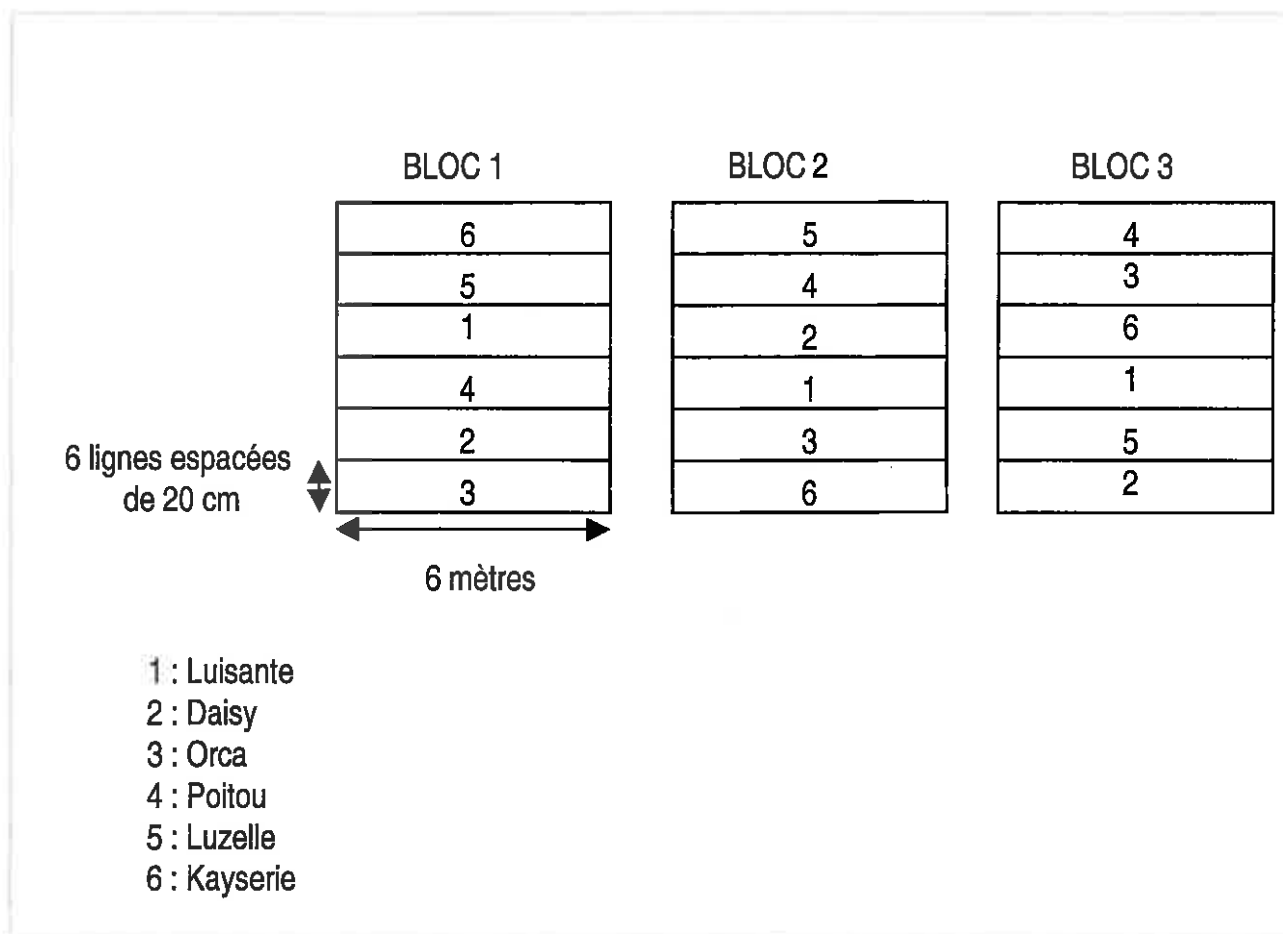


Figure 2.4 : Dispositif de mise en place des 6 cultivars en 3 blocs randomisés

Tableau 2.1 : Origine des cultivars choisis pour étudier la diversité génétique des caractères histologiques et morphologiques

Cultivar	Obtenteur / Origine	Type de cultivar	Type
Luisante	INRA (France)	Variété synthétique	Nordique
Daisy	Prodana Seed (DK)	Variété synthétique	Nordique
Orca	Carneau (France)	Variété synthétique	Nordique
Poitou	France	Population de pays	Nordique
Luzelle	INRA (France)	Variété synthétique	Nordique
Kayserie	Turquie	Variété synthétique	Méditerranéen



1,9 points de teneur en ADL exprimée en % de matière sèche. Ces deux génotypes ont été évalués au cours de 2 cycles de croissance de l'année 2000.

Sur chaque génotype, 3 tiges dominantes ont été prélevées au début du stade de floraison pour réaliser les analyses histologiques et la quantification par analyse d'images. Sur ces 3 tiges, une portion de 2 cm de longueur a été prélevée tous les 5 cm en partant de l'apex vers le bas des tiges, excepté tout en haut des tiges où le premier cm a été sectionné ainsi que les 2 cm suivant de façon à caractériser plus précisément les structures histologiques en haut des tiges (figure 2.3). Sur ces tiges, la hauteur, le nombre d'entre nœuds et leur longueur, et le diamètre des portions prélevées ont été notés.

Sur le reste des tiges de chaque plante, des mesures chimiques de teneur en NDF et en lignine Klason ont été réalisées. Les tiges ont toutes été alignées en se calant sur le haut des tiges de façon à aligner les zones en croissance, et elles ont été sectionnées tous les 10 cm (figure 2.3). Sur chaque portion de 10 cm, les feuilles ont été enlevées. Chaque portion de 10 cm a été identifiée et séchée à l'étuve à 60°C pendant 24 h, puis broyée sur des grilles de 1 mm. Le poids sec des feuilles et des tiges a été enregistré pour chaque strate de 10 cm de hauteur. La strate 1 correspond au haut des tiges et la strate 10 correspond au bas des tiges. La strate 10 inclut également toutes les portions de tiges dont la longueur est supérieure à 1m.

## **1.2. Etude de la diversité génétique pour les caractères histologiques et morphologiques des tiges**

Il est connu que chez la luzerne la variabilité à l'intérieur des cultivars est souvent de même ordre voire même supérieure à la variabilité entre cultivars pour divers caractères. Nous avons donc choisi 6 cultivars différents pour évaluer la diversité génétique entre cultivars et parmi ces 6 cultivars, 2 ont été choisis pour évaluer la diversité génétique à l'échelle intra-cultivar.

### **1.2.1. Dispositif "inter-cultivars"**

Parmi les 6 cultivars, 4 sont des variétés synthétiques françaises : Luisante, Daisy, Orca et Luzelle, 1 est une population de pays : Poitou, et Kayserie est un cultivar turc (tableau 2.1). Ces 6 cultivars ont été choisis d'après les résultats d'un essai comprenant 144 populations (Julier et al., 1999) pour leurs valeurs contrastées de digestibilité mesurée au cours de 3 années dans un dispositif en couvert dense sur un total de 5 récoltes. Trois d'entre elles (Luisante, Orca et Daisy) sont plus digestibles que les autres sur les 5 récoltes. Ces 6 cultivars ont été semés au printemps 1999 à Lusignan (Vienne, 46° 36' N) dans un dispositif en bloc randomisé comprenant trois répétitions (figure 2.4). Chaque bloc est

entouré par une bordure constituée par la variété Europe. Chaque parcelle est composée de 6 lignes de 6 m de longueur espacées de 20 cm, et semées à une densité de 20 kg / ha.

Sur chaque bloc et pour chaque population, 9 tiges ont été prélevées parmi les tiges dominantes (chaque tige correspondant à un individu différent) au moment des deux premières récoltes de l'année 2000 (25 mai et 27 juin) au stade début de floraison. Les feuilles ont été enlevées et les tiges ont été divisées en 3 portions équivalentes en longueur : haut, milieu et bas des tiges. Pour chaque tige prélevée, sa hauteur, le nombre d'entre-nœuds et leur longueur ont été notés, et une portion de 2 cm de longueur prélevée sur le milieu de la portion basale des tiges a été utilisée pour réaliser des analyses histologiques. Le diamètre de la portion de 2 cm a été noté.

### **1.2.2. Dispositif "intra-cultivar"**

Pour étudier la diversité génétique à l'intérieur des cultivars, 2 cultivars ont été choisis parmi les 6 cultivars précédents. Ces 2 cultivars, Luisante et Luzelle, qui présentent des digestibilités contrastées ont été étudiés dans un dispositif de plantes isolées au cours de deux récoltes en 2000 au stade début de floraison. Pour chaque cultivar 10 plantes (génotypes) ont été étudiées et 5 tiges dominantes par génotype ont été prélevées de manière à constituer des répétitions. Les deux cultivars présentaient des dates de floraison similaires pour les deux récoltes.

Les cultivars ont été étudiés dans un dispositif en plantes isolées de façon à pouvoir identifier facilement les génotypes étudiés et prélever à nouveau des tiges à la deuxième récolte sur ces mêmes génotypes. La densité dans un couvert est telle qu'il n'aurait pas été possible d'identifier les individus (génotypes) étudiés ni d'être sûr de trouver suffisamment de tiges.

De la même façon que pour l'étude de la diversité entre cultivars, les tiges prélevées ont été sectionnées en 3 portions de longueur équivalente et une portion de 2 cm de longueur a été prélevée au milieu du tiers inférieur des tiges pour réaliser l'étude histologique. La hauteur, le nombre d'entre-nœuds des tiges et le diamètre des portions prélevées pour l'analyse histologique ont été notés.

## **1.3. Recherche de marqueurs associés (population F<sub>1</sub>)**

### **1.3.1. Matériel végétal et dispositif expérimental**

Une population F<sub>1</sub> et les parents sont étudiés. La population F<sub>1</sub> est composée de 226 individus pleins frères issus d'un croisement contrôlé entre une plante de la variété synthétique Magali utilisée comme mâle et une plante de la variété Mercedes utilisée comme femelle. Magali est une obtention INRA (1971), de type Provence de faible dormance, sensible à la verse et aux nématodes. Mercedes est une obtention Limagrain (1994), de type Flamande de forte dormance, résistante à la

verse, aux nématodes et au verticillium. Les 226 individus de la population  $F_1$  et les parents (12 répétitions) ont été bouturés en 2000 et implantés en serre en 2001 en blocs randomisés avec trois répétitions. Le choix d'une population  $F_1$  se justifie tout à fait chez la luzerne pour cartographier le génome et rechercher des QTLs. En effet, la luzerne est allogame et une forte dépression de consanguinité est observée dans la descendance si des individus apparentés sont croisées, il n'est donc pas envisageable de travailler sur les lignées recombinantes. La création d'une population  $F_2$  ou d'un back-cross (ou rétrocroisement) risquerait d'induire des distorsions de ségrégation liées à la disparition de génotypes subissant une dépression de consanguinité. L'utilisation d'une population  $F_1$  issue du croisement entre deux individus non fixés hétérozygotes limite le taux de consanguinité et permet un brassage chromosomique important.

Le marquage moléculaire de cette population a été réalisé dans l'équipe du laboratoire sur 161 individus à l'aide de marqueurs AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) et microsatellites (encore appelés SSR : Simple Sequence Repeats) fournis par S. Santoni (INRA Montpellier). L'établissement des cartes a été réalisé à partir des 161 individus de la population (les étapes sont reprises dans la partie méthodologie). La technique AFLP détecte le polymorphisme de restriction et d'hybridation de l'ADN, génère des marqueurs dominants et est principalement utilisée dans l'établissement de cartes génétiques et dans les études de diversité génétique. Le marquage microsatellites détecte le polymorphisme de nombre d'unités de répétitions. Les marqueurs microsatellites sont des marqueurs codominants et spécifiques de locus révélés individuellement. Pour cartographier une espèce, les marqueurs microsatellites sont utiles pour plusieurs raisons : leur distribution sur l'ensemble du génome permet de couvrir l'ensemble des régions chromosomiques et ainsi de saturer plus rapidement la carte génétique, leur polymorphisme élevé, leur rôle de marqueur ancre donne la possibilité d'aligner des cartes entre les espèces modèles et les espèces cultivées par exemple. Le marquage AFLP et microsatellites a révélé 410 marqueurs dont 26 sont des marqueurs microsatellites issus de 7 locus, 246 marqueurs polymorphes pour le parent Magali (dont 108 sont cartographiés, soient 68 %) et 236 pour le parent Mercedes (dont 132 sont cartographiés, soient 57 %). Les cartes de chacun des deux parents ont été réalisées grâce au logiciel Joinmap version 3 et à des calculs spécifiques des configurations des tétraploïdes (Hackett et al., 1998). La carte finale du parent Magali fait apparaître 4 groupes d'homologie (contenant les groupes de liaison ou chromosomes homéologues) et la carte de Mercedes en contient 7 (Julier et al., 2002) sur les 8 attendus.

### 1.3.2. Mesures réalisées

Les mesures ont été effectuées le 30 mai 2001 au stade début de floraison. Sur chaque individu de la population et sur chacun des parents, une tige a été prélevée parmi les tiges dominantes.

Les feuilles ont été séparées des tiges. Sur cette tige, une section de 2 cm a été prélevée au milieu du tiers inférieur de la tige. Sur chaque tige prélevée, la hauteur a été notée (H), et sur la section prélevée le diamètre (DIAM) a été mesuré au pied à coulisse. Cette section de tige a été utilisée pour réaliser des coupes histologiques. Le reste de chaque tige a été séché à 60 °C à l'étuve et broyé à 1 mm pour réaliser des mesures de solubilité enzymatique. Le rapport feuilles/tiges a été déterminé en faisant le rapport entre le poids sec des feuilles et le poids sec des tiges.

## 2. METHODOLOGIES

### 2.1. Coupes histologiques et coloration

Les portions de tige de 2 cm sont fixées dans une solution de fixateur composée d'éthanol 95° et d'acide acétique glacial (3 volumes / 1 volume) pendant une à deux semaines, puis les échantillons sont conservés dans de l'éthanol à 70°.

Des coupes fines de 50  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées grâce à un vibratome™ 1000, qui possède l'avantage de pouvoir couper du matériel frais ou fixé, c'est à dire non inclus dans de la résine ou de la paraffine. L'appareil offre la possibilité de régler les paramètres d'amplitude auxquels va vibrer une lame, ainsi que la vitesse et l'angle avec lequel elle va "attaquer" la tige. Ces paramètres sont modifiées en fonction de l'espèce étudiée, de la rigidité des tiges et de leur grosseur (Annexe 2.1).

Les coupes fines obtenues au vibratome sont laissées dans de l'eau de javel à 6% pendant 20 minutes. L'eau de javel est utilisée pour vider les contenus cellulaires de façon à ce que la coloration bleue obtenue par le colorant ne soit pas décomposée ou précipitée. L'eau de javel permet également une meilleure visualisation des parois (Tolivia et Tolivia, 1987). Les coupes sont ensuite rincées à l'eau déminéralisée dans 3 bains successifs de 15 minutes. Une fois les coupes rincées, elles sont incubées pendant une nuit dans une solution de Fasga (Annexe 2.2) diluée au 1/8 (Tolivia et Tolivia, 1987). Après un abondant rinçage, les coupes sont montées entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. Les lamelles sont scellées à l'aide d'une épaisse couche de vernis à ongle transparent. Le réactif est un mélange de deux colorants :

- ◆ Le bleu alcian, colorant textile adopté en histochimie en 1950 est un colorant basique polyvalent et soluble dans l'eau. Il réagit avec les groupements anioniques et peut s'employer à pH acide (entre 1,0 et 2,5). Le bleu Alcian colore la cellulose à pH 1,0.

- ◆ La safranine O est un colorant spécifique des lignines, qui sont alors colorées en rouge. La subérine et la cutine sont colorées en rouge orangé, les tannins sont rougeâtres, le sclérenchyme en rouge, le collenchyme et le parenchyme en bleu.

Le bleu alcian est très compatible avec la safranine et a une très forte affinité pour les structures qui ont peu d'affinité avec la safranine. Ces propriétés permettent une double coloration efficace des tissus. La coloration est reproductible et elle ne prend pas beaucoup de temps. Les coupes ainsi colorées peuvent être conservées très longtemps à condition que le montage entre lame et lamelle soit bien hermétique et que les coupes soient conservées à l'obscurité. La coloration ainsi obtenue permet d'apporter un contraste de couleur suffisant entre le rouge et le bleu permettant d'isoler les différents tissus par traitement d'image.

## 2.2. L'analyse d'images

### 2.2.1. Utilisation de l'analyse d'images et justification du choix de la méthode

L'analyse chimique des aliments permet de connaître les teneurs en cellulose, hémicellulose, lignines, pectines. Cependant elle ne fournit pas d'information sur l'agencement des parois et surtout sur les proportions des différents tissus. Les méthodes microscopiques permettent de mettre en évidence les tissus de composition et de dégradation différentes (Grenet, 1997). Les premières études microscopiques visant à évaluer les proportions de parois lignifiées des plantes fourragères et la nature des tissus retrouvés dans les fécès datent des années 1950 (Drapala et al., 1947; Stepler, 1951 et Regal, 1960). La dégradation des parois peut être étudiée dans le rumen grâce à l'étude en microscopie photonique, en microscopie électronique à balayage ou encore en microscopie électronique à transmission d'échantillons de fourrage après incubation dans du jus de rumen (Engels, 1996). La microscopie photonique permet d'étudier rapidement les différents tissus et leurs proportions, la taille des cellules, la taille des parois cellulaires et la présence de lignine. La microscopie électronique à transmission permet de connaître la structure des parois et leur mode de dégradation par les micro-organismes du rumen. Cependant, la profondeur de champ est limitée (Engels, 1996). La microscopie électronique à balayage permet de visualiser une structure tridimensionnelle de la surface des sections dégradées avec une grande profondeur de champ. Les images sont de plus haute qualité, cependant les estimations de volume sont encore difficiles. Il existe diverses études qui ont permis d'étudier la dégradation des tissus après immersion dans du jus de rumen. La microscopie confocale a également été utilisée pour mesurer le volume des cellules avant et après digestion (Travis et al., 1997). La microscopie confocale (CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy) offre la possibilité de mesurer la dégradabilité des tissus en 3 dimensions. L'analyse en 3 dimensions présente également l'avantage de ne pas causer d'artéfacts au niveau des tissus dus à la congélation ou au vide nécessaire à l'utilisation de la microscopie électronique à balayage. Il est également possible de mesurer l'épaisseur des parois.



Jusqu'alors les différentes techniques utilisées permettaient d'apprécier différents paramètres, mais ne permettaient pas de quantifier des résultats. Les premières tentatives de quantification ont été réalisées par Haster et al. (1983) où les tissus restant après divers temps d'incubation dans le rumen (1, 2, 4, 8, 16, 32, et 48 h) étaient estimés par une note visuelle de 0, 25, 50, 75 ou 100 % de dégradation. Akin (1982) a développé une technique de montage de tissus entre lame et lamelle et d'incubation dans du jus de rumen. Après observation au microscope et après avoir fait des photos de ces coupes, la dégradation des différents tissus était estimée visuellement par deux observateurs et la moyenne des 2 observations donnait la valeur de la mesure finale de dégradation des tissus. Un nouveau champ de discipline s'est ouvert avec l'apparition de l'analyse d'images. L'analyse d'images a été énormément utilisée dans des disciplines telles que la physique et pour des études industrielles (Twidell, 1989), mais rarement comme outil pour la recherche sur les plantes fourragères. Il y a une dizaine d'années, Kühbauch et Bestajovsky (1983, 1985) et Bestajovsky et Kühbauch (1985) ont développé une méthode d'analyse d'images permettant de déterminer les surfaces lignifiées et la digestibilité des tiges de luzerne. Dans leurs études une forte corrélation a été observée entre les résultats obtenus par analyse d'images et les concentrations en lignine déterminées par les analyses chimiques. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir déterminer la distribution de la lignine dans les différents tissus, et de la quantifier. Twidell et al. (1989) ont développé une technique d'analyse d'images permettant de quantifier la dégradation des tissus composant des limbes de graminées incubés dans du jus de rumen. Les teneurs en lignine ont également été déterminées par analyse d'images en ultra violet, au niveau des parois constituant le bois chez *Abies sachalinensis* (Fukazawa et Imagawa, 1981), ce qui a permis de mettre en évidence des différences de teneur en lignine entre les différents types de bois (bois juvénile et bois adulte). L'analyse d'images a également été utilisée pour mettre en évidence des différences entre divers génotypes d'alpiste roseau (*Phalaris arundinacae* L.) (Wittenberg et al., 1994) de proportions des différents tissus de la tige, des différences de quantité de parois et de densité de tissus vasculaire chez le colza (*Brassica napus*) (Travis et al., 1993).

Pour cette étude, nous avons choisi l'analyse d'images pour quantifier les proportions des différents tissus composant les tiges de luzerne et les différents éléments composant en particulier le xylème (taille des vaisseaux et des fibres, densité surfacique et épaisseur des parois). Diverses études ont montré qu'il était possible d'utiliser cette technique sur des tiges de luzerne. Les techniques d'analyse d'images proposent des outils de mesure permettant de quantifier et de caractériser des objets composant un ensemble (mesure de la forme, de la luminosité, et des dimensions de ces objets). Ces techniques sont particulièrement intéressantes au niveau de l'histologie, car elles permettent de

caractériser des tissus (surface, proportions) et des objets composant ces tissus (parois, cellules) dans différentes parties de la plante (feuilles, tiges ou racines).

Le choix de la technique de microscopie s'est orienté vers la microscopie photonique conventionnelle. Elle permet une détection rapide des différents tissus après une coloration adaptée et les traitements d'un grand nombre d'échantillons. Le choix de la coloration s'est porté vers l'utilisation du colorant polychromatique Fasga composé de safranine et de bleu alcian qui a la propriété de colorer en rouge les lignines et en bleu la cellulose. La coloration est rapide et très reproductible, elle offre par ailleurs un contraste de couleur pertinent pour l'analyse d'images.

## **2.2.2. Généralités sur le traitement des images**

### **2.2.2.1. Acquisition des images**

La première étape primordiale dans l'analyse d'une image est son acquisition ou capture. Une image est constituée par un ensemble de pixels (ou points images) ayant des propriétés communes de luminosité ou de texture. L'acquisition des images se fait grâce à un capteur matriciel qui comprend des éléments photosensibles qui vont convertir la luminosité renvoyée (grandeur physique) en information analogique (Poussot, 2001). La résolution d'une image est donnée par la distance qui sépare chaque élément photosensible (ou pixel). Dans notre étude, le capteur est une caméra "TRICCD" vidéo classique. La résolution spatiale des images fournie par la caméra est moyenne (564 x 768 pixels).

### **2.2.2.2. Prétraitement des images et segmentation**

Une image couleur est composée de trois plans différents : un plan rouge, un bleu et un vert. Une image est rarement utilisable en couleur pour effectuer des mesures. Il convient de travailler sur une image binaire, c'est à dire à deux niveaux (le noir et le blanc). Le noir prend la valeur 0 et le blanc prend la valeur 1 ou 255 suivant le logiciel utilisé. L'image d'origine doit subir un prétraitement à l'aide de filtres ou d'opérations morphologiques pour éliminer les objets indésirables. L'image issue du prétraitement (réduction des bruits de fond, rehaussement des contours), doit se rapprocher le plus possible du stade binaire. La segmentation d'une image a pour but de délimiter les objets de façon précise, cette étape est difficile à mettre en œuvre et elle dépend beaucoup de l'espèce et de la partie de la plante considérée. Le seuillage permet de passer d'une image en niveaux de gris à une image binaire. C'est une fonction qui fonctionne très bien lorsque les images sont très contrastées.



### 2.2.2.3. Traitement des images et extraction des données

L'étape de traitement est basée sur l'utilisation de fonctions morphologiques mathématiques. Elle permet de préparer l'image avant d'effectuer les mesures sur les objets identifiés (délimités grâce à leur contour). Les opérations de base sont l'érosion et la dilatation (définitions annexe 2.3). Les opérations découlent d'autres opérateurs : ouverture, fermeture, amincissement, épaissement, squelettisation.

Il est possible d'extraire les coordonnées spatiales des objets délimités et d'en calculer la surface, le périmètre, leur diamètre, leur longueur et le nombre d'objets qu'ils contiennent et autres paramètres. Les résultats sont stockables dans un fichier ASCII et directement utilisables pour faire du traitement de données en statistique. La chaîne d'événements de l'analyse d'une image est illustrée sur la figure 2.5.

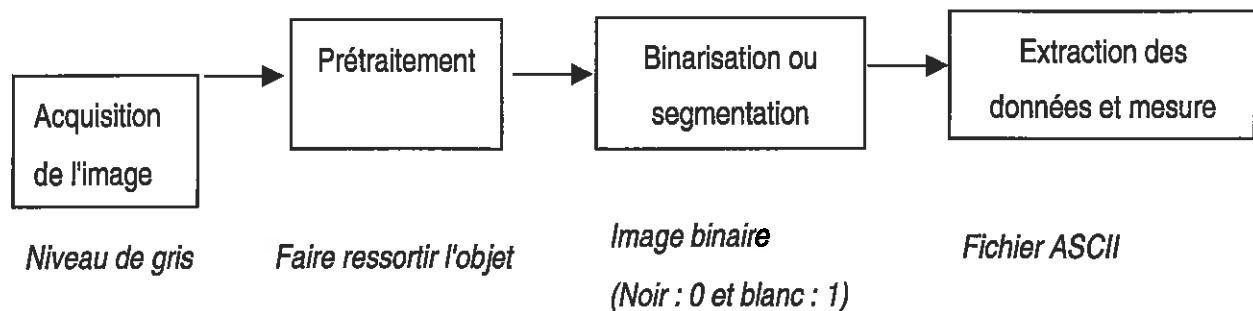


Figure 2.5 : Séquence d'acquisition, de prétraitement et d'analyse d'une image

### 2.2.2.4. Optimas

Optimas est un progiciel de traitement et d'analyse d'images (MédiaCybernetics). La version utilisée à l'INRA de Lusignan est la version 6.1. Il comporte des fonctions prédéfinies (de segmentation, de traitement, et de mesures) qui permettent d'éviter de développer des applications entières. Il existe également des fonctions permettant d'écrire et de stocker les mesures dans un fichier ASCII. L'INRA (et en particulier l'Unité Informatique du Magneraud, Centre Poitou Charentes) a fait évoluer le logiciel et a mis en place des nouvelles fonctions disponibles pour l'INRA sur le site <http://www.poitou-charentes.inra.fr/optimas6/optimas6.html>. Il est possible à l'aide d'un éditeur de texte de saisir une série de macro commandes qui permettront de traiter les images.

Pour analyser les tissus des tiges de luzerne, il n'y avait pas de macros disponibles et directement utilisables sur notre matériel. Des macros ont été développées sur des tiges de maïs à

l'INRA de Lusignan, mais la diversité des tissus des tiges de luzerne et leur agencement (différent entre dicotylédone et monocotylédone) a rendu impossible leur adaptation à notre matériel végétal. Il a fallu développer et mettre au point différentes applications permettant d'isoler les divers tissus ou objets composant certains tissus et de les mesurer spécifiquement sur les tiges de luzerne. Trois applications ont été développées dans cette thèse dont une est semi-automatique c'est à dire qu'elle nécessite une intervention minimale de l'utilisateur et une autre totalement automatique. Elles sont décrites dans le paragraphe suivant. Ces macros ont été développées en collaboration avec l'Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères de l'INRA de Lusignan.

### 2.2.3. Démarche générale de l'analyse des images des coupes de tige de luzerne

Pour chaque application, on fait lire à Optimas un fichier d'entrée texte (.TXT) (Annexe 2.4) comprenant le chemin complet du répertoire dans lequel sont stockés les fichiers images à traiter (sauvegardées en format .TIFF), et l'image de référence (.REF) réalisée grâce à une image de calibration, correspondant au grossissement de l'image (figure 2.6). Cette image de référence permet de quantifier les mesures à une échelle réelle (cm ou mm). On dispose d'une image de calibration (qui représente une règle graduée dont l'image a été capturée aux différents grossissements étudiés) pour chaque application (permet de déterminer la taille exacte d'un pixel à chaque grossissement). Optimas va ouvrir séquentiellement et automatiquement les images les unes à la suite des autres et les traiter au fur et à mesure suivant la séquence décrite au paragraphe précédent (figure 2.5). A l'issue de l'étape de mesure, les données sont stockées automatiquement dans un fichier texte de sortie .TXT ( voir exemple de structure du fichier en annexe 2.4).

Le choix des caractères à mesurer a été orienté par la synthèse bibliographique. Il est apparu intéressant de mesurer les proportions des différents tissus composant les tiges de luzerne : parenchyme médullaire qui est un tissu non lignifié, le xylème qui est le principal tissu lignifié au sein des tiges de luzerne, l'écorce constituée de parenchyme cortical et de phloème; et les structures liées au xylème : épaisseur et densité surfacique des parois lignifiées du xylème, surface moyenne des lumières des vaisseaux et des fibres du xylème.

Tous ces paramètres ne sont pas quantifiables au même grossissement. Nous avons donc développé trois applications principales (macro) adaptées à chaque grossissement d'image, toutes structurées de la même façon. Chacune d'entre elles charge automatiquement les fichiers images à partir du fichier d'entrée et les traite de façon différente suivant le grossissement de l'image en allant "chercher" différentes sous-macros de traitement (voir structure d'une macro en annexe 2.4).

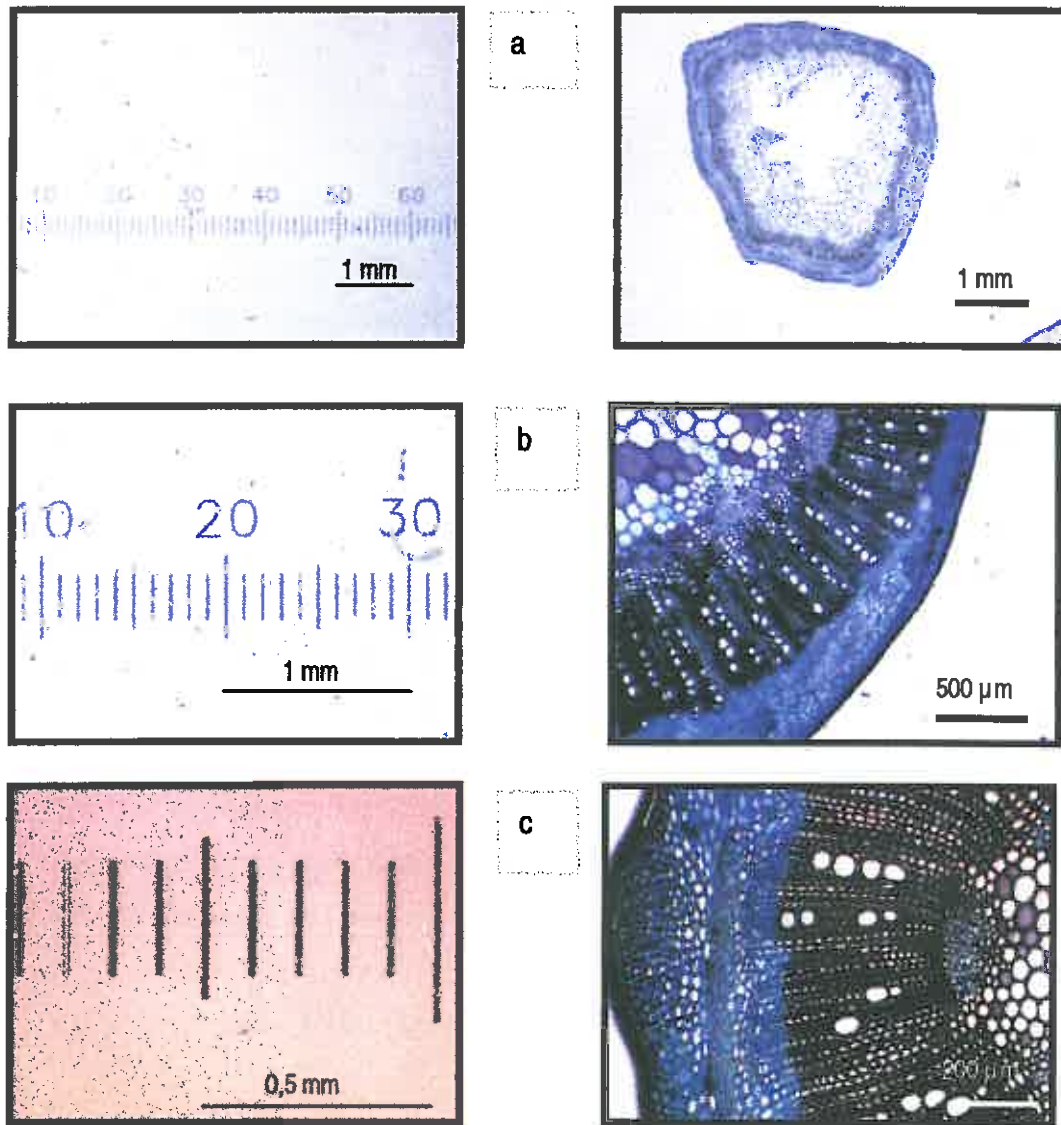


Figure 2.6 : Images de calibration pour les images capturées à chaque grossissement, a : objectif X 0.8 (loupe binoculaire, grossissement X 30), b : objectif X 2 (loupe binoculaire, grossissement X 80), c : objectif X 4.0 (microscope, grossissement X 200).

#### 2.2.4. Traitement des images capturées au grossissement X 30 et caractères mesurés

La figure 2.7 illustre les différentes étapes d'analyse des images capturées au grossissement X 30. Les opérations morphologiques et mathématiques appliquées à ces images sont expliquées en annexe 2.3. Les macros développées sur ces images sont basées sur le contraste des couleurs, et permettent après les différents traitements mentionnés sur la figure de quantifier la surface totale de la coupe transversale des tiges à partir de l'image *.ENT*, la surface du parenchyme médullaire à partir de l'image *.MED*, la distance entre l'épiderme et le parenchyme médullaire à partir de l'image *.SEG* et la proportion d'écorce plus le xylème par différence entre la coupe entière (*.ENT*) et le parenchyme médullaire (*.MED*) figure 2.7). Connaissant la surface de la coupe entière, il est alors possible de calculer des proportions relatives des surfaces mesurées. Les macros utilisées à ce grossissement sont totalement automatisées; les images sont chargées les unes après les autres et les différents traitements sont appliqués. Sur les images issues du traitement il est possible de faire des retouches manuelles si le résultat du traitement n'est pas fidèle à l'image de départ.

#### 2.2.5. Traitement des images capturées au grossissement X 80 et caractères mesurés

Pour mesurer la surface de xylème lignifié sur la coupe, il a été plus judicieux de travailler à un grossissement plus élevé. En effet, les coupes transversales ne sont pas toujours exactement planes et la profondeur de champ plus importante dans certaines régions de la coupe entraîne une hétérogénéité dans la coloration. Cette hétérogénéité de coloration fait qu'il n'est pas possible de détecter tous les contours du xylème avec le même traitement d'image au grossissement X 30. Nous avons remarqué qu'il était plus facile de travailler au grossissement X 80, et que les macros ainsi développées pour ce grossissement étaient applicables à un grand nombre d'images et quelle que soit la position sur la tige. A ce grossissement, l'image capturée représente environ un quart de la coupe entière. Le problème reste de savoir si cette image est représentative du reste de la coupe. La reproductibilité de l'analyse d'image a donc été contrôlée. Cette application basée également sur le contraste de couleur permet de quantifier (figure 2.8) la surface de l'objet entier (le quart de la coupe : *.ENT*), la surface du parenchyme médullaire (*.MED*), la surface du xylème (*.XYL*), l'épaisseur de l'écorce mesurée en traçant manuellement des lignes entre l'épiderme et le cambium.

#### 2.2.6. Traitement des images capturées au grossissement X 200 et caractères mesurés

Il est possible de quantifier des éléments du xylème au microscope à un grossissement X 200 grâce à la détection du contour des objets (morphologie des cellules). Sur les images capturées, la zone d'intérêt est délimitée manuellement au niveau du xylème secondaire et les traitements sont appliqués sur cette zone uniquement (figure 2.9). Il était techniquement plus facile de procéder ainsi

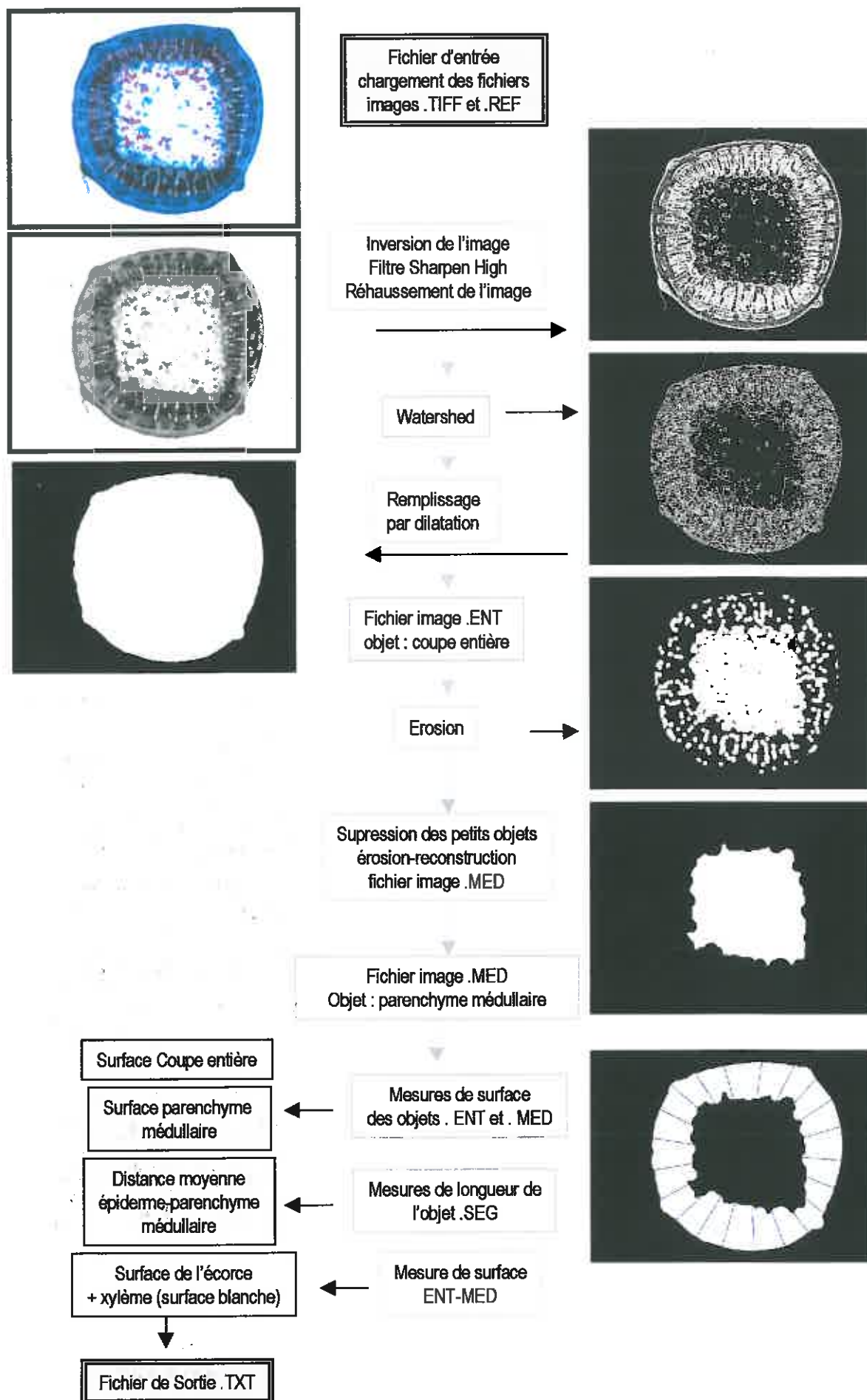


Figure 2.7 : Principe de quantification des tissus des tiges de luzerne au grossissement X 30. Les opérations morphologiques utilisées sont décrites en annexe 2.3.



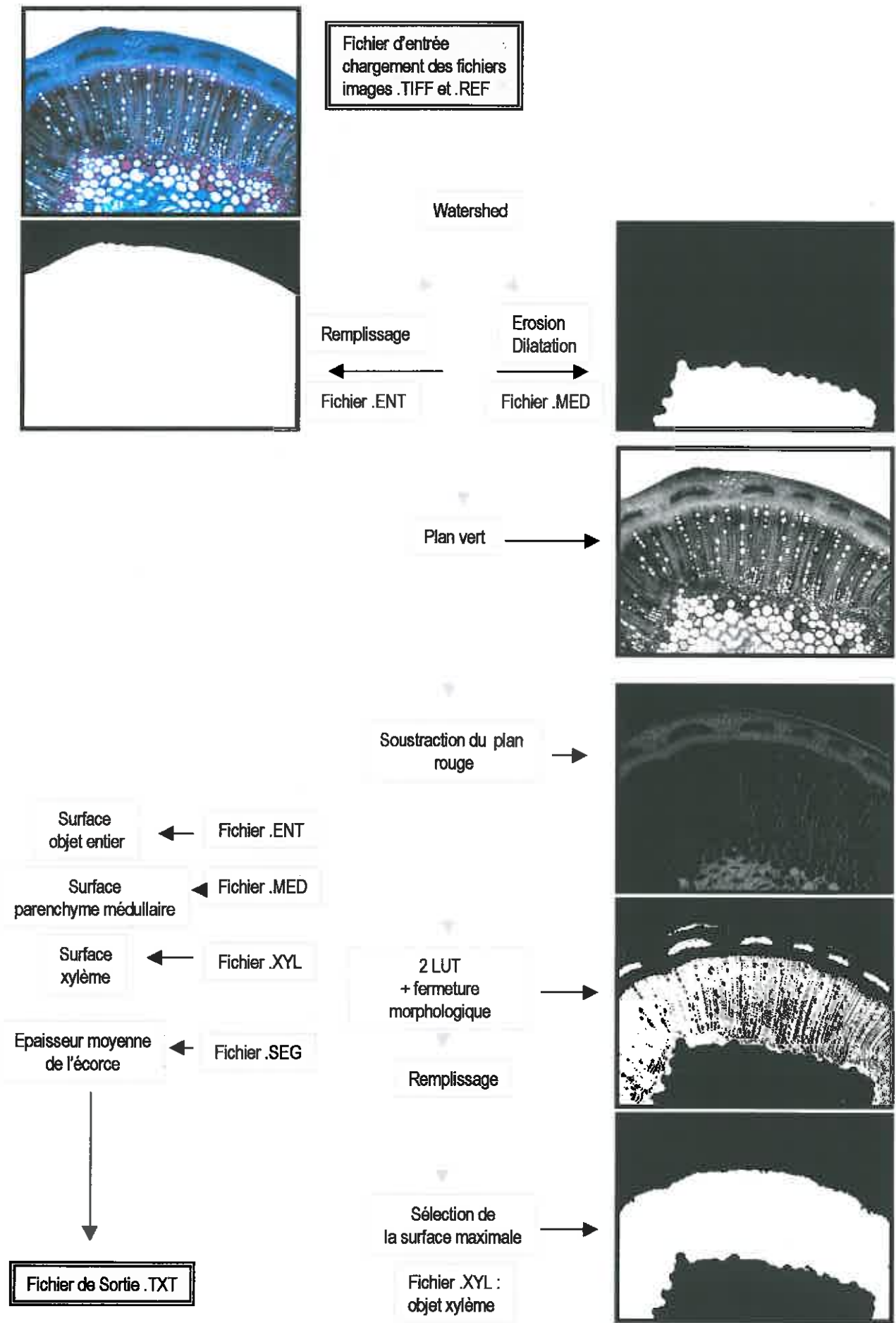


Figure 2.8 : Principe de quantification des tissus des tiges de luzerne au grossissement X 80





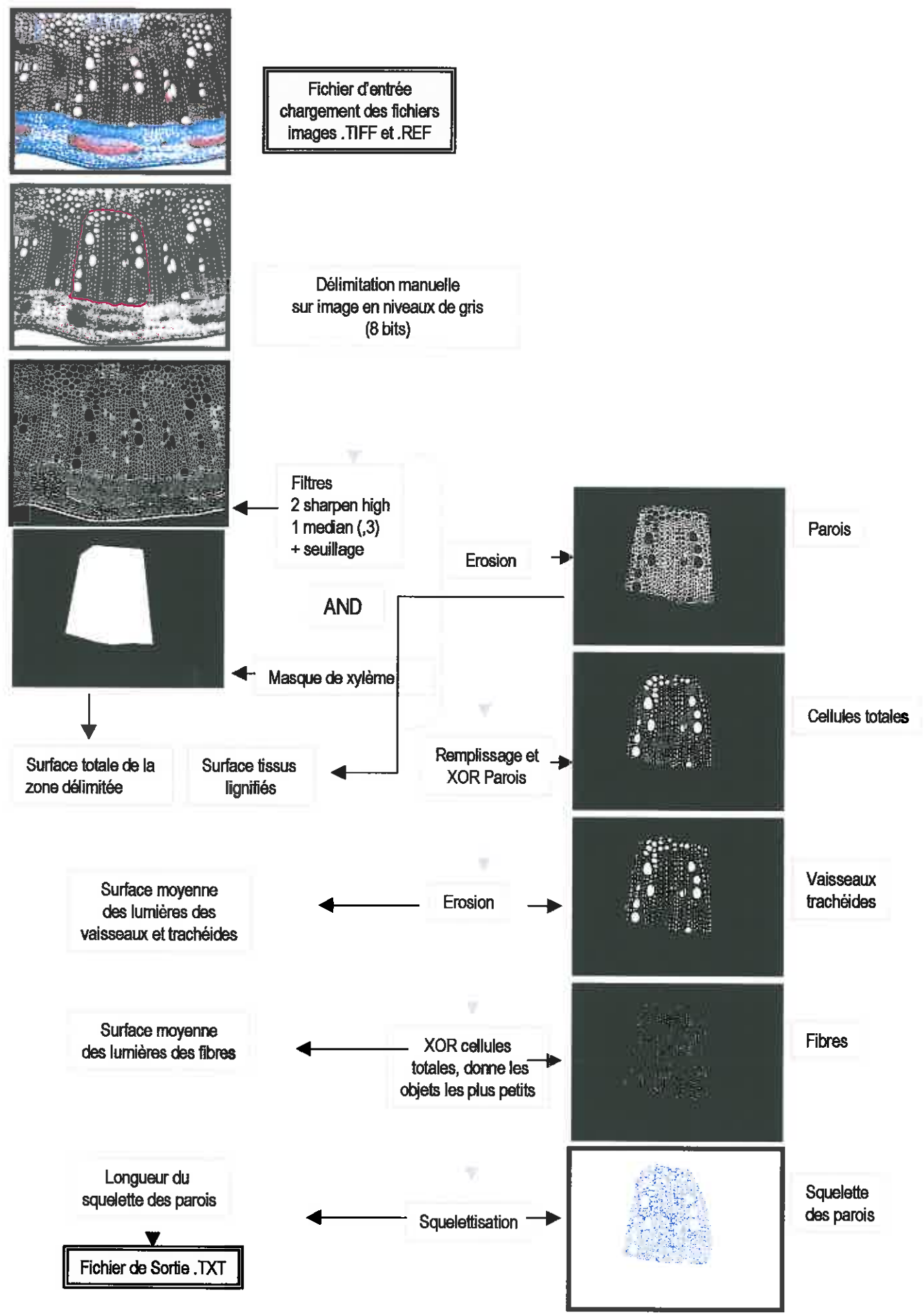


Figure 2.9 : Principe de quantification des tissus des tiges de luzerne au grossissement X 200



plutôt que d'essayer de délimiter automatiquement la zone de xylème par segmentation de l'image à l'aide de filtres ou autres outils de traitement. La segmentation du xylème à ce grossissement était réalisable mais demandait un investissement en temps très important. La délimitation manuelle est restreinte au xylème secondaire en excluant les rayons parenchymateux, ce qui rend la délimitation plus reproductible d'une coupe à l'autre. De la même façon que dans le traitement précédent, la reproductibilité de la méthode a été contrôlée en choisissant différents faisceaux sur la même coupe, de façon à savoir si l'échantillonnage de la zone était représentatif du reste de la coupe. Ce traitement se fait en une seule étape (une seule macro principale) contrairement aux deux autres. Il permet d'extraire la surface moyenne des lumières des vaisseaux et des fibres du xylème, l'épaisseur et la densité surfacique des parois. L'épaisseur des parois est obtenue en faisant le rapport entre la surface lignifiée dans la zone considérée et la longueur totale du squelette des parois dans cette zone. La densité surfacique des parois est définie par le rapport entre la surface lignifiée dans la zone considérée et la surface de la zone considérée. Nous nous sommes assurés de la répétabilité des procédures d'analyse d'images pour chaque grossissement utilisé.

### 2.2.7. Définition de nouveaux caractères

Pour l'étude de la diversité génétique et la recherche de marqueurs dans la population  $F_1$ , l'analyse histologique a été réalisée en bas des tiges uniquement. Le bas des tiges de luzerne présente la particularité d'être rond. Il est alors possible de calculer la proportion des différents tissus par rapport au rayon des tiges de façon à exprimer la répartition des différents tissus dans la même unité (figure 2.10). Le traitement au grossissement X 30 permet d'obtenir le rayon de la coupe transversale par la relation suivante :  $\sqrt{(\text{surface de la coupe entière} / \pi)}$ . Le rayon du parenchyme médullaire est déterminé par la relation suivante :  $\sqrt{(\text{surface du parenchyme médullaire} / \pi)}$ . La largeur du xylème est déterminée en faisant la différence entre la distance entre l'épiderme et le parenchyme médullaire et l'épaisseur de l'écorce. Les proportions des différents tissus composant les tiges sont calculées de la façon suivante :

proportion d'écorce = épaisseur de l'écorce / rayon de la coupe,

proportion de xylème = largeur du xylème / rayon de la coupe,

et proportion de parenchyme médullaire = épaisseur de parenchyme médullaire / rayon de la coupe. En fait ce que l'on calcule ici est la racine carrée de la proportion des différents tissus et par simplification, dans le reste de cette étude on parlera de proportions de tissus.

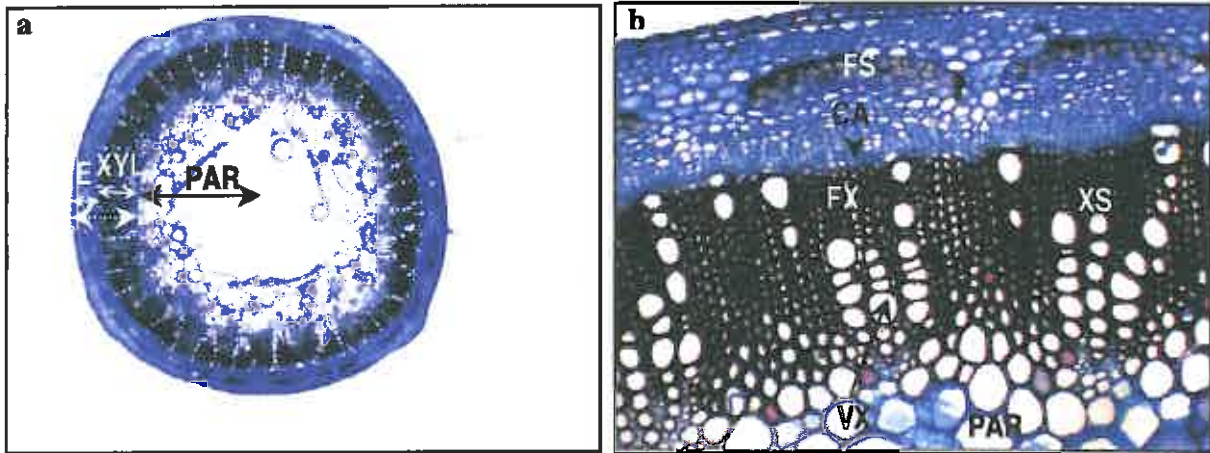


Figure 2.10 : Illustration des différents caractères mesurés en bas des tiges dans l'étude de la diversité génétique, et de la recherche de marqueurs dans la population F<sub>1</sub>.

a : au grossissement X30, b : grossissement X 200, E : écorce, XYL : xylème, PAR : parenchyme médullaire, FS : fibres supraphloémiennes, CA : cambium, FX : fibres du xylème, VX : vaisseaux du xylème, XS : xylème secondaire.

## 2.3. Mesure des caractères biochimiques

### 2.3.1. Détermination des teneurs en parois (NDF : Neutral Detergent Fiber)

Pour mesurer les teneurs en parois, nous avons utilisé la méthode de Goering et Van Soest (1970). Cette méthode permet de déterminer les différents constituants membranaires. L'ensemble de ces constituants (parois) est obtenu après attaque par une solution de détergent neutre (NDS) dont la composition est décrite en annexe 2.5. Deux répétitions analytiques ont été réalisées pour chaque échantillon.

### 2.3.2. Détermination des teneurs en Lignine Klason (LK)

Les lignines ou lignines Klason sont obtenues après action d'une solution d'acide sulfurique à 72% sur le résidu NDF de Van Soest. On parle de lignine Klason du NDF. Deux répétitions analytiques ont été réalisées pour chaque échantillon. Classiquement c'est l'ADL (Acid Detergent Lignin) qui est mesurée. La méthode de l'obtention du résidu ADL consiste dans un premier temps à obtenir le résidu ADF (Acid Detergent Fiber : correspond à la lignine et à la cellulose) à partir du résidu NDF par action d'une solution d'ADS (détergent acide) composée d'acide sulfurique et de CTAB. L'ADL est alors obtenu à partir du résidu ADF (Acid Detergent Fiber) par l'action d'une solution d'acide sulfurique à 72%. Hatfield et al. (1994) ont observé des valeurs de lignine klason supérieures aux valeurs d'ADL sur de la luzerne et du dactyle. L'action des détergents acides semble enlever une partie des lignines comme l'ont suggéré Kondo et al. (1987). Cependant les études de Jung et al. (1993) ont montré que les deux types de lignines pouvaient prédire de façon aussi efficace la digestibilité *in vitro* et *in vivo* des fourrages. De plus nous avons fait des mesures de corrélation entre l'ADL mesuré par la technique de Van Soest et la lignine Klason du NDF. Les résultats montrent qu'il y a une corrélation positive et significative entre les deux types de mesure ( $r=0,86$ , d.d.l.=59).

### 2.3.3. Détermination de la solubilité enzymatique des tiges (PCT)

La méthode utilisée (Lila et al., 1986) est adaptée de la méthode d'Aufrère (1982) et fait appel à une succession de digestions par des enzymes, réalisées sur des échantillons de matière sèche de tige. Les échantillons broyés sont placés dans des sachets de nylon et sont soumis aux différentes attaques enzymatiques. La première attaque enzymatique est assurée par des pepsines en milieu acide. La deuxième attaque est ensuite réalisée par un mélange de cellulases et hémicellulases. La différence entre la quantité de matière sèche de l'échantillon de départ et le résidu obtenu après ces deux attaques constitue la quantité de matière sèche dégradée (ou digérée) par les enzymes.

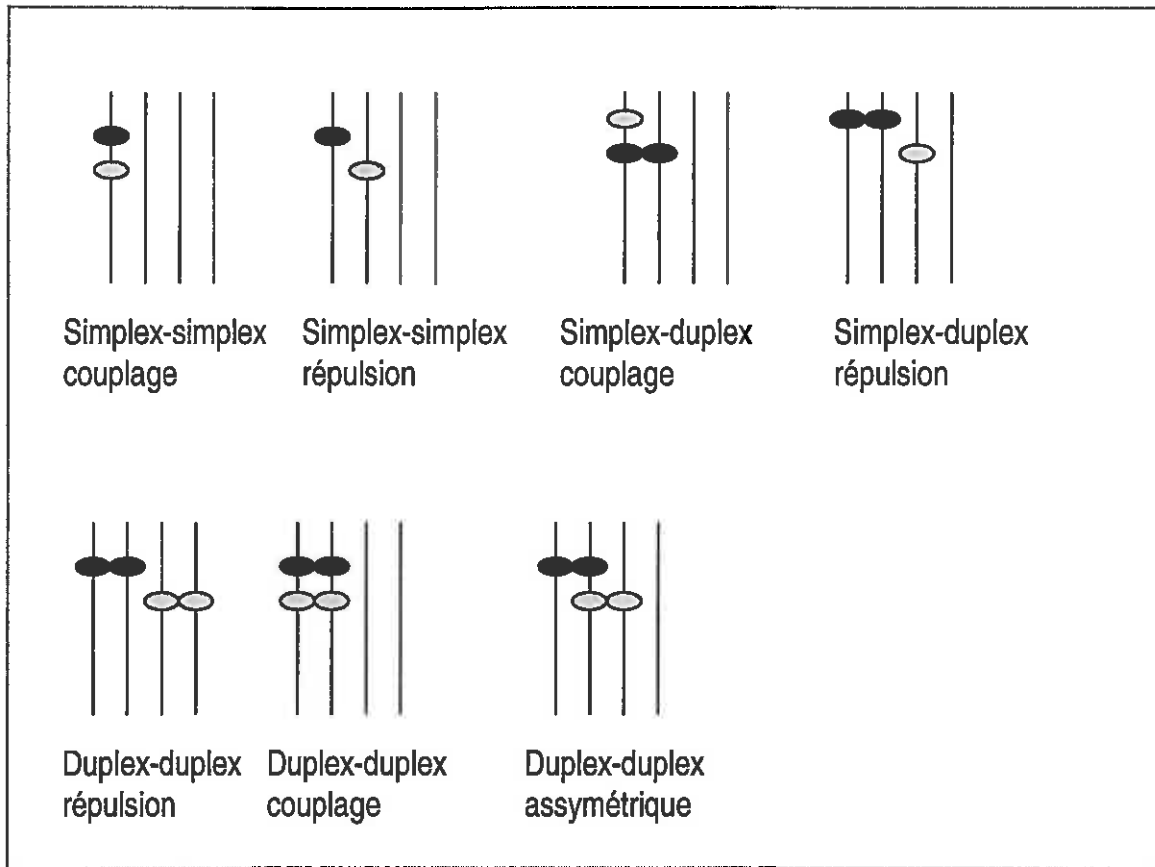


Figure 2.11 : Représentation des différents types de liaison possibles entre marqueurs simplex et duplex chez une espèce tétraploïde (les batonnets représentent les 4 chromosomes homologues, et les points représentent les locus marqueurs sur les chromosomes).

## 2.4. Méthodologie de la cartographie

La recherche de marqueurs associés à la variation des caractères histologiques, morphologiques et biochimiques ayant été réalisé sur des cartes existantes réalisées dans l'équipe du laboratoire, cette partie fait rapidement le point sur les différentes étapes de la méthodologie de la cartographie chez les polyploïdes.

Rappelons que la luzerne est autotétraploïde ( $2n=4x=32$ ), elle a une hérédité tétrasomique. C'est à dire qu'au cours de la méiose, un chromosome a autant de chance de s'apparier avec chacun des autres chromosomes de son groupe d'homologie. L'étude de la ségrégation de marqueurs dominants (type AFLP) dans la descendance d'un croisement permet d'établir une carte par parent car on ne prend que les marqueurs présents chez chacun des parents.

La cartographie génétique consiste à ordonner les locus marqueurs dans les groupes de liaison (32 attendus chez la luzerne) et à assigner les groupes de liaison à des groupes d'homologie (8 groupes chez la luzerne qui regroupent les 4 chromosomes homologues). La formation des groupes de liaison pour les marqueurs simplex (présents en simple dose chez un des parents : A000 x 0000) liés en couplage est réalisée par les logiciels de cartographie classique des diploïdes. Cela permet d'obtenir une carte formée de groupes de liaison permettant d'intégrer par la suite les autres types de marqueurs (simplex en répulsion, microsatellites et duplex présents en double dose chez un des parents (permettent de retrouver les groupes d'homologie), simplex biparentaux (provenant à la fois des 2 parents).

La première étape consiste à déterminer la dose du marqueur (simplex ou duplex). Au-delà de ce dosage (triplex), si on utilise des marqueurs dominants, le polymorphisme ne sera pas observé dans la descendance autotétraploïde. Le dosage des marqueurs est déterminé en comparant leur distribution dans la descendance aux distributions théoriques attendues, grâce à des tests de  $\chi^2$ .

L'étape suivante consiste à détecter les liaisons et à estimer les taux de recombinaison ( $r$ ) entre deux marqueurs. Ces taux de recombinaison peuvent être estimés en réalisant un test d'indépendance des marqueurs (Lorieux, 1993) ou par la méthode du maximum de vraisemblance qui permet de tester la présence d'une liaison en évaluant la valeur de  $r$  (vraisemblance du taux de recombinaison  $r$ , c'est à dire la probabilité que la liaison entre 2 marqueurs soit vraie) (De Vienne (1995) pour la théorie des diploïdes et Hackett et al. (1998); Ripol et al. (1999); Luo et al (2001), Marhadour (2001) pour celle des polyploïdes). Ensuite, les groupes de liaison sont détectés et l'ordre des marqueurs est déterminé dans les groupes grâce à des logiciels classiques de cartographie dans le cas des espèces diploïdes, soit par des logiciels adaptés aux polyploïdes. Pour établir les liaisons entre



marqueurs pris 2 à 2 (calcul de  $r$ ), il faut tenir compte du dosage allélique du marqueur mais également de la phase de liaison (types d'association entre 2 marqueurs sur les chromosomes) (figure 2.11).

La dernière étape consiste à déterminer les groupes d'homologie à l'aide des marqueurs microsatellites, des marqueurs duplex et des marqueurs en répulsion. Un marqueur duplex peut être cartographié sur deux groupes de liaison différents, auquel cas il permet de relier ces groupes de liaison en groupes d'homologie. Les marqueurs microsatellites quant à eux permettent de cartographier plusieurs allèles du même locus (sur les chromosomes homologues) dans des groupes de liaison différents, ce qui permet d'associer aisément les groupes de liaison en groupes d'homologie.

En théorie lorsqu'une carte est saturée, on doit trouver autant de groupes de liaison que de chromosomes. Une carte saturée est une carte dans laquelle tout point du génome est génétiquement lié à au moins un marqueur. Lorsqu'une carte n'est pas saturée, on a en général de nombreux groupes de liaison de petite taille, et des marqueurs isolés. L'augmentation du nombre de marqueurs a normalement pour conséquence de relier les groupes indépendants, jusqu'à ce qu'il y ait autant de groupes de liaison que de chromosomes.

### 3. ANALYSES STATISTIQUES

#### 3.1. Description des caractères morphologiques et histologiques le long des tiges de luzerne

L'analyse de l'effet de la position sur la tige et des différences entre génotypes D+ et D- sur les mesures histologiques et morphologiques le long de la tige a été réalisée en utilisant la procédure MIXED de SAS (Littell et al., 1998). Cette procédure est basée sur l'analyse des mesures répétées. Le terme mesures répétées se rapporte à des mesures multiples d'une réponse sur une même unité expérimentale. Dans notre étude, cette unité expérimentale est représentée par les tiges hiérarchisées au génotype. Dans la plupart des cas, les mesures multiples sont prises au cours du temps, mais elles peuvent aussi être prises à différents endroits dans l'espace (ici position le long de la tige). Les tiges sont une variable aléatoire. Les positions le long de la tige ne sont pas indépendantes les unes des autres, ni les erreurs. Cependant les mesures (ou l'erreur liée à chaque position le long de la tige) sur une même unité expérimentale sont corrélées car elles contiennent une information commune par rapport à l'unité expérimentale. Les mesures sur une même unité expérimentale proches dans l'espace sont corrélées plus fortement que celles qui sont éloignées. Le schéma de corrélations et de variations conduit à une structure de covariance des mesures répétées qui est complexe. Ces mesures proches

dans l'espace et corrélées sur un même individu représentent la covariation à l'intérieur d'un individu spécifiée dans la procédure MIXED par l'option REPEATED.

Il est également possible d'utiliser i) une analyse séparée à chaque point position sur la tige, mais qui ne permet pas d'étudier des tendances le long des tiges ii) une analyse de variance utilisant la procédure GLM avec l'option RANDOM ou REPEATED, mais les données manquantes ne sont pas prises en compte et l'unité expérimentale est éliminée et ces méthodes produisent des tests inefficaces avec des erreurs standards incorrectes, iii) un modèle mixte utilisant la procédure MIXED. La procédure mixed fournit des erreurs standards valides et des tests statistiques corrects, et permet des analyses avec des données manquantes (Littell et al., 1998).

Le modèle standard s'écrit de la façon suivante :

$$Y_{ijkl} = \mu + GE_i + T_j + POS_k + (GExPOS)_{ik} + C_l + (GExC)_{il} + E_{ijkl}$$

avec  $\mu$  la moyenne générale à une position donnée k pour une tige j dans un génotype i,  $GE_i$  : effet fixe du génotype,  $T_j$  : effet aléatoire de la tige j dans un génotype i,  $POS_k$  : effet fixe de la position k sur la tige j,  $GExPOS_{ik}$  : interaction du génotype i et de la position k sur la tige,  $C_l$  : effet de la récolte l,  $GExC_{il}$  : interaction du génotype et de la récolte,  $E_{ijkl}$  : erreur résiduelle. Le modèle mixte étend le modèle linéaire généralisé précédent en permettant une spécification flexible de la matrice de covariance de E.

Le modèle mixte s'écrit :  $Y = X\beta + Zu + e$ , où Y est le vecteur des observations, Z : matrice inconnue, u : vecteur inconnu des paramètres aléatoires (contient les variables effets entre individus  $T_j$ , X : matrice connue,  $\beta$  : vecteur inconnu des paramètres effets fixes (contient les effets fixes  $\mu$ ,  $GE_i$ ,  $POS_k$ ,  $(GExPOS)_{ik}$ ,  $C_l$ ,  $(GExC)_{il}$ ) et e contient les erreurs résiduelles à l'intérieur d'un individu i à une position k sur la tige j et pour une récolte l.

L'analyse statistique des mesures biochimiques de teneurs en NDF et en lignine Klason a été réalisée pour chaque strate de 10 cm de hauteur le long de la tige en utilisant la procédure GLM de SAS (1988) suivant le modèle statistique :  $y_{ij} = \mu + GE_i + C_j + (GExC)_{ij} + E_{ij}$ , avec GE : effet du génotype, C : effet de la récolte, et GE x C : interaction génotype et récolte. Les répétitions analytiques sont comprises dans l'erreur résiduelle. Le but est de définir pour quel niveau de la tige les différences entre les 2 génotypes testés sont les plus significatives.

### 3.2. Etude de la diversité génétique

#### 3.2.1. Traitement statistique pour l'essai entre cultivars

Les différences entre populations pour les caractères histologiques et morphologiques ont été testées par analyse de variance en utilisant la procédure GLM de SAS (1988). Les données sont analysées en considérant les 2 récoltes, de la même façon que dans un dispositif en Split-Plot. En effet, chez les plantes pérennes subissent différentes récoltes (observations successives) la même année. Les parcelles (cultivars) sur lesquelles on réalise des récoltes successives constituent les parcelles principales, et les différentes récoltes constituent les sous parcelles (Little et Hills, 1978). Dans ce cas, le modèle statistique est le suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + P_j + (B \times P)_{ij} + C_k + (C \times P)_{kj} + E_{ijk} ,$$

avec B: effet du bloc, P: effet du cultivar, BxP : interaction bloc x cultivar, C: effet de la coupe, CxP : interaction récolte x cultivar, et E : erreur résiduelle. Les effets bloc et cultivar sont testés par rapport à l'interaction bloc x cultivar, les effets récolte et interaction récolte x cultivar sont testés par rapport à l'erreur résiduelle.

#### 3.2.2. Traitement statistique pour l'essai intra-cultivar

Les moyennes et écarts-types pour chaque cultivar (moyennes des 3 blocs) et à l'intérieur des cultivars (moyennes des 10 génotypes) pour chaque récolte, ont été calculés en utilisant la procédure MEANS de SAS (1988).

Les corrélations phénotypiques ont été réalisées en utilisant la procédure CORR de SAS (1988), sur la moyenne des répétitions (tiges) de chacun des 10 génotypes par cultivar (avec un nombre de ddl de 38).

### 3.3. Etude phénotypique de la population F<sub>1</sub>

#### 3.3.1. Etude phénotypique

L'effet du génotype F<sub>1</sub> (individu) a été recherché pour chaque caractère mesuré dans la population F<sub>1</sub> par une analyse de variance réalisée grâce à la procédure GLM de type III de SAS (1988) suivant le modèle :

$$Y_{ij} = \mu + GE_i + Rep_j + E_{ij} ,$$

avec  $\mu$  la moyenne de la population F<sub>1</sub>, GE<sub>i</sub> l'effet du génotype i, Rep<sub>j</sub> l'effet de la répétition j, et E<sub>ij</sub> l'erreur résiduelle. Les résiduelles ont été obtenues et leur normalité a été testée pour chaque caractère

par la procédure UNIVARIATE de SAS à un seuil de 0.01. Lorsque les résiduelles ne sont pas distribuées normalement, les données sont analysées par un test non paramétrique de Wilcoxon de classement de données non appariées en utilisant la procédure NPAR1WAY de SAS. Les différences ont été testées au seuil  $p < 0.05$ . Pour chacun des caractères, les moyennes de chaque parent et de la population  $F_1$  et écarts-types ont été calculés par la procédure MEANS de SAS et la normalité de la distribution des valeurs phénotypiques de la population pour chaque caractère a été évaluée en observant la répartition des individus (génotypes) dans la population pour chaque caractère.

Les corrélations phénotypiques ont été calculées sur les moyennes des génotypes  $F_1$  de la population pour chaque caractère en utilisant la procédure CORR de SAS (1988). Les corrélations génétiques ont été calculées en utilisant l'option MANOVA de la procédure GLM de SAS, avec la matrice de variance/covariance de l'effet du génotype et la matrice de variance/covariance de la résiduelle.

L'héritabilité au sens large des caractères a été calculée en utilisant la relation suivante :

$$h^2 = \frac{\sigma_{GE}^2}{\sigma_{GE}^2 + \sigma_E^2} \text{ (Wricke et Weber, 1986)}$$

Les variances du génotype et de l'erreur ont été calculées en utilisant la procédure VARCOMP de SAS en déclarant l'effet du génotype comme variable aléatoire.

### 3.3.2. Recherche de marqueurs associés

Une première partie introductive fait le point sur la recherche de marqueurs associés à des caractères d'intérêt, et sur les différentes méthodes utilisées pour détecter des liaisons significatives entre marqueurs et caractères d'intérêt.

#### *Recherche de marqueurs associés à des caractères d'intérêt*

Cette étude est une des premières sur la recherche de liaisons entre marqueurs moléculaires et des caractères d'intérêt avec une population de cartographie chez la luzerne autotétraploïde. Brouwer et al. (2000) ont mené une étude de recherche de QTI sur la résistance au froid chez la luzerne autotétraploïde.

*Méthodes utilisées pour détecter les liaisons significatives entre marqueurs et caractères d'intérêt*

Chez les espèces polyploïdes, la détection de QTL comme l'établissement des cartes génétiques pose des problèmes de méthodologie. La recherche de QTLs chez les polyploïdes se contente à l'heure actuelle de détecter les liaisons significatives entre la présence d'un marqueur et des caractères d'intérêt. Il existe différentes méthodes permettant de détecter des QTLs chez les polyploïdes. La détection de QTL par la méthode d'Interval Mapping (cartographie d'intervalle) basée sur la présence d'un QTL entre deux marqueurs liés par un taux de recombinaison  $r$  n'est pas du tout utilisée faute de logiciel adapté, ces logiciels étant développés pour les espèces diploïdes. La théorie de l'Interval Mapping a été développée par Hackett et al. (2001) pour les tétraploïdes, cependant le logiciel n'est pas disponible. La méthode BSA ou Bulk Segregant Analysis décrite par Michelmore et al. (1991) peut être également utilisée. Elle consiste à partir d'une population en ségrégation pour un caractère gouverné par un gène majeur à regrouper l'ADN des individus de même phénotype, et à comparer le génotype de ces mélanges. Seuls les locus liés au gène étudié montreront des différences de présence/absence dans la descendance. La méthode BSA a été utilisée par Obert et al. (2000) chez la luzerne tétraploïde pour détecter des marqueurs liés à la résistance au mildiou. Obert et al. (2000) ont recherché des marqueurs AFLP liés la résistance au mildiou chez la luzerne tétraploïde. Ils ont mis en évidence dans deux populations sélectionnées pour leur résistance différente à un seul pathogène, 4 marqueurs AFLP significativement liés avec la sensibilité ou la résistance. Une autre étude porte sur la recherche de marqueurs RAPD associés avec l'embryogenèse somatique chez la luzerne (Yu et Pauls, 1993).

La recherche de marqueurs liés à des caractères d'intérêt se fait grâce à différents tests statistiques : tests  $t$  de différences de moyennes (Bradshaw et al., 1998; Zimnoch-Guzowska et al., 2000), des test  $\chi^2$  (Liu et al., 1998; Yu et Pauls, 1993; Obert et al., 2000), tests de permutation (Churchill et Doerge, 1994; Meyer et al., 1998), analyse de variance marqueur par marqueur (Liu et al., 1998) et régression multiple (Ortiz et Peloquin, 1992). Lorsque la distribution des données n'est pas normale des tests non-paramétriques de Mann-Whitney U-Test (Meyer et al., 1998) peuvent être utilisés. Leonards-Schippers et al. (1994) sur la pomme de terre (autre espèce autotétraploïde) ont testé la méthode de différences des moyennes (test  $t$ ) avec la méthode d'Interval Mapping, et ils ont identifié la même région impliquée dans la résistance à *P. infestans* avec les deux types d'approche.

Le pouvoir de détection des QTL peut être augmentée en analysant des données phénotypiques collectées sur plusieurs années ou lieux pour minimiser la variance environnementale (Liu et al., 1998). Dans cette étude, nous avons utilisé l'analyse de variance pour détecter les marqueurs liés significativement aux caractères mesurés, et également pour faire le tri des marqueurs et éliminer ceux qui pourraient être redondants.

L'effet ou l'ampleur d'un QTL est déterminé par son  $R^2$  phénotypique: c'est à dire le pourcentage de variation phénotypique totale expliquée par le QTL (Charcosset, 1996). Seule la partie génotypique de la variation phénotypique totale peut être décomposée en QTLs. Du point de vue génétique, le QTL d'un caractère moyennement héritable (0,40) ayant un  $R^2$  phénotypique de 10% a le même poids qu'un QTL d'un caractère héritable à 80% avec un  $R^2$  phénotypique de 20%.

#### *Méthode utilisée dans notre étude*

Pour détecter les liaisons significatives entre les marqueurs et les caractères, une analyse de variance a été réalisée pour chaque parent, marqueur par marqueur, en utilisant la procédure GLM de SAS de type III (les parents n'ayant pas forcément les mêmes marqueurs, il est ainsi plus facile de voir de quel parent proviennent les marqueurs significatifs), suivant le modèle :

$$Y_{ij} = \mu + \text{Marq}_i + E_{ij} ,$$

avec Marq : état du marqueur (présence ou absence). Ce modèle teste si la présence (1) ou l'absence du marqueur (0) a un effet significatif sur les moyennes phénotypiques correspondantes. Ce modèle est également utilisé pour les allèles des locus microsatellites. Seuls les marqueurs dont la distribution n'est pas distordue ont été utilisés. La normalité des résiduelles a été testée par la procédure UNIVARIATE de SAS au seuil de 0.01. Pour les caractères dont les résiduelles sont normales, les marqueurs significatifs retenus sont ceux qui présentent des probabilités inférieures à 0.05 (annexe 2.7). Pour les caractères dont les résiduelles ne sont pas distribuées normalement, les données sont analysées par un test de Wilcoxon de classement de données non appariées en utilisant la procédure NPAR1WAY de SAS et sur le modèle précédent et les marqueurs significatifs retenus sont ceux dont les probabilités sont inférieures à 0.05 (annexe 2.8).

Lorsque les marqueurs sont significativement liés à un caractère (seuil 0.05), ils peuvent être non indépendants les uns des autres (marqueurs génétiquement liés). C'est à dire que les effectifs d'individus présents dans la classe (1) présence et dans la classe (0) absence du marqueur seront identiques pour ces marqueurs.

Pour trier les marqueurs qui pourraient être redondants, une analyse de variance utilisant la procédure GLM (de type II) est utilisée en intégrant dans le modèle statistique tous les marqueurs significatifs à un seuil de 0.05. Cette procédure permet de tester l'effet de chaque marqueur en tenant compte des autres marqueurs du modèle. Par exemple pour 2 marqueurs significatifs à l'issue de l'analyse GLM de type III, le modèle statistique est le suivant :

$$Y_{ij} = \mu + M1_i + M2_j + (M1M2)_{ij} + E_{ij}$$



avec M1 : effet du marqueur 1, M2 : effet du marqueur 2, et M1M2 : interaction entre les deux marqueurs. Les marqueurs retenus sont ceux qui sont significatifs à un seuil de 0.15.

Les effets d'épistasie (interactions entre locus marqueurs) sont analysés en testant les interactions entre les marqueurs pris deux à deux, uniquement sur les marqueurs significatifs à un seuil de 0.15 à l'issue de l'analyse GLM de type II. Les  $R^2$  (pourcentage de variation phénotypique expliquée par le marqueur) sont calculés pour chaque marqueur à partir de leur somme des carrés et de la somme des carrés du total ( $SS_{\text{marqueur}} / (SS_{\text{total}} - SS_{\text{marqueur}})$ ). Pour les caractères ayant des résiduelles qui ne suivent pas une distribution normale, les  $R^2$  sont calculés par la relation suivante :

$|a/(Q3 - Q1)|^2 / 4$ , avec  $a$  l'effet du marqueur sur le caractère (différence entre la moyenne de la classe 0 absence du marqueur et de la classe 1 présence du marqueur),  $Q3 - Q1$  : écart inter-quartile.

L'effet (positif ou négatif) de chaque marqueur sur les caractères est défini en faisant la moyenne (ou médiane) des classes 0 et 1 par la procédure MEANS de SAS (1988) (on regarde si la présence du marqueur a un effet positif ou négatif sur le caractère).

Les marqueurs significatifs à l'issue de l'analyse GLM de type II sont localisés sur la carte de chaque parent et l'effet du marqueur est signalé par un "+" quand l'effet est positif et par un "-" quand l'effet est négatif, et le pourcentage de variation phénotypique expliquée par le marqueur est indiqué.



## CHAPITRE III : RESULTATS et DISCUSSION

<b>1. Description des caractères histologiques et biochimiques le long de la tige, relation avec la morphologie des tiges</b> .....	<b>53</b>
1.1.Morphologie des tiges .....	53
1.2.Evolution des caractères biochimiques le long de la tige .....	54
1.3.Evolution des caractères histologiques le long de la tige .....	55
1.4.Discussion .....	58
<b>2. Etude de la diversité génétique entre cultivars et à l'intérieur des cultivars</b> .....	<b>61</b>
2.1.Variabilité pour les caractères observés .....	61
2.2.Corrélations entre les caractères histologiques et morphologiques .....	65
2.3.Discussion .....	65
<b>3. Recherche de marqueurs associés ("QTLs") aux caractères mesurés</b> .....	<b>67</b>
3.1.Variabilité génétique dans la population de cartographie .....	67
3.2.Recherche de marqueurs (QTLs) .....	71
3.3.Discussion .....	75

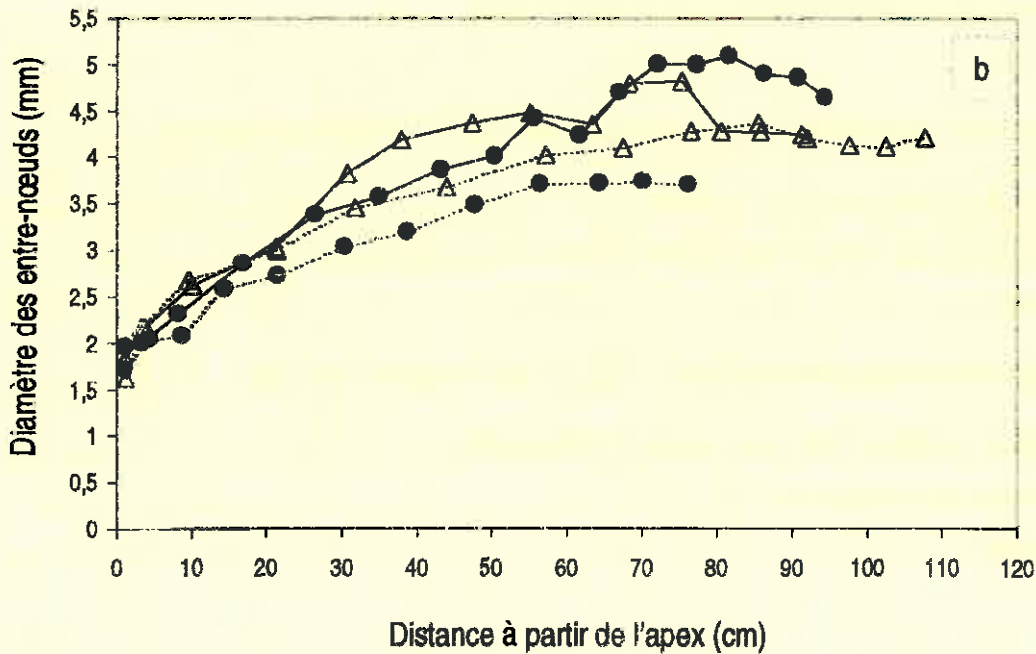
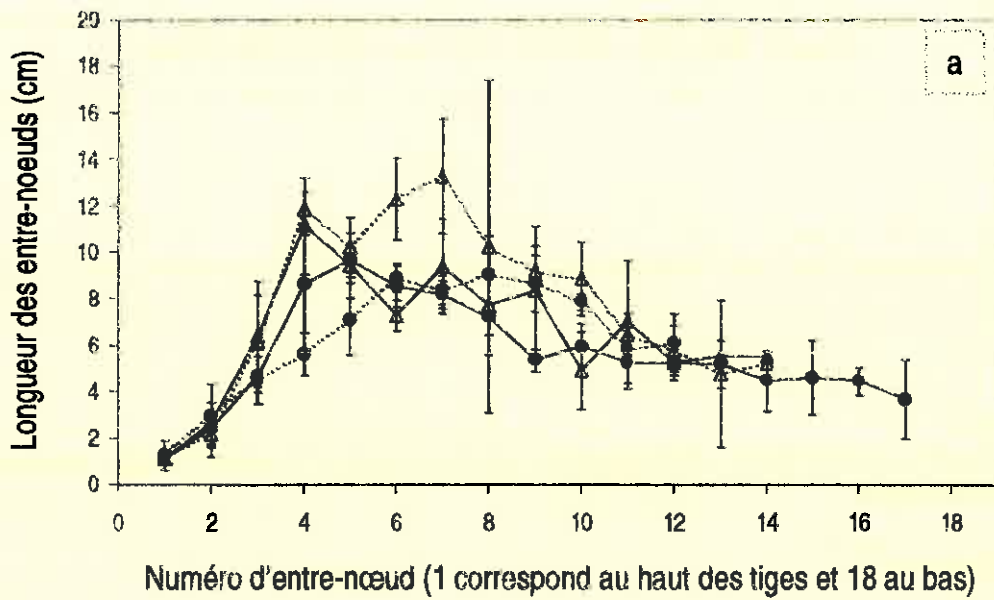


Figure 3.1 : Longueur des entre-nœuds en cm depuis l'apex vers le bas des tiges (a) pour le génotype D+ (●) et le génotype D- (△) et diamètre des entre-nœuds en mm depuis l'apex vers le bas des tiges (b) : chaque point représente un entre-nœud. La récolte 1 est représentée par — et la récolte 2 par — .  
 Pour l'origine des génotypes D+ et D- voir figure 2.2 dans la partie matériel et méthodes.

Le but de cette première partie est de montrer comment les différents caractères histologiques mesurés évoluent le long de la tige, et en fonction du génotype choisi et des récoltes. Cette première partie doit également permettre d'optimiser l'échantillonnage des tiges et de la position sur la tige pour étudier la diversité génétique inter et intra cultivar. Elle permet également de faire le point sur les connaissances en terme de morphologie des tiges (évolution du diamètre et de la longueur des entrenœuds).

## 1. DESCRIPTION DES CARACTERES HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES LE LONG DE LA TIGE, RELATION AVEC LA MORPHOLOGIE DES TIGES

### 1.1. Morphologie des tiges

#### 1.1.1. Longueur des entre-nœuds

La figure 3.1 (a) illustre les profils d'évolution de la longueur des entre-nœuds le long des tiges en partant du haut des tiges. La longueur des entre-nœuds augmente rapidement au niveau des 4 premiers entre-nœuds en ce qui concerne le génotype D-, et au niveau des 5 premiers entre-nœuds en ce qui concerne le génotype D+. Cette augmentation rapide de longueur correspond à des entre-nœuds en élongation primaire. La longueur maximale des entre-nœuds (entre-nœud 4) est d'environ 11 cm pour le génotype D- et 9 cm pour le génotype D+. La somme des longueurs des 3 premiers entre-nœuds en élongation est d'environ 10 cm. Au-delà de ce quatrième ou cinquième entre-nœud, la longueur des entre-nœuds diminue surtout pour la première récolte. Pour la deuxième récolte, la longueur des entre-nœuds suivants a tendance à rester stable jusqu'à l'entre-nœud 9 (D+) et 7 (D-), puis la longueur des entre-nœuds matures diminue.

Le génotype D- présente en moyenne des tiges plus longues (figure 3.1 b) à la récolte 2 (107,6 cm) qu'à la récolte 1 (91,9 cm), et le génotype D+ également (récolte 1 : 94,4 et 76,1 cm à la deuxième récolte). L'analyse en données répétées (tableau 3.1) indique qu'il n'y a pas de différences entre les deux génotypes dans leur profil d'évolution de la longueur des entre-nœuds à la récolte 1. A la récolte 2, on observe des différences significatives entre les deux génotypes. Dans l'analyse conjointe sur les deux récoltes, la longueur des entre-nœuds diffère entre les deux génotypes. On observe un effet de la récolte significatif pour la longueur des entre-nœuds.

#### 1.1.2. Diamètre des entre-nœuds

La figure 3.1 (b) illustre les profils d'évolution du diamètre des entre-nœuds le long des tiges pour les deux récoltes en fonction de la distance depuis l'apex. Pour les deux génotypes, le diamètre

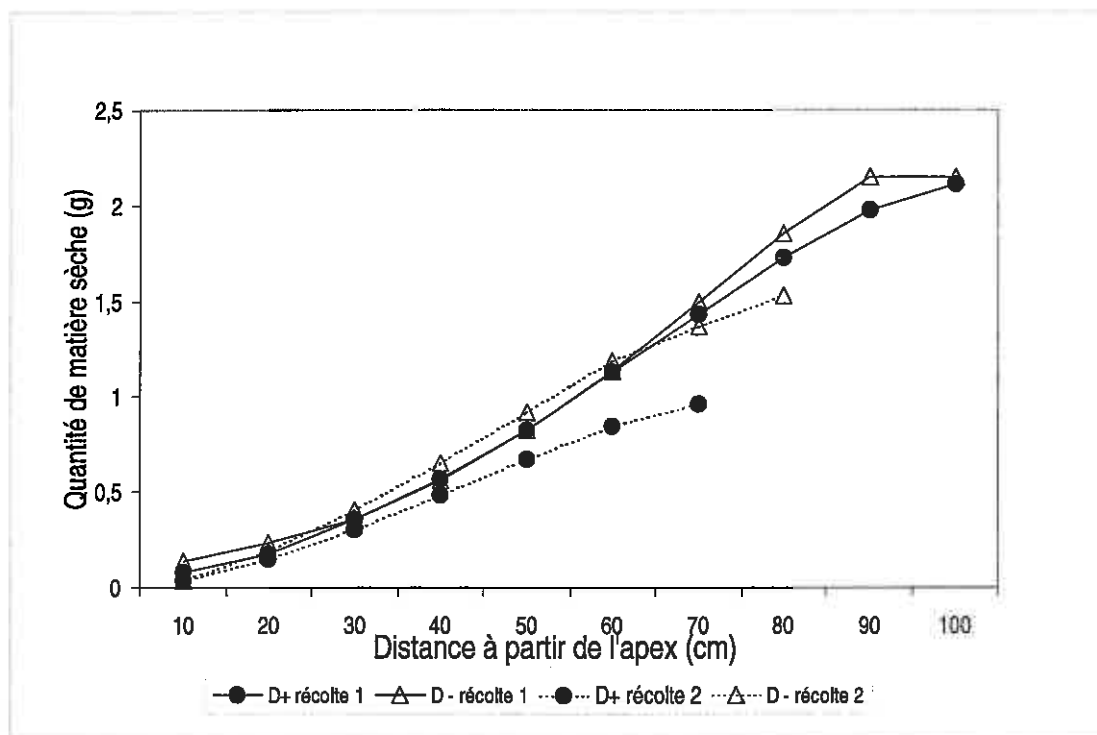


Figure 3.2 : Profils d'évolution des quantités de matières sèche par strate de 10 cm de hauteur

Tableau 3.1 : Valeurs du F et probabilités associées du test à effet fixe en utilisant la structure de covariance asymétrique dans la procédure MIXED de SAS pour les caractères morphologiques des tiges. Analyse par récolte, et analyse conjointe sur les 2 récoltes.

	ddl	Diamètre des entre-noeuds	Longueur des entre-noeuds
<b>Récolte 1</b>			
Génotype	1	0,05ns	2,94ns
Entre-noeud	13	8,89***	12,0***
Génotype x Entre-noeud	11	1,98*	1,39ns
<b>Récolte 2</b>			
Génotype	1	21,30**	9,11*
Entre-noeud	13	26,14***	9,81***
Génotype x Entre-noeud	11	1,57ns	1,68ns
<b>Analyse conjointe sur les 2 récoltes</b>			
Génotype	1	1,67ns	17,97*
Entre-noeud	17	54,20***	19,66***
Génotype x Entre-noeud	13	2,51**	1,58ns
Récolte	1	38,86***	7,43**
Récolte x Génotype	1	4,54*	2,69ns

\*\*\*P<0,001 \*\* P<0,01 \* P<0,05 ns : non significatif

augmente rapidement dans les 4 premiers entre-nœuds (dans les 20 premiers cm), puis continue d'augmenter linéairement mais de façon plus lente à partir du cinquième entre-nœud et se stabilise au niveau du neuvième entre-nœud (à partir de 80 cm de l'apex : zone mature). Les profils d'évolution du diamètre le long de la tige sont similaires pour les deux génotypes. Cependant le diamètre des entre-nœuds est supérieur pour le génotype D-, surtout à la récolte 2 (tableau 3.1).

L'analyse en données répétées (tableau 3.1) indique qu'il n'y a pas de différences entre les deux génotypes dans leur profil d'évolution du diamètre à la récolte 1. A la deuxième récolte, on observe des différences significatives. Dans l'analyse conjointe sur les deux récoltes, il n'y a pas de différences significatives entre les deux génotypes. On observe un effet de la récolte significatif et une interaction récolte x génotype faible.

### **1.1.3. Evolution de la matière sèche le long de la tige**

Les quantités de matière sèche mesurées par strate de 10 cm de hauteur depuis le haut des tiges évoluent de façon plutôt exponentielle le long de la tige (figure 3.2). Les profils d'évolution sont les mêmes pour les deux génotypes à la première récolte, mais à la deuxième récolte la courbe du génotype D+ se trouve au-dessous du génotype D- à partir de 40 cm de l'apex.

## **1.2. Evolution des caractères biochimiques le long de la tige**

### **1.2.1. Evolution des teneurs en NDF**

La figure 3.3 (a) représente l'évolution des teneurs en NDF le long de la tige par strate de 10 cm de hauteur depuis l'apex vers le bas des tiges. Pour les deux récoltes et les deux génotypes, les teneurs en NDF augmentent rapidement dans les 30 premiers cm en haut des tiges, puis l'augmentation est plus lente à partir de 40 cm. Les teneurs en NDF se stabilisent à partir de 60 cm, on note cependant une augmentation légère pour la récolte 1 jusqu'à 80 cm. En haut des tiges, les teneurs en NDF sont de l'ordre de 30% pour la première récolte et pour les deux génotypes, et de 40% à la deuxième récolte. En bas des tiges, les valeurs se stabilisent à 70% et 67% à la récolte 1 et à 75% et 72% à la deuxième récolte pour les génotypes D- et D+ respectivement. L'analyse de variance par strate de 10 cm de hauteur le long de la tige (tableau 3.2) met en évidence des différences entre les deux génotypes en bas des tiges, de 50 cm à 70 cm de l'apex. On observe également un effet de la récolte important, mais pas d'interaction génotype x récolte en bas des tiges.

### **1.2.2. Evolution des teneurs en lignine Klason (LK)**

La figure 3.3 (b) illustre les profils d'évolution des teneurs en LK le long des tiges pour les deux génotypes et sur deux récoltes. De la même façon que pour les teneurs en NDF, les teneurs en

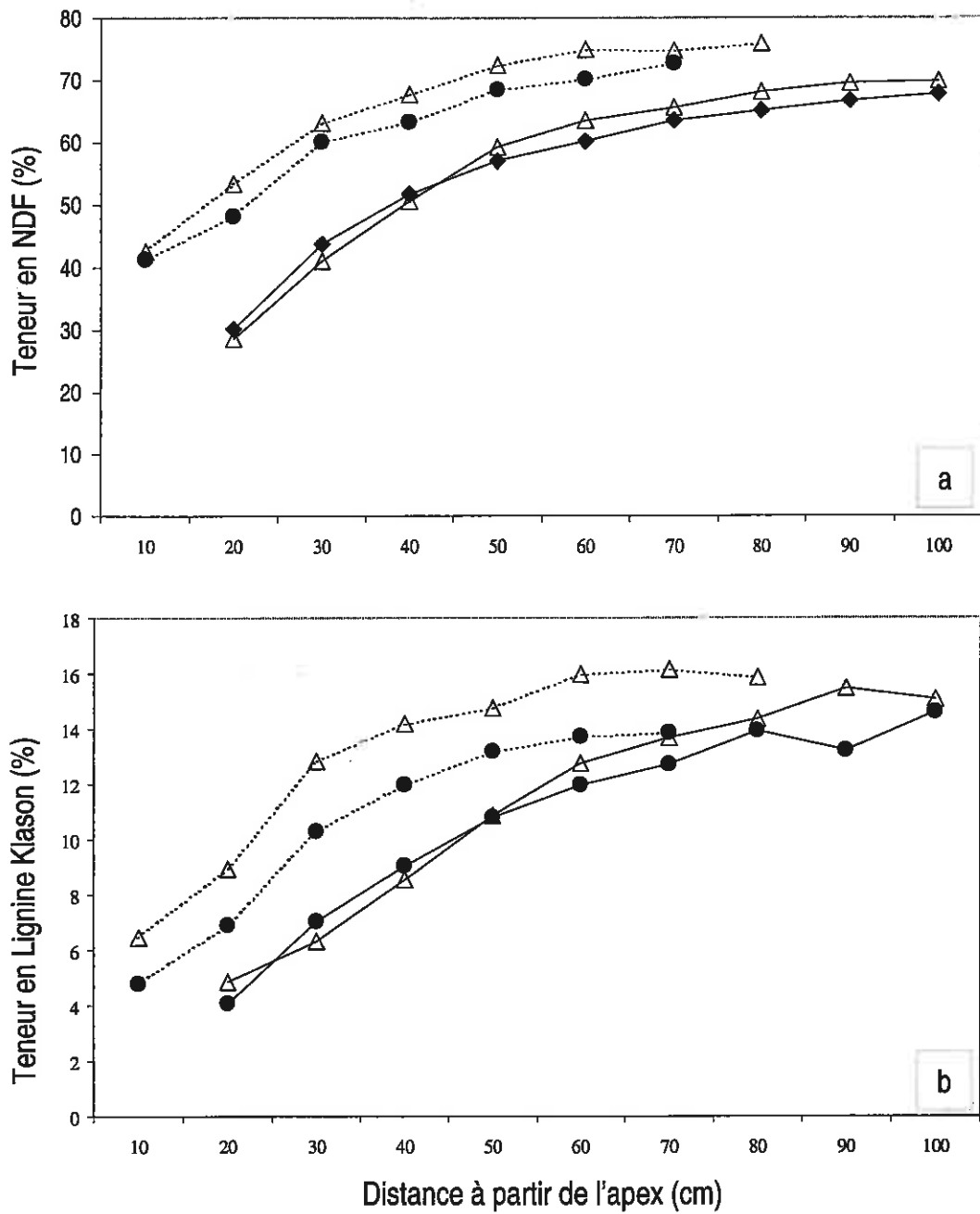


Figure 3.3 : Evolution des teneurs en NDF en % de la matière sèche (a) et en Lignine Klason en % de la matière sèche (b) le long de la tige de l'apex vers le bas, pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -)

Tableau 3.2 : Carrés moyens de l'analyse de variance par strate de 10 cm de hauteur, pour la teneur en NDF (%) et en lignine Klason (%), testant l'effet du génotype, de la récolte et l'interaction entre le génotype et la récolte.

	ddl	Distance à partir de l'apex en cm					
		20	30	40	50	60	70
<b>NDF (%)</b>							
Génotype	1	7.14 ns	0.26 ns	4.44 ns	18.4***	32.3***	8.8**
récolte	1	910.4***	745.3***	402.7***	300.4***	228.2***	172.7***
Génotype x récolte	1	22.8**	14.15***	16.64***	1.56*	0.80	0.017
Erreur résiduelle	4	0.34	0.15	0.05	0.08	0.15	0.14
<b>Lignin Klason (%)</b>							
Génotype	1	4.07 ns	1.84 ns	1.68 ns	1.3 ns	4.6***	4.7*
Récolte	1	23.7**	48.8**	37.8***	19.6***	12.37***	5.9*
Génotype x récolte	1	0.75ns	4.96 ns	3.3*	1.09 ns	1.05**	1.13 ns
Erreur résiduelle	4	0.62	1.36	0.25	0.19	0.03	0.28

\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ , ns : non significatif

ddl : degré de liberté

La strate 10 n'est pas représentée, ni au-delà de 70 cm par manque de quantité de matière sèche dans l'échantillon prélevé.



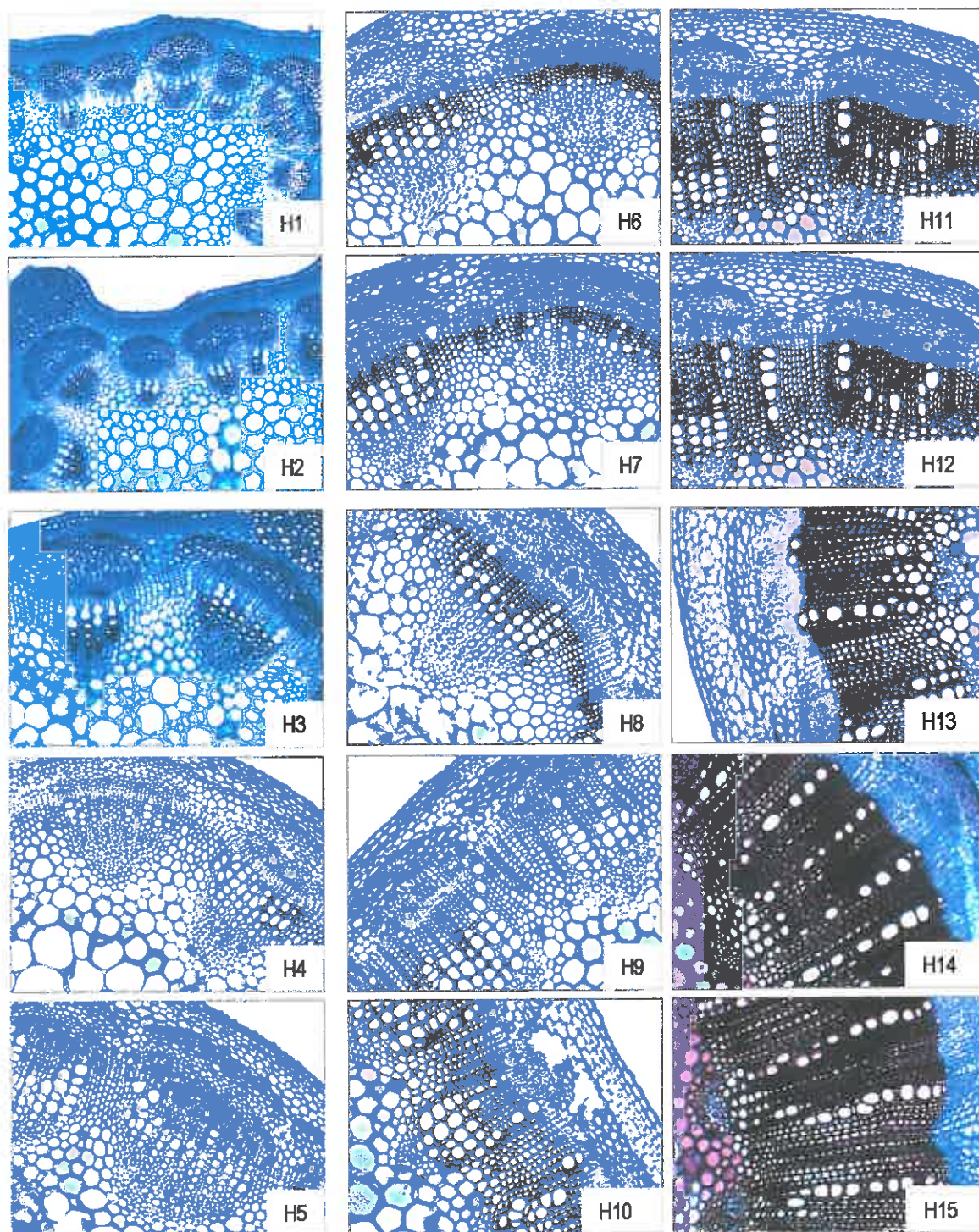


Figure 3.4 : Evolution des structures histologiques du haut vers le bas des tiges de luzerne (exemple du génotype D+, sur une des 3 tiges) (grossissement X 200). H1 : 1 cm de l'apex, H2: 3 cm, H3 : 8-10 cm, H4 : 15-17 cm, H5 : 22-24 cm, H6 : 29-31 cm, H7 : 36-38 cm, H8 : 43-45 cm, H9 : 50-52 cm, H10 : 57-59 cm, H11 : 64-66 cm, H12 : 71-73 cm, H13 : 78-80 cm, H14 : 85-87 cm, H15 : 89-91 cm de l'apex.

lignine augmentent rapidement dans les 30 premiers cm à partir de l'apex puis l'augmentation devient plus lente et les teneurs en lignine se stabilisent à partir de 60 cm de l'apex à la récolte 2, et 80 cm à la récolte 1 pour les deux géotypes étudiés. Les teneurs en lignine sont d'environ 4 et 5% en haut des tiges en coupe 1, et de 5 et 6% en coupe 2 pour le géotype D+ et D- respectivement. Sur tout le profil d'évolution la courbe du géotype D- se situe au-dessus du géotype D+ pour la coupe 2. Pour la récolte 1 il n'en est pas tout à fait de même; les courbes se croisent à 50 cm à partir de l'apex et le géotype D- a plus de lignine que D+ seulement à partir de cet endroit de la tige. Les bas des tiges sont caractérisés par des teneurs en lignine de l'ordre de 15% à la première récolte, et de 14% et 16% à la récolte 2 pour les géotypes D+ et D- respectivement. Les teneurs en lignine évoluent en parallèle avec les teneurs en NDF. L'analyse de variance par strate de 10 cm de hauteur le long de la tige (tableau 3.2) montre des différences en bas de tige (à 60 et 70 cm) entre les deux géotypes, un effet de la récolte important pour toutes les strates et des interactions récolte x géotype significatives mais faibles seulement à 40 et à 60 cm de l'apex.

### 1.3. Evolution des caractères histologiques le long de la tige

La figure 3.4 est une illustration photographique des coupes histologiques effectuées le long de la tige à un grossissement X 200, depuis l'apex vers le bas des tiges. Les 10 premiers cm (correspondant aux images H1 à H3) montrent des faisceaux cribro-vasculaires isolés ce qui est caractéristique d'une zone en croissance caractérisée par des tissus primaires où les parois primaires commencent à se lignifier (H3). A partir de 15-17 cm (H4), le cambium devient continu et met en place progressivement le xylème et le phloème secondaire (H4 à H15). Le cambium reste actif dans toute la zone mature. A partir de 60 cm, le xylème secondaire se lignifie fortement jusqu'en bas des tiges (H10 à H15).

#### 1.3.1. Evolution des caractères liés aux différents tissus constituant la tige

L'évolution des caractères quantifiés au grossissement X 30 est illustrée sur la figure 3.5. Les profils d'évolution de la distance entre l'épiderme et le bord externe du parenchyme médullaire sont similaires pour les deux géotypes et les deux récoltes (figure 3.5 a). Ce caractère évolue de façon linéaire de l'apex vers le bas des tiges. Le tableau 3.3 des résultats de l'analyse en données répétées montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre géotypes, pas d'effet de la position sur la tige et aucune interaction. Ce caractère comprend également l'épaisseur des tissus vasculaires et son augmentation vers le bas des tiges correspond à la mise en place de nouvelles assises cellulaires et donc à une augmentation en diamètre. Même si les analyses statistiques ne mettent pas en évidence

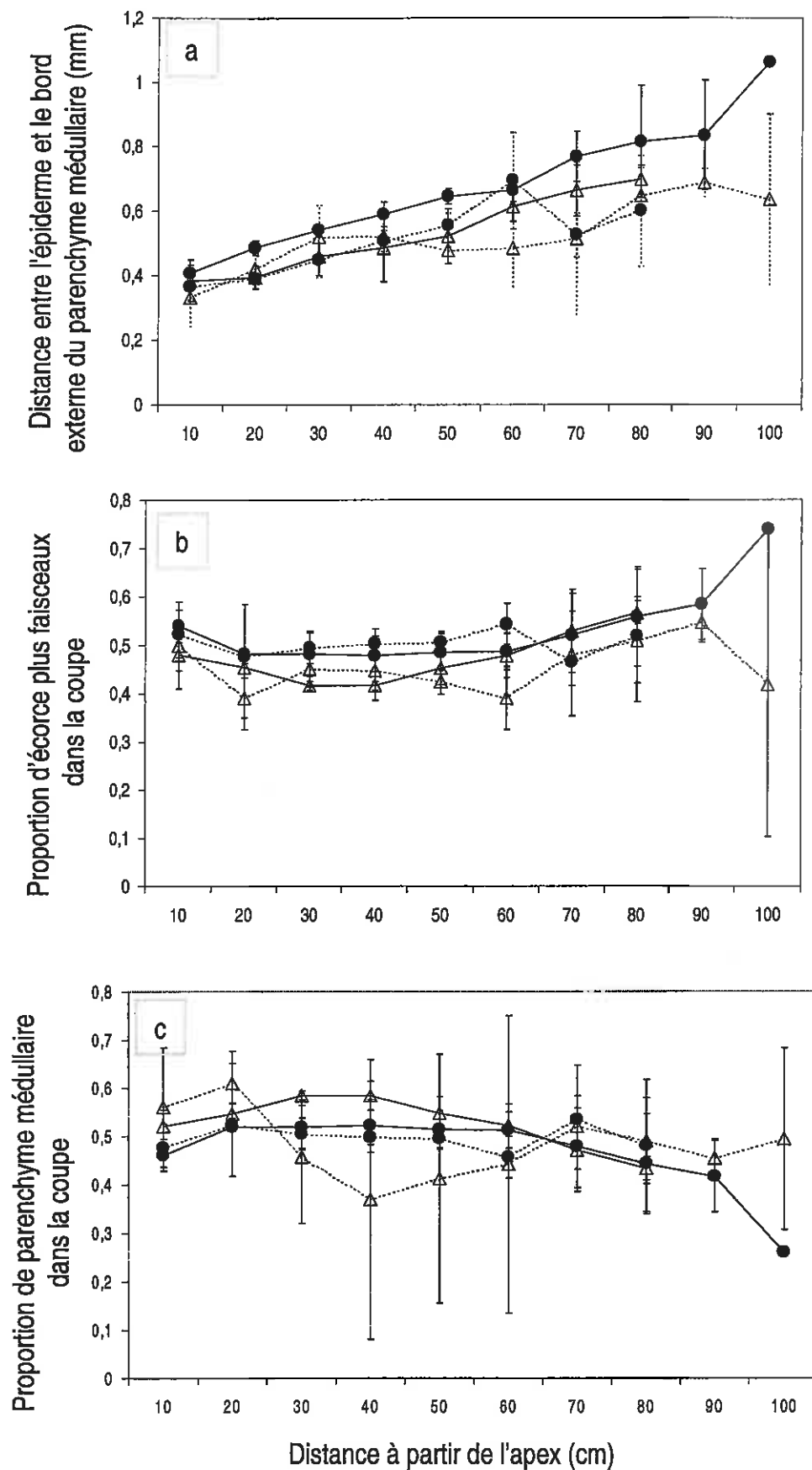


Figure 3.5 : Evolution de l'apex vers le bas des tiges des caractères histologiques mesurés à un grossissement X 30 sur 3 tiges pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -) : distance entre l'épiderme et le bord externe du parenchyme médullaire (a), proportion de parenchyme médullaire dans la coupe (b), et proportion d'écorce et de faisceaux dans la coupe (c)

Tableau 3.3 : Valeurs du F et probabilités associées du test à effet fixe en utilisant la structure de covariance asymétrique de la procédure MIXED de SAS pour les caractères histologiques mesurés à un grossissement X 30

Source de variation	ddl	DISTEP	PECORCE	PPAR
Génotype	1	0,26	10,50*	1,48
Position	9	1,66	3,52**	1,02
Génotype x position	9	1,02	1,96	1,00
Récolte	1	2,77	1,16	1,60
Génotype x récolte	1	0,82	1,10	1,61

\*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$

DISTEP : distance entre l'épiderme et le bord externe du parenchyme médullaire, PECORCE : proportion d'écorce et de faisceaux dans la coupe, PPAR : proportion de parenchyme médullaire dans la coupe, position : position verticale du prélèvement sur la tige.

Tableau 3.4 : Valeurs du F et probabilités associées du test à effet fixe en utilisant la structure de covariance asymétrique de la procédure MIXED de SAS pour les caractères histologiques mesurés à un grossissement X 80

Source de variation	ddl	PXYL	EPECORCE
Génotype	1	3,31	33,14**
Position	9	17,85***	4,59***
Génotype x position	9	1,83	2,50*
Récolte	1	6,58*	10,17**
Génotype x récolte	1	7,37**	1,75

PXYL : proportion de xylème dans la coupe, EPECORCE : épaisseur de l'écorce

Tableau 3.5 : Valeurs du F et probabilités associées du test à effet fixe en utilisant la structure de covariance asymétrique de la procédure MIXED de SAS pour les caractères histologiques mesurés à un grossissement X 200 au niveau d'un faisceau dans le xylème

Source de variation	ddl	LVX	LFX	EPPAR	DSPAR
Génotype	1	26,21**	1,39	0,08	2,71
Position	9	12,99***	0,70	2,86**	15,75***
Génotype x position	9	1,16	1,28	1,20	1,79
Récolte	1	0,35	2,05	18,80***	1,32
Génotype x récolte	1	0,09	9,18**	10,94**	13,05***

LVX : surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème, LFX : surface moyenne des lumières des fibres du xylème, EPPAR : épaisseur des parois du xylème, DSPAR : densité surfacique des parois du xylème



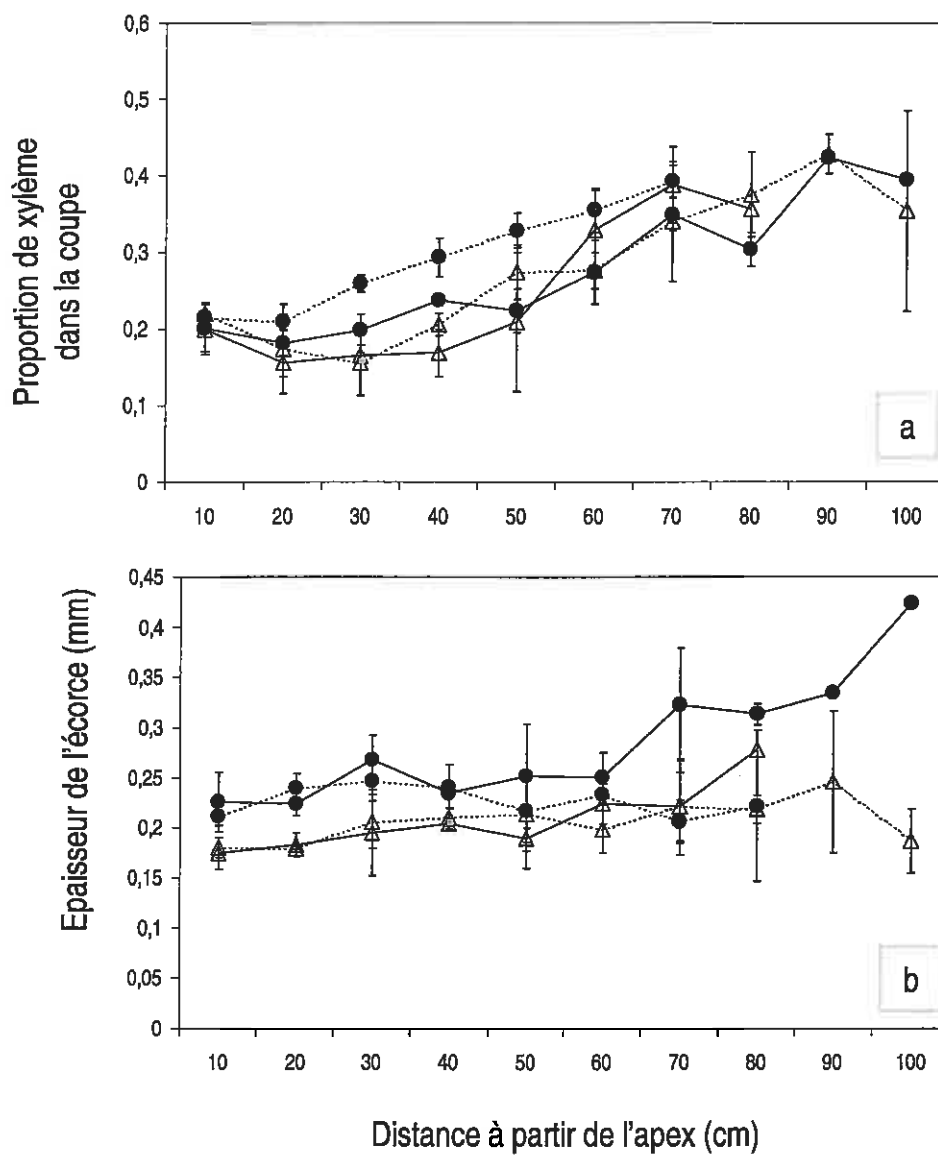


Figure 3.6 : Evolution des caractères histologiques mesurés à un grossissement X 80 sur 3 tiges pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -) : proportion de xylème dans la coupe (a), et épaisseur de l'écorce (b).

de différences entre génotypes, les courbes du génotype D- sont en-dessous du génotype D+ à partir de 50 cm de l'apex.

L'évolution de la proportion d'écorce et de faisceaux (figure 3.5 b) le long de la tige est la même pour les deux génotypes et pour les deux récoltes. Les proportions d'écorce et de faisceaux sont relativement stables dans les 50 premiers cm à partir de l'apex puis augmentent significativement vers le bas des tiges. Il n'y a pas d'effet récolte, ni d'interaction génotype x récolte pour ce caractère.

Les profils d'évolution des proportions de parenchyme médullaire illustrés sur la figure 3.5 c, montrent que ce caractère augmente légèrement dans les 30 premiers cm puis se stabilise jusqu'à 60 cm et diminue vers le bas des tiges. L'analyse en données répétées montre qu'il n'y a pas d'effet de la position le long de la tige sur le caractère, pas d'effet de la récolte ni d'interaction génotype x récolte.

La proportion de xylème dans la coupe entière évolue peu dans les 30 premiers cm et augmente linéairement à partir de 40 cm de l'apex (figure 3.6 a). Les profils d'évolution sont similaires pour les deux génotypes et les deux récoltes, mais elles sont plus élevées à la récolte 2. L'analyse en données répétées (tableau 3.4) montre un effet de la position sur la tige, un effet de la récolte significatif et une interaction génotype x récolte.

L'épaisseur de l'écorce augmente continuellement et linéairement de l'apex vers le bas des tiges surtout à la récolte 1 (figure 3.6 b). A la deuxième récolte, le caractère ne varie pas. Ce caractère évolue de façon similaire pour les deux génotypes. L'épaisseur de l'écorce est plus importante pour le génotype D+ tout au long de la tige à la récolte 1. L'analyse statistique met en évidence un effet génotype, un effet position le long de la tige, un effet récolte mais pas d'interaction génotype x récolte.

### 1.3.2. Evolution des caractères liés aux structures du xylème

La surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème augmente dans les 20 premiers cm à partir de l'apex, puis diminue jusqu'à 70 cm, puis on observe de nouveau une augmentation dans le bas des tiges (figure 3.7 a). La surface des lumières des vaisseaux est plus élevée pour le génotype D-, et leur évolution le long de la tige est semblable pour les deux génotypes et pour les deux récoltes. L'effet de la position le long de la tige est significative ainsi que l'effet du génotype. L'augmentation de la surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème dans les 20 premiers cm en haut des tiges correspond à des vaisseaux en cours de différenciation. La surface moyenne des lumières des fibres du xylème n'évolue pratiquement pas le long de la tige (figure 3.7 b), et présente une évolution en dent de scie dans une gamme très restreinte (de  $2,7 \cdot 10^{-6}$  à  $3,7 \cdot 10^{-6}$  mm<sup>2</sup>). L'analyse en données répétées

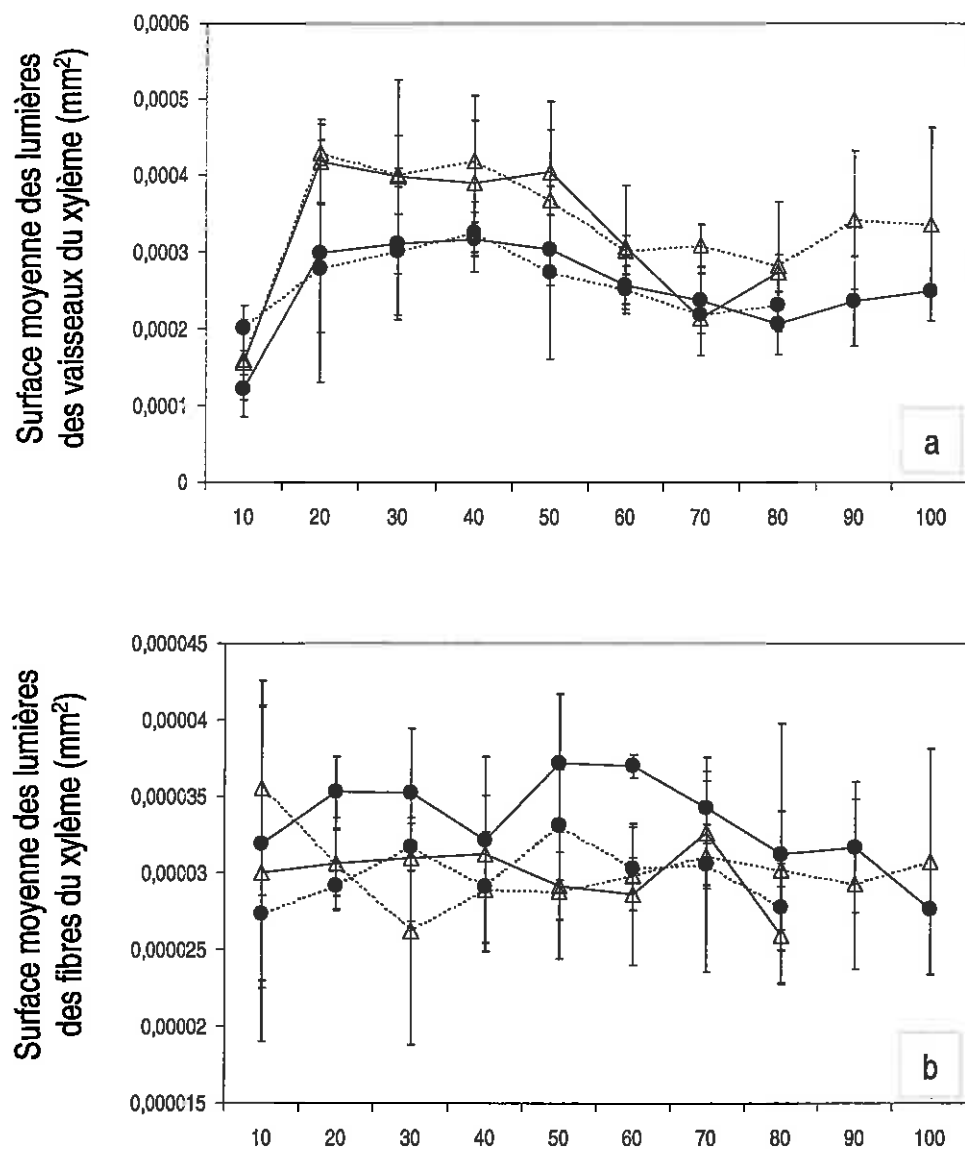


Figure 3.7 : Evolution des caractères histologiques mesurés à un grossissement X 200 sur 3 tiges pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -) : Surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème en mm<sup>2</sup> (a), surface moyenne des lumières des fibres du xylème en mm<sup>2</sup> (b).



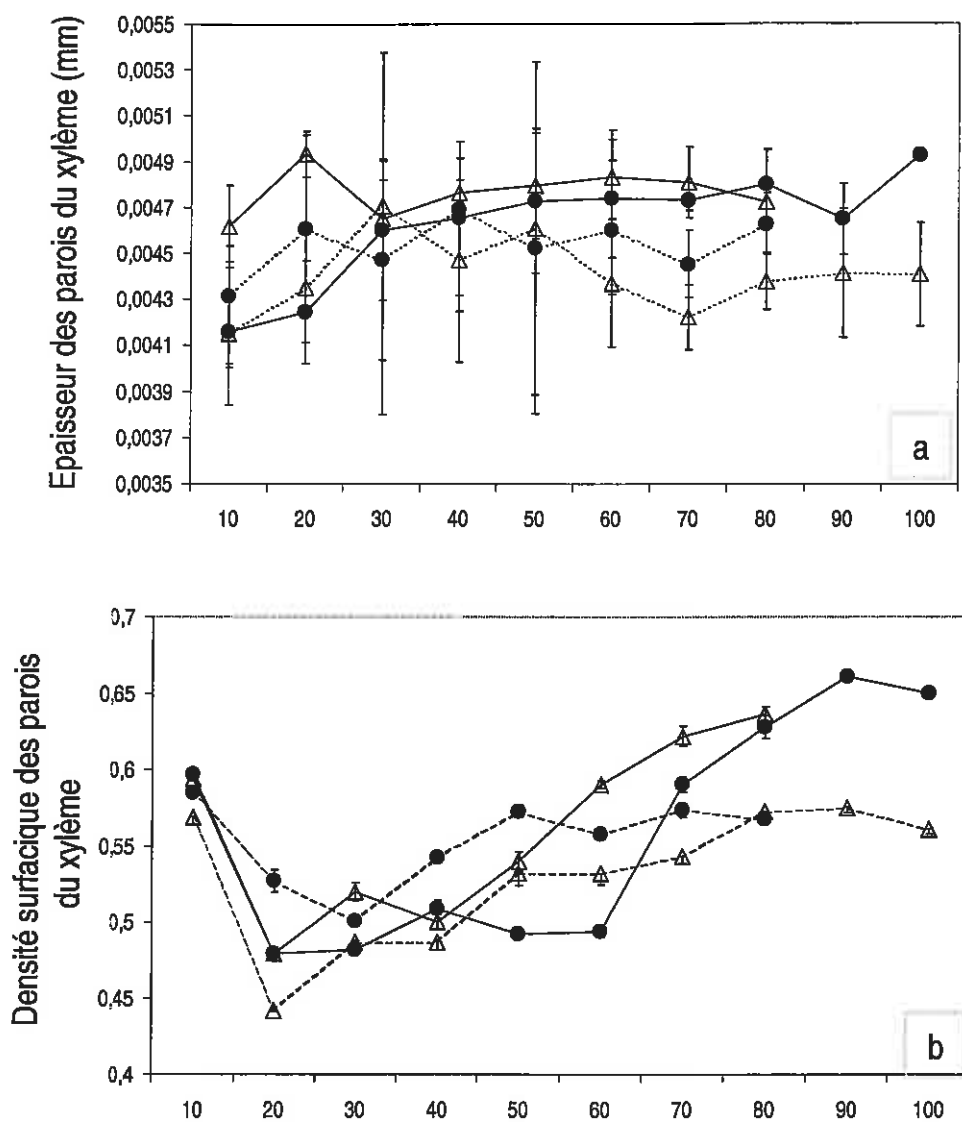


Figure 3.8 : Evolution des caractères histologiques mesurés à un grossissement X 200 sur 3 tiges pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -) : Epaisseur des parois du xylème en mm (a), densité surfacique des parois du xylème (b).

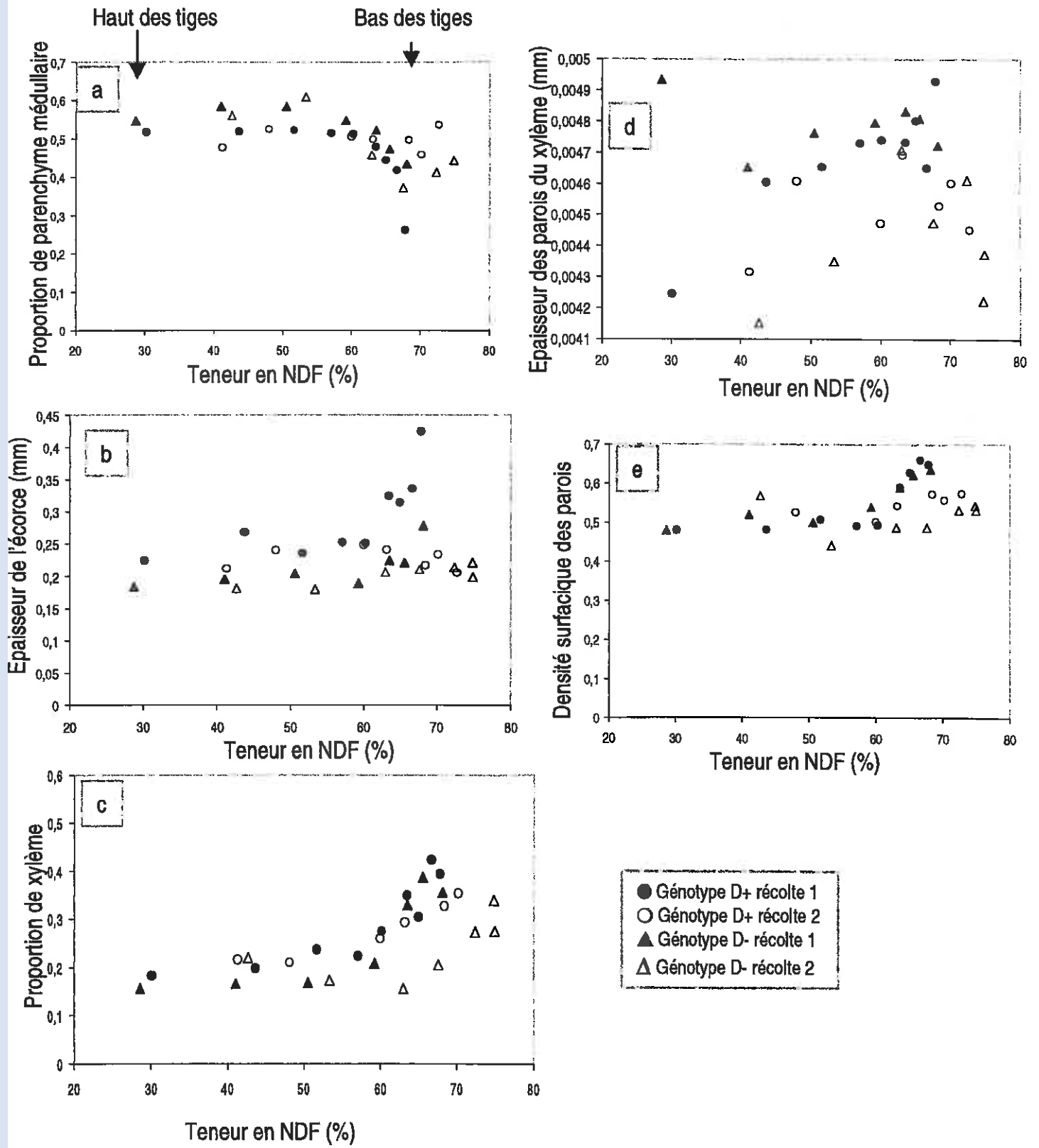


Figure 3.9 : Relations entre les caractères histologiques et la teneur en NDF (%) des tiges mesurés le long des tiges. Relation entre la teneur en NDF (%) des tiges et a : la proportion de parenchyme médullaire, b : l'épaisseur de l'écorce (mm), c : la proportion de xylème, d : l'épaisseur des parois du xylème, e : la densité surfacique des parois du xylème. Chaque point représente un génotype (moyenne des 3 tiges prélevées) et une position sur la tige. La position du haut et du bas des tiges est représentée par des flèches sur le premier graphique, elle est la même sur tous les autres.

montre qu'il n'y a pas d'effet de la position sur la tige, pas de différences entre génotypes, pas d'effet de la récolte ni d'interaction génotype x récolte.

L'épaisseur des parois du xylème augmente dans les 40 premiers cm (figure 3.8 a) puis il y a une stabilisation du caractère en bas des tiges. L'évolution est similaire entre les deux génotypes, et l'épaisseur des parois est plus importante à la récolte 1 qu'à la récolte 2 à partir de 40 cm jusqu'en bas des tiges. A la première récolte, le génotype D+ présente des parois moins épaisses que le génotype D- et curieusement à la récolte 2, elles sont plus épaisses que celles du génotype D-. L'analyse en données répétées (tableau 3.5) indique un effet de la position sur la tige, un effet récolte et une interaction génotype x récolte.

La densité surfacique des parois du xylème diminue dans les 20 premiers cm puis augmente linéairement jusqu'en bas des tiges pour les deux génotypes et les deux récoltes (figure 3.8 b). Pour la récolte 1, le génotype D+ présente des densités surfaciques de parois supérieures, mais pour la récolte 2, le génotype D- présente des densités surfaciques supérieures tout le long de la tige mais les analyses statistiques indiquent que les différences entre génotypes ne sont pas significatives. Par contre on observe une interaction génotype x récolte. La diminution en haut des tiges est vraisemblablement due à une mauvaise estimation des surfaces lignifiées sachant que les faisceaux sont isolés et que la lignification est faible, la précision de l'algorithme utilisé est faible, cependant les écarts-types sont faibles.

L'analyse de variance par plante en déclarant un effet récolte et un effet tige (annexe 3.1) montre des différences entre tiges pour le génotype D+ à 80 cm de l'apex pour la distance entre l'épiderme et le parenchyme médullaire, la proportion de parenchyme médullaire et la proportion de cortex (annexe 3.1). Pour le génotype D-, des différences entre tiges sont observées uniquement à 40 cm de l'apex pour la densité surfacique de parois, à 60 cm pour la proportion d'écorce et à 70 cm pour les proportions de xylème dans la coupe. Peu de différences sont observées entre tiges d'une même plante pour chacun des génotypes.

### 1.3.3. Etude des relations entre caractères histologiques et biochimiques

La figure 3.9 illustre les relations entre les caractères histologiques et la teneur en NDF (%) le long des tiges induites par la position le long de la tige.

Lorsque les teneurs en NDF sont comprises entre 30% et 50%, les proportions de parenchyme médullaire sont stables (figure 3.9 a), et augmentent lorsque les teneurs en NDF passent de 50 à 75% en bas des tiges.

L'épaisseur de l'écorce augmente avec les teneurs en NDF (figure 3.9 b) du haut vers le bas des tiges pour les 2 géotypes et les 2 récoltes, sauf pour le géotype D+ en coupe 2 où la corrélation est faible. On observe une corrélation positive élevée et significative pour le géotype D+ à la récolte 1 et le géotype D- à la récolte 2 et une corrélation de 0,55 mais non significative pour le géotype D- à la récolte 1. Sur l'ensemble des données, la corrélation est positive mais non significative ( $r=0,24$ ).

La proportion de xylème dans les tiges est stable en bas des tiges et pour des teneurs en NDF variant de 30 à 50 % et augmente lorsque les teneurs en NDF sont au-delà de 50 % en bas des tiges (figure 3.9 c). Les relations entre proportion de xylème et teneur en NDF sont les mêmes pour les 2 géotypes et les 2 récoltes. On observe que lorsque la teneur en NDF augmente du haut vers le bas des tiges, la proportion de xylème augmente également pour les deux géotypes et les deux récoltes.

Il n'y a pas de corrélation significative entre l'épaisseur des parois et la teneur en NDF excepté une corrélation positive et significative élevée pour le géotype D+ à la récolte 1, cependant on note tout de même une tendance sur la figure 3.9 d qui montre que l'épaisseur des parois tend à augmenter avec la teneur en NDF pour les 2 géotypes.

La densité surfacique des parois augmente avec les teneurs en NDF en bas des tiges pour les 2 géotypes et les 2 récoltes (figure 3.9 e). On observe des corrélations positives entre les teneurs en NDF et la densité surfacique des parois pour les 2 géotypes et les 2 récoltes. Cependant, seules les corrélations en récolte 1 sont significatives. Sur l'ensemble des données la corrélation est significative ( $r=0,52$ ).

#### 1.4. Discussion

L'analyse morphologique des tiges a permis de mettre en évidence la zone d'élongation des tiges qui est située au niveau des 3 premiers entre-nœuds où on observe une augmentation rapide de la longueur des 3 premiers entre-nœuds due à de la croissance primaire engendrée par le fonctionnement du méristème apical. Le quatrième entre-nœud ayant atteint une longueur maximale de 11 cm pour le géotype D- et de 9 cm pour le géotype D+. La somme de la longueur des trois premiers entre-nœuds en élongation est environ égale à 10 cm. Ces résultats sont en accord avec ceux de Vallet (1997) qui a mis en évidence sur deux variétés (Europe et Luisante) que la longueur maximale de la zone d'élongation est de 10 cm. Elle a également montré que la longueur maximale de cette zone évolue en fonction de la température, elle est légèrement plus courte à basse température. A partir du quatrième entre-nœud, la longueur des entre-nœuds est constante puis diminue à partir de l'entre-nœud 9. L'observation des coupes histologiques montre qu'à ce niveau (entre-nœud 4) le cambium est continu et actif, il met en place des tissus secondaires et les tissus interfasciculaires commencent à se

lignifier. Par ailleurs il est connu que l'activité cambiale débute lorsque l'élongation cellulaire a cessé (Esau, 1965).

En parallèle à cette augmentation rapide de la longueur des entre-nœuds, leur diamètre augmente également rapidement dans les 20 premiers cm de la tige. Cette augmentation de diamètre s'accompagne également d'une augmentation des quantités de matière sèche le long de la tige. La croissance primaire se traduit par un allongement cellulaire et une croissance en diamètre (on parle également de croissance de renforcement). Au-delà des 20 premiers cm le diamètre continue d'augmenter mais plus lentement. Ce changement dans la pente correspond au fonctionnement du cambium qui met en place de nouvelles assises secondaires. Dans la partie haute des tiges, la croissance en diamètre est liée à de la croissance primaire, vers le bas des tiges la croissance en diamètre est plutôt liée à de la croissance secondaire. L'augmentation de diamètre et de matière sèche du haut vers le bas des tiges se traduit également par une augmentation linéaire de la distance entre l'épiderme et le parenchyme (mesure qui exprime la mise en place de nouvelles assises cellulaires) qui est à relier avec une augmentation linéaire des proportions de xylème dans la coupe entière et une augmentation de l'épaisseur de l'écorce. L'augmentation de l'épaisseur de l'écorce prend en compte de nouvelles assises cellulaires mises en place dans le phloème secondaire par le cambium. En parallèle à une augmentation des proportions de xylème vers le bas des tiges, les proportions de parenchyme médullaire diminuent. Rappelons que le diamètre en bas des tiges devient constant, donc si un des tissus augmente en proportion c'est au détriment d'un autre et c'est le cas du parenchyme médullaire qui se trouve comprimé par la mise en place des nouvelles assises cellulaires. L'augmentation des quantités de matière sèche le long de la tige est le résultat de la mise en place de nouvelles assises cellulaires et au fait que ces nouvelles assises cellulaires mettent en place des parois lignifiées, d'où l'augmentation des teneurs en NDF et en lignine du haut vers le bas des tiges. Cette augmentation de la taille du compartiment parois a été mise en évidence par l'augmentation de l'épaisseur des parois du xylème dans les 30 premiers centimètres, en haut des tiges ainsi que par l'augmentation de la densité surfacique des parois lignifiées du xylème. L'augmentation des teneurs en NDF vers le bas des tiges correspond à un dépôt et à un épaississement des parois secondaires dans les parties matures. Les teneurs en lignine évoluent en parallèle avec les teneurs en NDF, ce qui correspond à la lignification progressive des parois secondaires.

Le fait que cette analyse ne porte que sur deux génotypes représentés chacun par une seule plante, ne permet pas d'établir de corrélations par strate de 10 cm de hauteur. Cependant il est possible d'observer des relations sur la base des variations induites par la position le long de la tige entre les caractères biochimiques et histologiques. Les proportions de parenchyme médullaire varient dans la

portion basse des tiges et diminuent avec l'augmentation des teneurs en NDF, alors que les proportions de xylème augmentent et la densité surfacique des parois du xylème augmentent avec les teneurs en NDF vers le bas des tiges. Il n'y a pas de corrélation significative entre l'épaisseur des parois et les teneurs en NDF, ni entre l'épaisseur de l'écorce et les teneurs en NDF des tiges. Sachant que les teneurs en NDF sont corrélées à  $-0,90$  avec la digestibilité mesurée *in vitro* (Julier et al., 2000; Guines et al., 2002), les proportions de xylème et de parenchyme médullaire sont corrélées négativement et positivement avec la digestibilité. Le parenchyme médullaire prélevé au stade début de floraison n'est pas lignifié. C'est un tissu qui est rapidement dégradé par les micro-organismes du rumen (Wilson, 1993) d'où la relation négative avec les teneurs en NDF observée dans le bas des tiges. Le xylème est le tissu principal où a lieu la lignification, il n'est donc pas surprenant de trouver une corrélation positive avec les teneurs en NDF.

Cette expérience apporte des informations sur l'évolution des caractères histologiques le long de la tige, et met en évidence pour pratiquement tous les caractères mesurés des profils d'évolution similaires pour les deux génotypes choisis pour leur valeur de solubilité enzymatique. Pour conclure à une loi générale d'évolution des caractères histologiques le long de la tige, il serait nécessaire d'évaluer plus de génotypes ou plus de répétitions de plantes pour chaque génotype. Il serait possible de mettre en place des modèles d'évolution des caractères histologiques le long des tiges pour étudier l'effet des facteurs physiques sur l'élongation des tiges et leur croissance en diamètre, intégrant les phénomènes de croissance primaire et secondaire.

Les différences observées en bas des tiges pour les teneurs en NDF et en lignine sont une indication supplémentaire par rapport à ce que l'on trouve dans la littérature montrant qu'il est plus facile de différencier des génotypes ou des variétés en analysant la portion basse des tiges de luzerne.

Il aurait été intéressant de compter le nombre de faisceaux cribro-vasculaires constituant les tiges. En effet il a été noté dans la littérature que le nombre de faisceaux était relié au nombre de feuilles émises. Ce qui nous amène à conclure que le nombre de faisceaux cribro-vasculaires est censé augmenter avec le rapport feuilles/tiges. Cependant, c'est un caractère délicat à mesurer, les faisceaux n'étant pas toujours bien distincts les uns des autres. Il serait possible de le mesurer en haut des tiges, avant la mise en place d'un cambium continu, où les faisceaux sont bien individualisés.

Cette première partie a permis de mettre en évidence une évolution des caractères histologiques le long des tiges de luzerne pour tous les caractères mesurés sauf pour la surface moyenne des lumières des fibres du xylème. La hauteur de la tige (et donc la position à laquelle sera réalisée l'analyse histologique) aura une importance et sera prise en compte dans l'analyse des



différences entre cultivars. Il est intéressant de noter que certains caractères évoluent de la même façon le long de la tige que le génotype soit digestible ou non. Les teneurs en NDF et en lignine Klason évoluent également le long des tiges en augmentant vers le bas des tiges. Des différences de teneur en NDF et en lignine Klason entre le génotype D+ et D- ont été observées en bas des tiges, et l'analyse par plante des différences entre tiges a montré qu'il n'y avait pas de différences entre les tiges prélevées. On retrouve également des différences entre génotypes (exprimées en bas des tiges) dans la littérature, ce qui nous a conduit à échantillonner une seule tige pour représenter un individu et une portion de la partie inférieure de la tige pour espérer maximiser la diversité génétique inter et intra et pour diminuer le nombre d'échantillons vue la lourdeur de la technique (coupe + coloration + capture d'images + traitement et analyse des images).

D'après la littérature, on sait qu'il existe une variabilité intra cultivar importante qui est égale voire supérieure à la variabilité inter cultivar pour un certain nombre de caractères (caractères liés à la qualité du fourrage : teneurs en NDF et en lignine, digestibilité; caractères liés à la production de semences). Cette variabilité génétique intra cultivar n'est pas surprenante du fait de l'allogamie et tétraploïde de l'espèce et la structure synthétique des variétés. Dans un contexte d'étude de la diversité génétique des caractères histologiques, il est donc nécessaire d'évaluer également les différences qui existent au sein de cultivars. Les résultats sont présentés dans la partie suivante.

## 2. ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE ENTRE CULTIVARS ET A L'INTERIEUR DES CULTIVARS

### 2.1. Variabilité pour les caractères observés

#### 2.1.1. Caractères morphologiques

Le tableau 3.7 illustre la moyenne des caractères morphologiques mesurés sur chaque cultivar pour chaque coupe dans le dispositif analysant la variabilité génétique inter cultivars et intra cultivar. Dans les deux essais, les tiges sont plus courtes, elles ont moins d'entre-nœuds et le diamètre de la portion basse est également inférieur à la deuxième récolte qu'à la première. La gamme de variation observée entre les 6 cultivars pour la hauteur des tiges est inférieure à celle observée dans l'essai intra cultivar où elle est 3 fois plus importante à la récolte 1, et 2 à 3,5 fois plus importante à la récolte 2.

Le tableau 3.8 illustre les résultats de l'analyse de variance testant l'effet cultivar, bloc, récolte et les interactions sur les caractères morphologiques dans l'essai inter cultivars, et l'effet génotype et récolte et leur interaction dans l'essai intra cultivar. L'analyse de variance montre des différences

Tableau 3.7 : Gamme de variation des 6 cultivars (moyenne des 9 tiges des 3 blocs) dans l'essai inter cultivars et des géotypes dans l'essai intra cultivar pour chaque récolte, et moyenne des 6 cultivars et des 10 géotypes par cultivar, pour chaque récolte pour les caractères morphologiques des tiges

Dispositif expérimental	Hauteur des tiges	Nombre d'entre-noeuds	Diamètre des tiges
<b>Essai inter cultivars</b>			
<b>Récolte 1</b>			
Luisante	90,53	20,20	4,31
Daisy	94,60	16,66	4,42
Orca	87,53	16,70	4,69
Poitou	98,36	17,33	4,03
Luzelle	89,53	15,60	4,27
Kyserie	94,07	16,20	4,46
<b>Moyenne</b>	<b>92,43</b>	<b>17,11</b>	<b>4,37</b>
<b>Récolte 2</b>			
Luisante	75,23	10,46	3,72
Daisy	74,16	10,60	3,72
Orca	80,43	11,13	4,62
Poitou	79,83	11,03	3,84
Luzelle	68,57	10,30	3,70
Kyserie	88,53	10,63	4,04
<b>Moyenne</b>	<b>77,79</b>	<b>10,69</b>	<b>3,94</b>
<b>Essai intra cultivar</b>			
<b>Luisante</b>			
Récolte 1	72,26 (58,2-94,6)	13,74 (11,4-16,8)	4,42 (3,14-5,25)
Récolte 2	64,58 (46,6-75,2)	11,06 (9,2-14,8)	3,68 (3,82-5,72)
<b>Luzelle</b>			
Récolte 1	78,84 (61,2-91,8)	11,06 (9,2-13,2)	4,73 (3,26-4,08)
Récolte 2	73,18 (43,6-94,6)	10,62 (8,4-13,6)	3,95 (3,26-4,62)

Tableau 3.8 : Carrés moyens de l'analyse de variance dans les essais inter et intra cultivar pour les caractères morphologiques des tiges

Source de variation	d.d.l.	Hauteur des tiges	Nombre d'entre-nœuds	Diamètre des tiges
<b>Essai inter cultivars</b>				
Bloc	2	2320,2**	90,80	0,75
Cultivar	5	1172,6*	40,10	3,94
Bloc x cultivar	10	291,6***	46,29	1,41***
Récolte	1	19301,4***	3712,04***	14,41***
Récolte x cultivar	5	686,9***	41,48	0,83**
Erreur résiduelle	12	48,44	53,18	0,24
<b>Essai intra cultivar</b>				
<b><i>Luisante</i></b>				
Génotype	9	416,6***	13,91***	0,70**
Récolte	1	1474,6***	179,56***	13,69***
Génotype x récolte	9	757,3***	12,98***	1,37***
Erreur résiduelle	80	9,91	1,53	0,23
<b><i>Luzelle</i></b>				
Génotype	9	1275,1***	26,89***	1,68***
Récolte	1	800,9***	62,41***	15,01***
Génotype x récolte	9	415,5***	2,98**	0,94***
Erreur résiduelle	80	7,10	0,86	0,19

\*\*\*, \*\*, \* significatif à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$

Tableau 3.9 : Gamme de variation des 6 cultivars (moyenne des 9 tiges des 3 blocs) dans l'essai inter cultivars et des génotypes dans l'essai intra cultivar par récolte, et moyenne des 6 cultivars et des 10 génotypes par cultivar, par récolte pour les caractères histologiques liés aux proportions des différents tissus (mesurés au grossissement X 30)

Dispositif expérimental	Rayon de la coupe histologique (mm)	Proportion d'écorce (%)	Proportion de xylème (%)	Proportion de parenchyme médullaire (%)
<b>Essai Inter cultivars</b>				
<b>Récolte 1</b>				
Luisante	2,19	13,12	23,54	63,89
Daisy	2,26	11,80	21,32	67,23
Orca	2,39	13,92	23,55	63,08
Poitou	2,03	13,51	23,12	63,53
Luzelle	2,12	13,21	23,06	64,52
Kayserie	2,25	11,45	23,93	65,42
<b>Moyenne</b>	<b>2,21</b>	<b>12,83</b>	<b>23,09</b>	<b>64,61</b>
<b>Récolte 2</b>				
Luisante	1,87	11,65	19,36	69,10
Daisy	1,88	10,63	19,57	70,39
Orca	2,32	10,53	19,78	70,06
Poitou	1,95	10,50	22,33	68,12
Luzelle	1,87	11,31	19,71	69,36
Kayserie	2,06	10,60	21,36	68,43
<b>Moyenne</b>	<b>1,99</b>	<b>10,87</b>	<b>20,35</b>	<b>69,24</b>
<b>Essai intra cultivar</b>				
<b>Luisante</b>				
Récolte 1	2,30 (1,64-2,78)	14,34 (11,37-16,16)	16,30 (10,57-22,57)	66,99 (66,51-72,58)
Récolte 2	1,84 (1,66-2,02)	13,06 (11,56-14,87)	18,83 (12,29-26,77)	68,46 (58,05-74,96)
<b>Luzelle</b>				
Récolte 1	2,31 (2,03-2,64)	12,39 (9,06-15,12)	18,43 (10,71-22,13)	68,26 (60,90-72,03)
Récolte 2	1,99 (1,60-2,48)	11,92 (9,78-13,65)	17,48 (10,43-22,66)	71,69 (66,01-78,46)

significatives entre cultivars uniquement pour la hauteur des tiges, et des différences significatives entre génotypes à l'intérieur de chaque cultivar pour la hauteur, le nombre d'entre-nœuds et le diamètre des tiges. Pour les deux essais l'effet récolte est significatif pour tous les caractères morphologiques et on observe une interaction cultivar x récolte et génotype x récolte également pour tous les caractères.

### 2.1.2. Caractères histologiques

#### 2.1.2.1. Caractères relatifs aux proportions des différents tissus de la tige

Les moyennes des proportions des différents tissus constituant la tige sont présentées dans le tableau 3.9 et les résultats de l'analyse de variance dans le tableau 3.10.

Le rayon de la coupe (bien qu'il soit corrélé au diamètre des tiges avec un  $r=0,93$ ) ayant servi à calculer les proportions des différents tissus de la coupe, est présenté également dans cette partie. Le diamètre et le rayon représentent la même mesure, le rayon de la coupe mesurée par analyse d'images a été retenu, car il est jugé plus précis que la mesure réalisée au pied à coulisse électronique. Les gammes de variation sont 1,7 à 3 fois plus importantes dans l'essai intra cultivar à la récolte 1 que dans l'essai inter cultivars. Pour la récolte 2, les gammes de variation sont plus importantes entre les génotypes du cultivar Luzelle qu'entre les 6 cultivars. Il n'y a pas de différences significatives entre cultivars mais il y en a entre génotypes à l'intérieur de chacun des 2 cultivars. L'effet récolte est significatif dans les deux dispositifs et on observe des interactions récolte x cultivar et récolte x génotype significatives.

Les gammes de variation des proportions d'écorce sont deux fois moins importantes entre les 6 cultivars qu'à l'intérieur des cultivars, et sont inférieures à la récolte 2 à la fois entre cultivars et à l'intérieur des cultivars. Les proportions d'écorce représentent en moyenne 12,8% de la tige à la récolte 1 et 10,9% à la récolte 2 dans l'essai inter cultivars. Le cultivar Luisante présente des proportions d'écorce supérieures à celle de Luzelle dans les deux récoltes. L'analyse de variance (tableau 3.10) montre qu'il n'y a pas de différences entre les 6 cultivars mais que des différences importantes existent entre génotypes à l'intérieur de chaque cultivar. On note également un effet significatif de la récolte et des interactions cultivar x récolte et génotype x récolte significatives. La hauteur a un effet significatif sur les proportions d'écorce à l'intérieur du cultivar Luisante uniquement. Lorsque la hauteur est mise en covariable, les différences entre génotypes à l'intérieur de ce cultivar restent significatives. La hauteur n'est donc pas à elle seule responsable des variations de ce caractère chez Luisante.

Les gammes de variation pour la proportion de xylème sont environ 6 fois moins importantes entre les 6 cultivars qu'à l'intérieur des cultivars dans les deux récoltes. La proportion de xylème dans la

Tableau 3.10 : Carrés moyens de l'analyse de variance et de l'analyse de covariance avec la hauteur en covariable pour les caractères histologiques liés aux proportions des différents tissus dans la coupe (mesurés au grossissement X 30) dans les essais inter et intra cultivar.

(- analyse de variance sans la covariable)

Source de variation	d.d.l.	Rayon de la coupe histologique		Proportion d'écorce		Proportion de xylème		Proportion de parenchyme médullaire	
<b>Essai inter cultivars</b>									
Hauteur	-	-	3.71***	-	230.85	-	222.82***	-	838.17***
Bloc	2	0.11	0.45	7.30	54.27**	51.02*	48.53*	16.83	113.22
Cultivar	5	1.05	1.12*	18.14	13.27	40.47	72.49	56.08	116.63*
Bloc x cultivar	10	0.35	0.20***	8.98	4.81	27.32	22.57	46.40	29.73
Récolte	1	3.78***	0.004	312.63***	537.78***	606.31***	770.43***	1734.12***	2463.82***
Récolte x cultivar	5	0.20**	0.21***	13.93**	21.66***	22.05	20.52	28.31	47.03*
Erreur résiduelle	303	0.06	0.046	3.96	3.198	16.27	15.58	4.39	16.52
<b>Essai intra cultivar</b>									
<b>Luisante</b>									
Hauteur	-	-	0.257**	-	19.53**	-	60.17	-	26.14
Génotype	9	0.25***	0.140***	13***	5.92*	140***	157.56***	214**	196.70**
Récolte	1	5.19***	0.893***	39***	51.76***	150*	4.17	26	51.74
Récolte x génotype	9	0.45***	0.195***	6**	5.36*	60	67.02**	47	49.93
Erreur résiduelle	80	0.04	0.034	2	2.31	20	23.33	71	72.28
<b>Luzelle</b>									
Hauteur	-	-	0.013	-	6.27	-	71.73	-	7.09
Génotype	9	0.40***	0.364***	11***	8.21***	46	52.91	60*	67.23*
Récolte	1	2.48***	0.807***	4	10.65*	12	20.97	290**	75.93
Récolte x génotype	9	0.15*	0.0619	5**	4.42*	83*	79.56	80**	85.35**
Erreur résiduelle	80	0.06	0.061	2	1.92	32	31.79	30	28.49



tige est en moyenne de 20,4 % (récolte 2) et de 23,1 % (récolte 1) dans l'essai inter cultivars et de 16,3 % (récolte 1) à 18,8 % (récolte 2) dans l'essai intra cultivar. Il n'y a pas de différences significatives entre les 6 cultivars, et seulement des différences entre génotypes pour le cultivar Luisante. L'analyse de variance met également en évidence des effets significatifs de la récolte entre cultivars et à l'intérieur des cultivars sauf pour Luzelle, cependant il n'y a pas d'interaction cultivar x récolte ou génotype x récolte. La hauteur n'a pas d'effet significatif sur la proportion de xylème des tiges à l'intérieur des cultivars, et a un effet significatif entre cultivars mais les différences entre cultivars restent non significatives.

Le parenchyme médullaire occupe en moyenne 64,61 % (récolte 1) et 69,24% (récolte 2) de la tige dans l'essai inter cultivars, et 67 et 68,3 % (récolte 1, Luisante et Luzelle respectivement), 68,5 % et 71,7 % (récolte 2, Luisante et Luzelle respectivement) dans l'essai intra cultivar. Les gammes de variation sont 7 fois moins importantes entre les cultivars qu'à l'intérieur du cultivar Luisante et jusqu'à 13 fois moins importantes que dans le cultivar Luzelle à la récolte 2. Les différences entre cultivars ne sont pas significatives et celles entre génotypes à l'intérieur des deux cultivars sont significatives. Dans les deux essais, l'effet récolte est significatif sauf à l'intérieur du cultivar Luisante, et il n'y a des interactions cultivar x récolte ou génotype x récolte significatives que pour le cultivar Luzelle. Lorsque la hauteur est en covariable dans l'analyse de variance, elle a un effet significatif sur le caractère dans le dispositif inter cultivars mais elle n'a pas d'effet dans le dispositif intra cultivar.

La figure 3.10 illustre les proportions des différents tissus au sein de la tige pour les deux dispositifs (dans le dispositif inter cultivars en couvert dense et dans le dispositif intra cultivar en plantes isolées). On observe une tendance générale dans la répartition des différents tissus qui est similaire dans les deux dispositifs.

#### 2.1.2.2. Caractères relatifs au xylème (tableaux 3.11 et 3.12)

L'épaisseur des parois du xylème varie dans une gamme très restreinte du fait de la biologie du caractère. L'épaisseur des parois varie dans une gamme de variation plus étroite dans l'essai inter cultivars que dans l'essai intra cultivar. En effet, les gammes de variation sont de 4 à 5 fois plus importantes à l'intérieur des cultivars Luisante et Luzelle à la récolte 1 qu'entre cultivars. Pour la deuxième récolte, les gammes de variation sont deux à trois fois moins importantes entre cultivars que dans l'essai intra cultivar. L'analyse de variance met en évidence des différences dans l'essai intra cultivar, mais pas entre les 6 cultivars, et également un effet récolte significatif et des interactions génotype x récolte. La hauteur des tiges n'a pas d'effet significatif sur l'épaisseur des parois du xylème. L'épaisseur des parois est en moyenne de 4,7  $\mu$ m pour les deux récoltes dans l'essai inter cultivars, et

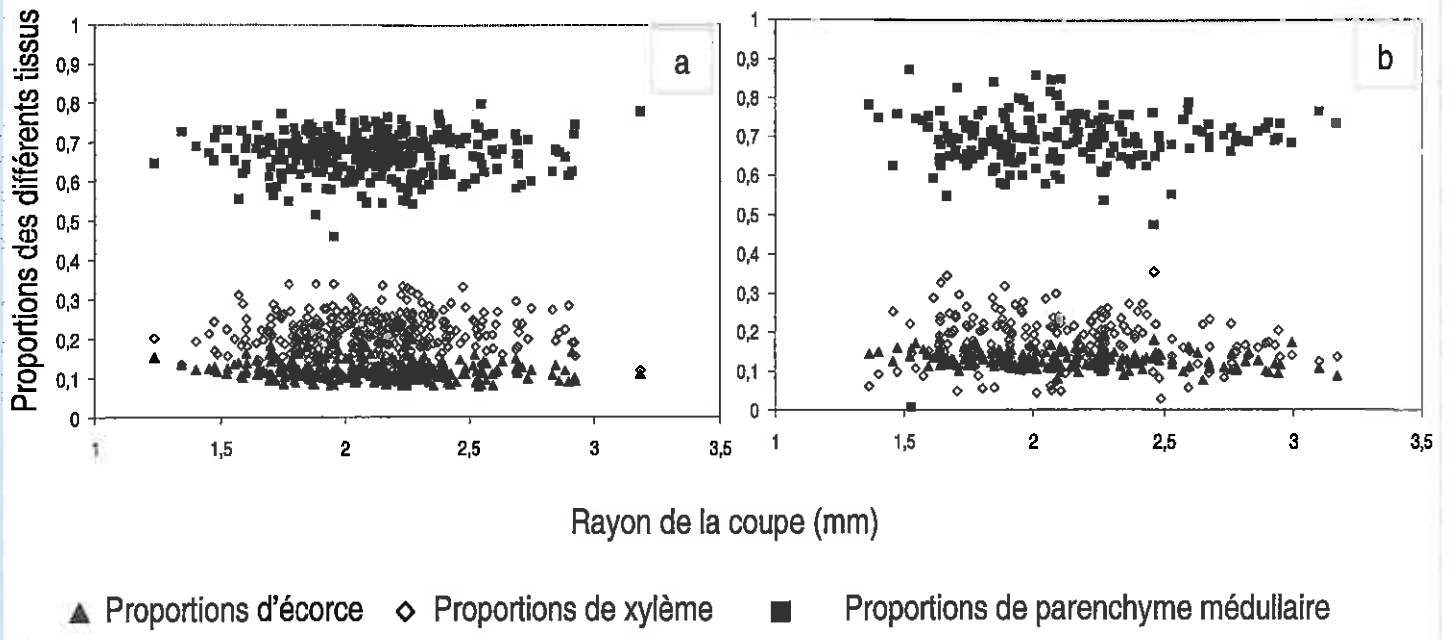


Figure 3.10 : Proportions des différents tissus composant les tiges de luzerne, dans le dispositif entre cultivars en couvert dense (a) et le dispositif intra-cultivar en plantes isolées (b).

de 4,6 et 4,9  $\mu\text{m}$  (récolte 1, cultivar Luisante et Luzelle respectivement) et de 4,3  $\mu\text{m}$  (récolte 2 pour les 2 cultivars) dans le dispositif intra cultivar.

La densité surfacique des parois est un caractère qui est en moyenne de 0,58 à la récolte 1 et de 0,56 à la récolte 2 dans l'essai inter cultivars. Les valeurs sont assez similaires dans l'essai intra cultivar, mais contrairement à l'essai inter cultivars elles sont supérieures à la deuxième récolte. A la première récolte, les gammes de variation sont similaires dans les deux essais, par contre à la deuxième récolte les gammes sont plus étendues dans l'essai inter cultivars (de l'ordre de 3 fois plus). Les différences entre cultivars ne sont pas significatives, mais les différences entre génotypes à l'intérieur des cultivars le sont. Dans les deux essais, l'effet récolte est significatif, et on note une interaction cultivar x récolte significative. La hauteur n'a pas d'effet significatif sur la densité surfacique des parois du xylème à l'intérieur des cultivars, mais son effet est significatif entre cultivars.

La surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème présente des gammes de variation plus importantes à l'intérieur des cultivars que dans l'essai inter cultivars pour les deux récoltes. La surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème est de  $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2$  à la récolte 1 et de  $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2$  à la récolte 2 dans l'essai inter cultivars; de 1,9 et  $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2$  (récolte 1 et 2 pour le cultivar Luisante); de 2 et  $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2$  (récolte 1 et 2 cultivar Luzelle) dans l'essai intra cultivar. Les différences observées entre cultivars et entre génotypes à l'intérieur des cultivars dans les deux dispositifs sont significatives. On note un effet significatif de la récolte et une interaction génotype x récolte uniquement à l'intérieur du cultivar Luzelle.

La surface moyenne des lumières des fibres du xylème est de  $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2$  à la récolte 1 et de  $2,9 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2$  à la récolte 2 dans l'essai inter cultivars, de 3,1 (pour les 2 récoltes du cultivar Luisante) et 2,8 et  $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2$  (récoltes 1 et 2 respectivement pour le cultivar Luzelle) dans le dispositif intra cultivar. Les gammes de variation sont plus importantes dans l'essai intra cultivar que dans l'essai inter cultivars pour les 2 récoltes. Les différences entre cultivars et entre génotypes à l'intérieur des cultivars sont significatives, l'effet récolte est significatif entre cultivars et à l'intérieur du cultivar Luzelle. Il n'y a pas d'interaction génotype x récolte. La hauteur n'a pas d'effet significatif à l'intérieur des cultivars, elle en a entre cultivars mais les différences pour la surface moyenne des lumières des fibres du xylème entre cultivars restent significatives.

Pour l'ensemble des caractères, on peut remarquer que l'erreur résiduelle (qui comprend l'erreur liée à l'échantillonnage et également la variation intra cultivar) entre cultivars est presque systématiquement supérieure à l'erreur résiduelle à l'intérieur des cultivars.

Tableau 3.11 : Gamme de variation des 6 cultivars (moyenne des 9 tiges des 3 blocs) dans l'essai inter cultivars et des génotypes dans l'essai intra cultivar par récolte, et moyenne des 6 cultivars et des 10 génotypes par cultivar, par récolte pour les caractères histologiques mesurés au niveau du xylème (mesurés au grossissement X 200)

Dispositif expérimental	Epaisseur des parois (10 <sup>-3</sup> mm)	Densité surfacique de parois	Surface moyenne des lumières des vaisseaux (10 <sup>-4</sup> mm <sup>2</sup> )	Surface moyenne des lumières des fibres (10 <sup>-5</sup> mm <sup>2</sup> )
<b>Essai inter cultivars</b>				
<b>Récolte 1</b>				
Luisante	4,59	0,57	2,29	3,31
Daisy	4,70	0,57	2,12	3,13
Orca	4,63	0,60	2,18	2,91
Poitou	4,72	0,56	2,48	3,17
Luzelle	4,66	0,59	2,55	2,91
Kyserie	4,68	0,61	2,84	2,96
<b>Moyenne</b>	<b>4,68</b>	<b>0,58</b>	<b>2,41</b>	<b>3,06</b>
<b>Récolte 2</b>				
Luisante	4,70	0,56	3,18	3,00
Daisy	4,70	0,56	2,73	2,88
Orca	4,68	0,55	2,84	3,01
Poitou	4,88	0,57	2,84	2,88
Luzelle	4,78	0,57	3,13	2,95
Kyserie	4,71	0,54	3,42	2,92
<b>Moyenne</b>	<b>4,74</b>	<b>0,56</b>	<b>3,02</b>	<b>2,94</b>
<b>Essai intra cultivar</b>				
<b>Luisante</b>				
Récolte 1	4,57 (4,30-4,85)	0,580 (0,54-0,61)	1,93 (1,67-2,61)	3,07 (2,86-3,37)
Récolte 2	4,33 (4,16-4,52)	0,564 (0,49-0,60)	2,25 (1,83-2,71)	3,08 (2,75-3,28)
<b>Luzelle</b>				
Récolte 1	4,90 (4,63-5,05)	0,614 (0,59-0,64)	2,02 (1,10-2,49)	2,77 (1,79-3,25)
Récolte 2	4,33 (4,04-4,59)	0,530 (0,47-0,57)	2,42 (1,92-2,77)	3,14 (2,88-3,40)

Tableau 3.12 : Carrés moyens de l'analyse de variance et de covariance avec la hauteur en covariable pour les caractères mesurés au niveau du xylème à un grossissement X 200 dans les essais inter et intra cultivar.

Source de variation	d.d.l.	Epaisseur de parois (10 <sup>-6</sup> )	Densité surfacique des parois	Surface moyenne des lumières des vaisseaux (10 <sup>-7</sup> )	Surface moyenne des lumières des fibres (10 <sup>-10</sup> )				
<b>Essai inter cultivars</b>									
Hauteur	-	0.0001	-	0.0628***	-	0.45**	-	1.21**	
Bloc	2	0.25	0.225	0.0005	0.0103	0.30	0.13	0.49*	0.60**
Variété	5	0.23	0.228	0.0032	0.0055	0.33*	0.30*	0.39**	0.46**
Bloc x variété	10	0.10	0.103	0.0038	0.0031	0.08	0.07	0.06	0.07
Récolte	1	0.28*	0.127	0.0421***	0.1043***	2.99***	2.8	1.21**	0.002
Récolte x variété	5	0.06	0.059	0.0106***	0.0043*	0.04	0.04	0.44**	0.35
Erreur résiduelle	303	0.06	0.058	0.0021	0.0019	0.05	0.05	0.13	0.13
<b>Essai intra cultivar</b>									
<b>Luisante</b>									
Hauteur	-	0.01	-	0.0019	-	0.022	-	0.07	
Génotype	9	0.10***	0.08***	0.0049***	0.0046***	0.107***	0.101***	0.1844**	0.18**
Récolte	1	1.34***	0.60***	0.0068*	0.0071*	0.256***	0.175***	0.0012	0.05
Récolte x génotype	9	0.12***	0.10***	0.0034**	0.0035**	0.017	0.019	0.0812	0.07
Erreur résiduelle	80	0.02	0.02	0.0012	0.0012	0.014	0.013	0.0623	0.06
<b>Luzelle</b>									
Hauteur	-	0.05	-	0.0002	-	0.076	-	0.54	
Génotype	9	0.13***	0.10**	0.0059***	0.0058***	0.151**	0.157**	0.621	0.66*
Récolte	1	7.62***	3.65***	0.1656***	0.0725***	0.401**	0.384**	3.386**	30.7**
Récolte x génotype	9	0.17***	0.17***	0.0015	0.0010	0.094*	0.102*	0.578	0.63*
Erreur résiduelle	80	0.03	0.03	0.0015	0.0015	0.045	0.044	0.318	0.31

Tableau 3.13 : Analyse des corrélations phénotypiques entre les caractères histologiques mesurés au sein des deux cultivars : Luisante et Luzelle sur la moyenne des répétitions des 10 géotypes par cultivar (les corrélations en caractères gras sont significatives à  $p < 0.05$ , d.d.l.= 38)

	Rayon de la coupe	PECORCE	PXYL	PPAR	LVX	LFX	DPAR	EPPAR
Hauteur	<b>0.61</b>	<b>-0.51</b>	-0.006	0.10	-0.033	-0.28	0.15	<b>0.32</b>
Rayon de la coupe		<b>-0.24</b>	<b>-0.20</b>	<b>0.10</b>	<b>-0.32</b>	<b>-0.14</b>	<b>0.34</b>	<b>0.54</b>
PECORCE			<b>0.03</b>	<b>-0.49</b>	<b>-0.39</b>	<b>0.07</b>	<b>0.28</b>	<b>0.01</b>
PXYL				<b>-0.64</b>	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>	<b>0.11</b>
PPAR					<b>0.29</b>	<b>0.22</b>	<b>-0.34</b>	<b>-0.21</b>
LVX						<b>0.18</b>	<b>-0.45</b>	<b>-0.25</b>
LFX							<b>-0.47</b>	<b>-0.48</b>
DPAR								<b>0.74</b>

PECORCE : proportions d'écorce, PXYL: proportions de xylème, PPAR : proportions de parenchyme médullaire, LVX : surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème, LFX : surface moyenne des lumières des fibres du xylème, DPAR: densité surfacique des parois du xylème, EPPAR : épaisseur des parois du xylème.



## 2.2. Corrélations entre les caractères histologiques et morphologiques (tableau 3.13)

La partie précédente a montré que la variabilité entre cultivars était faible et inférieure à la variabilité à l'intérieur des cultivars entre génotypes. Les corrélations entre caractères histologiques et morphologiques ont donc été calculées uniquement sur le dispositif à l'intérieur des cultivars.

La hauteur des tiges est corrélée positivement et significativement au rayon de la coupe et à l'épaisseur des parois du xylème, et négativement aux proportions d'écorce. Le rayon de la coupe quant à lui est également corrélé négativement à la surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème et positivement à la densité surfacique et à l'épaisseur des parois du xylème. Cependant le rayon de la coupe n'est corrélé à aucune proportion des différents tissus constituant la tige.

La proportion d'écorce est corrélée négativement à la proportion de parenchyme médullaire et à la surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème, mais pas à la proportion de xylème. Cependant la proportion de xylème est corrélée négativement à la proportion de parenchyme médullaire, ce qui est logique puisque l'addition des différents tissus est égale à 100%. La proportion de parenchyme médullaire est corrélée négativement à la densité surfacique des parois du xylème.

La surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème est corrélée négativement à la densité surfacique des parois, et la surface moyenne des lumières des fibres du xylème est corrélée négativement à la fois à la densité surfacique et à l'épaisseur des parois du xylème. De façon logique, ces deux derniers caractères sont fortement corrélés positivement, car ils sont calculés tous les deux à partir de la surface lignifiée de la zone considérée dans le xylème.

## 2.3. Discussion

La similitude dans les proportions des différents tissus dans les tiges dans le dispositif en plantes isolées (dispositif intra cultivar) et en couvert dense (inter variétés) montre qu'il existe une loi générale de répartition des tissus au sein de la tige, même si des variations sont observées entre génotypes à l'intérieur des cultivars. Ceci montre qu'une plante isolée a le même processus de répartition des tissus des tiges qu'une plante dans un couvert dense. Une autre interprétation consiste à considérer qu'une tige prélevée dans une plante isolée n'est pas elle-même isolée, puisqu'elle est entourée par de nombreuses autres tiges.

La proportion de parenchyme médullaire est corrélée négativement à la proportion de xylème et d'écorce, mais la proportion de xylème n'est pas corrélée à la proportion d'écorce. Dans les tiges des légumineuses, la lignification a lieu majoritairement dans le xylème qui devient totalement indigestible (Wilson et Hatfield, 1997). Une voie pour augmenter la digestibilité des tiges consisterait à réduire la

proportion de xylème. La réduction de la proportion de xylème entraînerait une augmentation de la proportion de parenchyme médullaire, tissu non lignifié et rapidement dégradé par les micro-organismes du rumen.

Des différences à l'intérieur des cultivars ont été mises en évidence pour tous les caractères histologiques excepté pour la proportion de xylème dans la coupe à l'intérieur du cultivar Luzelle. Des différences entre les 6 cultivars ont été mises en évidence uniquement pour la surface moyenne des lumières des vaisseaux et des fibres du xylème. Les 9 tiges prélevées dans le dispositif inter cultivars proviennent chacune de plantes différentes. La variance d'erreur observée dans ce dispositif incluant l'erreur due aux différences intra-cultivar est plus élevée pour la plupart de caractères mesurés que la variance d'erreur dans le dispositif intra-cultivar. On peut se demander si les différences intra-cultivars sont tellement importantes qu'il n'est pas possible de distinguer des différences entre cultivars. Plusieurs études ont montré que la variabilité intra-cultivar était aussi importante que la variabilité entre cultivars pour des caractères associés à la valeur alimentaire, et était plus élevée pour le rendement en matière sèche du fourrage et des caractères morphologiques (Julier et al., 2000), pour le rendement en graines et ses caractères associés (Bolaños-Aguilar et al., 2001). Des différences génétiques pour des caractères histologiques ont été mises en évidence pour le nombre de faisceaux vasculaires, le rapport entre le parenchyme médullaire et le diamètre des tiges, et la proportion de tissus lignifiés parmi 12 populations de luzerne (Jewett et Barnes, 1994) mais également parmi 221 populations (désigné comme la "core collection"). Jewett & Barnes (1992) ont également montré que le rapport entre le parenchyme médullaire et le diamètre des tiges était le caractère le moins variable.

Des différences pour la hauteur des tiges ont été mises en évidence dans les deux dispositifs. Il est donc paru nécessaire de mettre la hauteur en covariable dans les analyses de variance de façon à déterminer si les différences observées entre cultivars et à l'intérieur des cultivars n'étaient pas du uniquement à ces différences de hauteur des tiges. Les analyses de covariance ont montré que lorsque la hauteur avait un effet significatif sur certaines caractères, les différences entre génotypes à l'intérieur de chaque cultivar ou les différences entre cultivars restaient significatives. La hauteur n'est donc pas à elle seule responsable des différences observées. Les différences observées à l'intérieur des cultivars indiquent que cette source de variation pourrait être utilisée dans des programmes de sélection pour améliorer la qualité des tiges de luzerne et donc du fourrage.

La densité surfacique et l'épaisseur des parois ne sont pas corrélées aux proportions de xylème. Dans les zones matures des tiges, des parois secondaires épaisses sont déposées et confèrent la rigidité aux tiges en leur donnant la capacité de résister à des tensions extérieures et à des forces de compression (Wilson, 1993). La lignification fournit un support mécanique à la plante en

augmentant la solidité et la rigidité des tiges (Boudet, 2000). La modification de la structure du xylème en augmentant l'épaisseur des parois ne devrait pas affecter la dégradabilité des tiges. Les relations entre les caractères histologiques des tiges de luzerne, la dégradabilité et la rigidité des tiges devront être étudiées pour pouvoir conclure sur le degré d'implication des différents tissus dans la qualité du fourrage et la résistance à la verse.

Il aurait été intéressant d'évaluer ces caractères histologiques sur une gamme de variation plus ample et sur un nombre plus important de cultivars. Il aurait été également intéressant d'étudier le déterminisme génétique de ces caractères dans des plans de croisement adaptés permettant de calculer, l'héritabilité des caractères histologiques au sens strict et d'évaluer si l'hérédité est de type additive ou dominante pour compléter la recherche de marqueurs associés aux caractères histologiques dans la descendance  $F_1$  issue du croisement contrôlé entre un parent du cultivar Mercedes et Magali. Cependant, l'étude des caractères histologiques de tiges dans un plan de croisement adapté (type diallèle ou factoriel) est difficilement envisageable à cause du nombre d'échantillons à traiter, ce qui devient très rapidement difficile à gérer.

La présence de variabilité dans le dispositif intra cultivar indique qu'il est possible d'envisager de rechercher des marqueurs dans une descendance  $F_1$  provenant du croisement contrôlé de deux parents choisis pour leur différence de sensibilité à la verse, et de solubilité enzymatique. Les caractères histologiques seront évalués de la même façon que dans l'étude de la diversité génétique, au milieu du tiers inférieur des tiges.

### 3. RECHERCHE DE MARQUEURS ASSOCIES ("QTLs") AUX CARACTERES MESURES

#### 3.1. Variabilité génétique dans la population de cartographie

##### 3.1.1. Description des valeurs phénotypiques

###### *Caractères liés à la morphologie des tiges*

Mercedes possède en moyenne des tiges plus hautes, avec des bas de tige de plus faible diamètre et un rapport feuilles/tiges plus élevé que Magali (tableau 3.14). Il n'y a pas de différences entre les parents pour le rapport feuilles/tiges (FT). L'analyse de variance met en évidence un effet génotype au sein de la population  $F_1$  hautement significatif pour la hauteur, et le diamètre (tableau 3.15). Pour le rapport feuilles/tiges, les résidus de l'analyse de variance ne sont pas distribués normalement, c'est donc le résultat du test non paramétrique qui est pris en compte. Il donne une

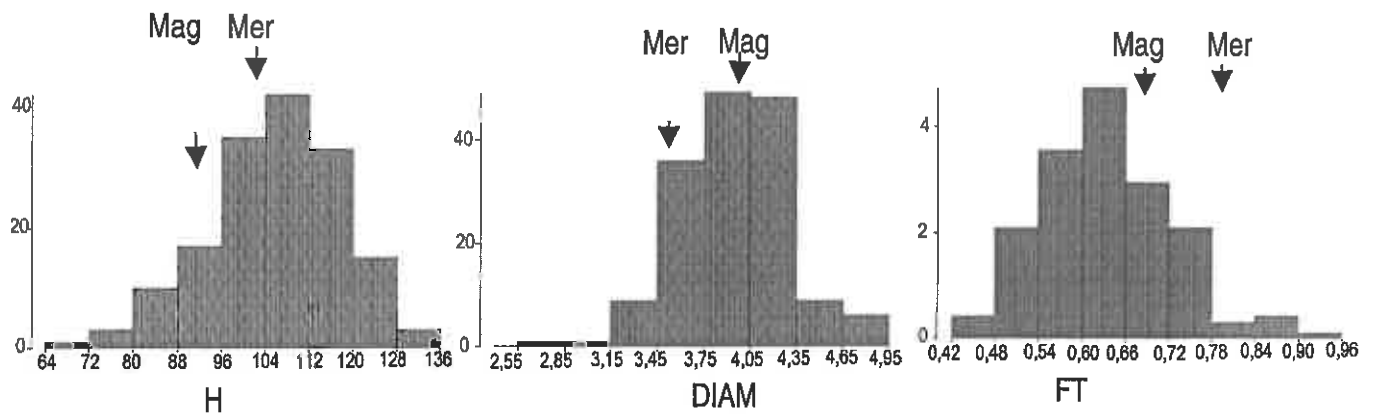


Figure 3.11 : Distribution des données phénotypiques en relation avec la morphologie des tiges dans la population  $F_1$ , avec en ordonnées le nombre de génotypes. H : hauteur des tiges, DIAM : diamètre de la section prélevée pour l'analyse histologique, et FT : rapport feuilles/tiges. La position de la moyenne des parents Magali : Mag et Mercedes : Mer est indiquée par une flèche dans ces distributions). En abscisse : valeur moyenne des individus de la population, et en ordonnées : nombre de génotypes.

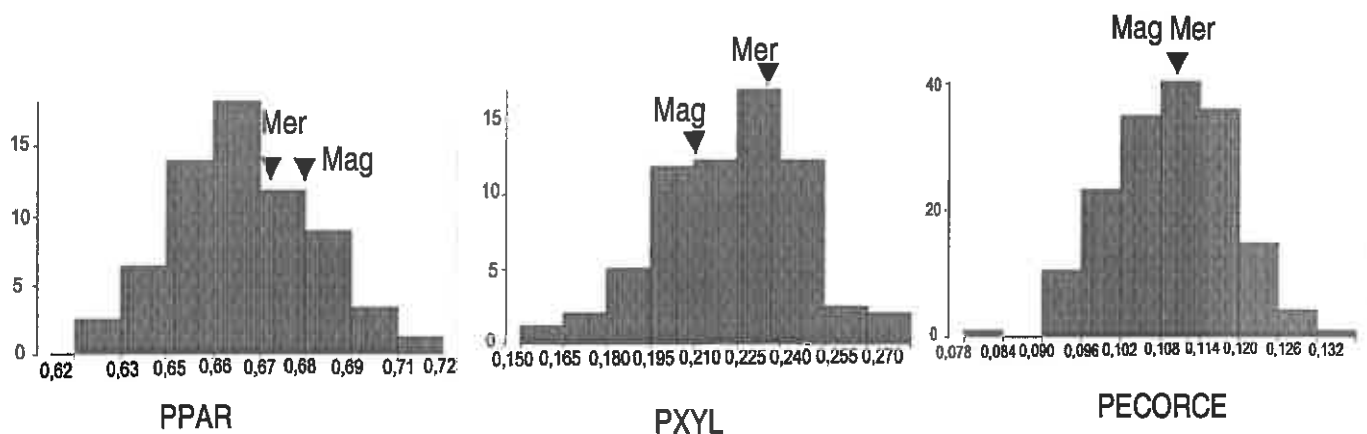


Figure 3.12 : Distribution des données phénotypiques des caractères histologiques liés aux proportions des différents tissus, avec en ordonnées le nombre de génotypes. PPAR : proportion de parenchyme médullaire, PXYL : proportion de xylème, PECORCE : proportion d'écorce dans la tige. (Mag : moyenne du parent Magali, Mer : moyenne du parent Mercedes).

Tableau 3.14 : Valeurs moyennes phénotypiques de chaque parent et de la population F<sub>1</sub>.

N : effectif, ET : écart-type de la moyenne des 3 blocs et des individus de la population F<sub>1</sub> et des clones des 2 parents, DT : test de comparaison de moyennes des 2 parents (les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes), Norm : normalité de la distribution des valeurs phénotypiques.

Caractère	Magali			Mercedes			Population de cartographie F <sub>1</sub>				
	Moyenne	N	ET	DT	Moyenne	N	ET	Norm	Moyenne	N	ET
Hauteur	91.90	11	19.94	a	99.90	10	16.40	a	105.85	476	15.63
Diamètre	4.02	11	0.50	a	3.50	10	0.69	a	3.94	476	0.54
FT	0.69	11	0.13	a	0.79	10	0.43	a	0.63	476	0.13
PECORCE	0.11	11	0.009	a	0.11	10	0.018	a	0.11	475	0.013
PXYL	0.21	11	0.045	a	0.23	10	0.055	a	0.22	475	0.036
PPAR	0.68	11	0.047	a	0.67	10	0.037	a	0.68	475	0.034
LVX	0.00029	11	0.00007	b	0.00046	10	1.3 10 <sup>-4</sup>	a	0.00036	475	8.5 10 <sup>-5</sup>
LFX	0.000031	11	3.14 10 <sup>-6</sup>	a	0.000026	10	2.58 10 <sup>-5</sup>	b	0.000028	475	2.72 10 <sup>-6</sup>
DPAR	0.53	11	0.048	a	0.56	10	0.038	a	0.54	475	0.036
EPPAR	0.00438	11	0.00025	b	0.00467	10	0.0003	a	0.00453	475	0.00019
PCT	53.72	11	4.66	a	50.54	10	3.42	a	50.88	474	3.33

FT : rapport feuilles / tiges, PECORCE : proportion d'écorce dans la tige, PXYL : proportion de xylème dans la tige, PPAR : proportion de parenchyme médullaire dans la tige, LVX : surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème, LFX : surface moyenne des lumières des fibres du xylème, DPAR : densité surfacique des parois du xylème, EPPAR : épaisseur des parois du xylème, PCT : solubilité enzymatique des tiges.

Tableau 3.15 : Carrés moyens de l'analyse de variance pour les caractères morphologiques et la solubilité enzymatique des tiges

Source de variation	d.d.l.	H	DIAM	PCT
Génotypes	158	420,80***	0,37 ***	17,92 ***
Répétitions	2	574,92*	0,65	56,19 ***
Erreur	314	153,6	0,24	7,35

H : hauteur des tiges, DIAM : diamètre de la section prélevée pour l'analyse histologique, PCT : solubilité enzymatique des tiges

Tableau 3.16 : Carrés moyens de l'analyse de variance pour les caractères histologiques liés aux proportions des différents tissus de la tige

Source de variation	d.d.l.	Proportion d'écorce	Proportion de xylème	Proportion de parenchyme médullaire
Génotypes	158	2,5 10 <sup>-4</sup> ***	1,9 10 <sup>-3</sup> ***	1,6 10 <sup>-3</sup> ***
Répétitions	2	5,7 10 <sup>-4</sup> *	2,7 10 <sup>-3</sup>	5,7 10 <sup>-3</sup> **
Erreur	314	1,4 10 <sup>-4</sup>	1,02 10 <sup>-3</sup>	0,8 10 <sup>-3</sup>

\*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01, \* p<0,05

Tableau 3.17 : Carrés moyens de l'analyse de variance pour les caractères histologiques liés aux structures du xylème

Source de variation	d.d.l.	LVX	LFX	DPAR	EPPAR
Génotypes	158	9,7 10 <sup>-9</sup> ***	8,77 10 <sup>-12</sup> *	0,0015 *	5 10 <sup>-8</sup> *
Répétitions	2	3,8 10 <sup>-9</sup>	2,63 10 <sup>-12</sup>	0,0035 *	10 10 <sup>-8</sup>
Erreur	314	6,0 10 <sup>-9</sup>	6,77 10 <sup>-12</sup>	0,0011	3 10 <sup>-8</sup>

LVX : surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème, LFX : surface moyenne des lumières des fibres du xylème, DPAR : densité surfacique des parois du xylème, EPPAR: épaisseur des parois du xylème.

probabilité inférieure à 0.05 indiquant qu'il existe des différences significatives entre les génotypes de la population. La moyenne de la population  $F_1$  est plus proche de Mercedes pour la hauteur des tiges, et plus proche de Magali pour le diamètre de la tige.

L'ensemble des caractères morphologiques mesurés montre une distribution normale sur la totalité de la population  $F_1$  (figures 3.11). Tous les caractères liés à la morphologie des tiges montrent une transgression par rapport aux parents avec en moyenne plus de 50 % des génotypes dont la valeur phénotypique n'est pas comprise entre celles des parents.

#### *Caractères liés aux proportions des différents tissus*

En moyenne, il n'y a pas de différences entre les parents pour la proportion d'écorce, la proportion de xylème et la proportion de parenchyme médullaire (tableau 3.14). La moyenne des génotypes de la population  $F_1$  est proche de celles des deux parents pour la proportion des 3 tissus. L'analyse de variance au niveau de la population  $F_1$  indique un effet génotype hautement significatif pour ces trois caractères (tableau 3.16).

L'ensemble des caractères liés à la proportion des différents tissus montre une distribution normale sur la totalité de la population  $F_1$  (figures 3.12). Tous les caractères liés à la proportion des différents tissus dans la tige montrent une transgression avec en moyenne plus de 50 % des génotypes dont la valeur phénotypique n'est pas comprise entre celles des parents. Ceci est particulièrement visible pour la proportion d'écorce (PECORCE), où les valeurs phénotypiques des parents sont identiques, et pour la proportion de parenchyme médullaire (PPAR) (tableau 3.14).

#### *Caractères liés au xylème*

Mercedes possède des surfaces moyennes de vaisseaux (LVX) supérieures à celles de Magali. La population  $F_1$  se situe à l'intermédiaire des parents. De même, pour la surface moyenne des fibres du xylème (LFX) et l'épaisseur des parois (EPPAR), les parents sont différents et la moyenne de la population  $F_1$  se situe à l'intermédiaire des 2 parents. Mercedes a des surfaces moyennes des lumières des fibres inférieures à Magali, et des épaisseurs de parois (EPPAR) plus importantes que Magali. Pour la densité surfacique de parois (DPPAR), la moyenne de la population  $F_1$  est proche des 2 parents, mais ces deux dernières sont différentes l'une de l'autre. Mercedes présente des densités surfaciques de parois supérieures à celles de Magali. L'analyse de variance montre un effet significatif des génotypes  $F_1$  sur tous les caractères liés au xylème (tableau 3.17).

La distribution des génotypes dans la population de cartographie est normale pour tous les caractères liés au xylème (figure 3.13). Les transgressions sont les moins fortes pour la surface



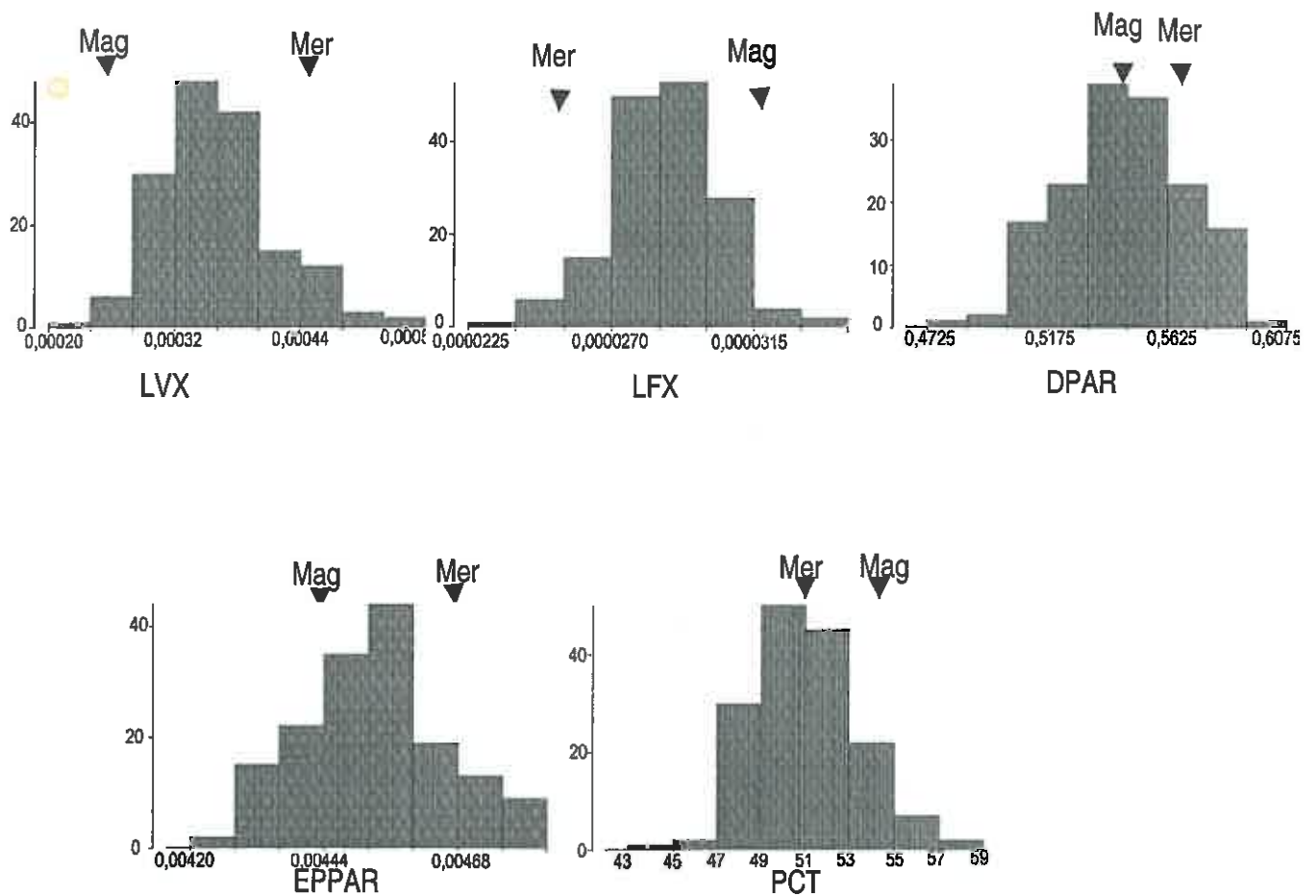


Figure 3.13 : Distribution des valeurs phénotypiques des caractères histologiques liés au xylème, avec en ordonnées le nombre de géotypes. LVX : surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème, LFX : surface moyenne des lumières de fibres du xylème, DPAR : densité surfacique des parois du xylème, EPPAR : épaisseur des parois du xylème, et PCT : solubilité enzymatique des tiges. (Mag : moyenne du parent Magali, Mer : moyenne du parent Mercedes).

moyenne des lumières des vaisseaux (LVX) et des fibres du xylème (LFX), où  $\frac{3}{4}$  des géotypes sont situés à l'intermédiaire des 2 parents. Pour l'épaisseur des parois du xylème, environ 50 % des géotypes sont situés entre les valeurs des parents.

#### *Solubilité enzymatique des tiges*

Les deux parents ne sont pas significativement différents pour la solubilité enzymatique des tiges. Cependant on peut noter que Magali présente une solubilité enzymatique des tiges supérieure à celle de Mercedes. La moyenne de la population F<sub>1</sub> est plus proche de Mercedes que de Magali. L'analyse de variance montre un effet significatif des géotypes de la population sur ce caractère (tableau 3.15).

La distribution des géotypes dans la population de cartographie est normale pour la solubilité enzymatique des tiges (figure 3.13). La figure 3.13 montre une transgression importante par rapport aux parents avec seulement 28 % des géotypes de la descendance qui sont situés entre les valeurs moyennes des 2 parents.

L'analyse des données phénotypiques montre une variabilité génétique importante pour tous les caractères mesurés. Cette variabilité est supérieure à celle trouvée dans les dispositifs inter-cultivars et intra-cultivar dans les études précédentes. Il existe donc au sein de la population F1 une variabilité génétique suffisante pour tous les caractères mesurés pour rechercher des marqueurs associés à leur variation.

### **3.1.2. Corrélations phénotypiques et génétiques (tableau 3.18)**

#### *Corrélations entre caractères morphologiques*

La hauteur des tiges est corrélée positivement au diamètre de la portion basse des tiges et négativement au rapport feuilles/tiges aux niveaux phénotypique et génétique.

#### *Corrélations entre la solubilité enzymatique des tiges et les caractères morphologiques*

La solubilité enzymatique des tiges est corrélée négativement avec la hauteur des tiges et le diamètre des tiges aux niveaux phénotypique et génétique. Cependant la corrélation avec le diamètre des tiges est très faible. Les variations de solubilité enzymatique sont expliquées à 35 % par la hauteur, et 5% par le diamètre du bas des tiges. Le rapport feuilles/tiges est corrélé positivement au niveau génétique à la digestibilité des tiges. Au niveau phénotypique, la corrélation n'est que de 0,10. La digestibilité des tiges augmente donc lorsque la proportion de feuilles est importante et les tiges moins hautes.

Tableau 3.18 : Corrélations phénotypiques sur la moyenne des répétitions de la population F<sub>1</sub> (au dessus de la diagonale), et corrélations génétiques (sous la diagonale). Les corrélations signalées en caractères gras sont significatives à un seuil de 0,05.

	Hauteur	Diamètre	FT	PECORCE	PXYL	PPAR	LVX	LFX	DPAR	EPPAR	PCT
Hauteur											
Diamètre	0,58										
FT	-0,66	0,59									
PECORCE	-0,84	-0,22	0,47								
PXYL	0,25	-0,23	-0,46								
PPAR	-0,05	0,51	0,32								
LVX	-0,13	0,26	0,06								
LFX	0,08	0,11	-0,19								
DPAR	0,53	-0,01	-0,23								
EPPAR	0,42	0,52	-0,11								
PCT	-0,59	-0,22	0,56								
				0,68							
				-0,49							
				0,36							
				-0,35							
				-0,24							
				0,15							
				-0,15							
				0,54							
				-0,15							
				0,23							
				-0,40							
				0,28							
				-0,93							
				0,65							
				-0,63							
				0,43							
				-0,46							
				0,15							
				-0,15							
				0,36							
				-0,49							
				0,67							
				-0,20							
				0,67							
				-0,20							
				0,74							
				-0,87							
				0,48							
				-0,19							
				0,14							
				-0,025							
				0,26							
				-0,28							
				0,32							
				-0,24							
				0,37							
				-0,10							
				0,19							
				-0,05							
				0,29							
				-0,21							
				0,35							
				-0,10							
				0,24							
				-0,21							
				0,27							
				-0,21							
				0,33							
				-0,21							
				0,24							
				-0,24							
				0,35							
				-0,35							
				0,37							
				-0,35							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							
				0,24							
				-0,24							

*Corrélations entre la solubilité enzymatique des tiges et les caractères histologiques*

La solubilité enzymatique des tiges est corrélée positivement et significativement à la proportion d'écorce et à la proportion de parenchyme médullaire et négativement à la proportion de xylème. En ce qui concerne les structures du xylème, la solubilité enzymatique des tiges est corrélée négativement de manière significative uniquement à la densité surfacique de parois. Les corrélations génétiques vont dans le même sens mais ont des valeurs plus importantes. On trouve également une corrélation génétique négative ( $r=-0,49$ ) entre la solubilité enzymatique des tiges et l'épaisseur des parois. Il existe donc des relations génétiques entre la digestibilité des tiges et les proportions d'écorce, de xylème et de parenchyme médullaire, ainsi que la densité surfacique et l'épaisseur des parois du xylème.

*Corrélations entre les caractères morphologiques et histologiques*

La hauteur est corrélée négativement à la proportion d'écorce et positivement à la proportion de xylème. En ce qui concerne les structures du xylème, la hauteur est corrélée positivement au niveau phénotypique à la surface moyenne des lumières des fibres, à la densité surfacique de parois et à l'épaisseur de parois. On ne retrouve pas la corrélation entre la hauteur et la surface moyenne des lumières des fibres au niveau génétique.

Le diamètre est corrélé négativement avec la proportion d'écorce, et il n'y a pas de corrélation significative avec les autres tissus. La corrélation génétique avec la proportion d'écorce est similaire. Les génotypes avec des tiges de gros diamètre ont donc des proportions d'écorce plus faible. Le diamètre est corrélé positivement, comme la hauteur, avec la surface moyenne de la lumière des fibres du xylème, la densité surfacique et l'épaisseur des parois au niveau phénotypique. On retrouve ces corrélations au niveau génétique entre le diamètre et l'épaisseur des parois et la proportion d'écorce.

Le rapport feuilles/tiges est corrélé significativement avec la proportion d'écorce aux niveaux phénotypique et génétique. Il existe également une corrélation génétique négative avec la proportion de xylème.

*Corrélations entre les caractères histologiques*

Si l'on regarde dans un premier temps les corrélations entre les proportions des différents tissus constituant la tige, on observe que la proportion de xylème dans les tiges est fortement corrélée négativement tant au niveau phénotypique que génétique à la proportion de parenchyme médullaire ( $r=-0,90$  et  $r=-0,93$  respectivement). On observe à la fois au niveau phénotypique et génétique des corrélations négatives faibles entre la proportion d'écorce et la proportion de parenchyme médullaire

Tableau 3.19 : Variance des 161 individus ( $\sigma^2_{GE}$ ) de la population  $F_1$  ayant servi à faire les cartes des deux parents et variance d'erreur ( $\sigma^2_E$ ) et calcul de l'héritabilité au sens large ( $h^2$ ).

	$\sigma^2_{GE}$	$\sigma^2_E$	$h^2$
PCT	3,54	7,34	0,32
Hauteur	89,33	153,84	0,37
DIAM	0,04	0,25	0,14
FT	0,032	0,21	0,13
PECORCE	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,20
PXYL	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,22
PPAR	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$8,5 \cdot 10^{-4}$	0,23
LVX	$1,24 \cdot 10^{-9}$	$6,09 \cdot 10^{-9}$	0,17
LFX	$6,7 \cdot 10^{-13}$	$6,01 \cdot 10^{-12}$	0,10
DPAR	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,22
EPPAR	$3,96 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-7}$	0,12

( $r=-0,17$  au niveau phénotypique et  $r=-0,27$  au niveau génétique). Cependant la corrélation négative de la proportion d'écorce avec la proportion de xylème au niveau phénotypique ( $r=-0,20$ ) n'est pas retrouvée au niveau génétique.

Au niveau des structures du xylème, la surface moyenne de la lumière des fibres est corrélée, au niveau phénotypique, négativement ( $r=-0,89$ ) avec la surface moyenne des vaisseaux, et plus faiblement avec la densité surfacique et l'épaisseur des parois. Les corrélations génétiques vont dans le même sens mais ont des valeurs plus élevées. Il existe également une corrélation génétique positive ( $r=0,67$ ) entre la surface moyenne de la lumière des vaisseaux et l'épaisseur des parois. La densité surfacique des parois est corrélée positivement ( $r=0,74$ ) à l'épaisseur des parois, ce qui est logique puisque ces deux caractères sont calculés à partir de la surface de parois lignifiées. C'est à dire que plus les parois du xylème sont épaisses et plus la densité de parois sera élevée dans la surface considérée au niveau d'un faisceau. La proportion de xylème présente des corrélations génétiques positives avec la surface moyenne des lumières des fibres et la densité surfacique et l'épaisseur des parois du xylème.

### 3.1.3. Héritabilité des caractères

Les variances d'erreur sont supérieures aux variances génétiques pour tous les caractères, ce qui entraîne des valeurs d'héritabilité faibles (tableau 3.19). Les caractères les plus héréditaires sont la hauteur des tiges (0,37), la digestibilité des tiges (0,32), la proportion de xylème (0,23), la proportion de parenchyme médullaire (0,22), et la densité surfacique de parois du xylème (0,22). La valeur de ces hérédibilités donne la part de variation génotypique dans la variation phénotypique totale potentiellement décomposable en QTLs.

## 3.2. Recherche de marqueurs (QTLs)

### 3.2.1. Caractères liés à la morphologie des tiges (tableau 3.20, figures 3.14 et 3.15)

On observe 26 marqueurs de Mercedes et 24 de Magali significativement associés aux variations de la hauteur des tiges (Annexe 3.2). Après un tri des marqueurs par l'analyse GLM de type II, 5 marqueurs sont significativement associés aux variations de hauteur et expliquent ensemble 37 % de la variation phénotypique observée. Trois marqueurs proviennent de Magali, 3 de Mercedes dont 1 provient à la fois des deux parents (simplex biparental, noté SS dans le tableau 3.20). Les marqueurs provenant de Magali ont soit un effet positif sur la hauteur des tiges et augmentent la hauteur des tiges de 5 à 7 cm, soit un effet négatif et diminuent la hauteur de 7 cm. Le marqueur CCAC88 a un effet positif sur la hauteur et provient de Magali. Ce marqueur (figure 3.14) est cartographié sur le groupe 7

Tableau 3.20 : Marqueurs significativement liés aux variations des valeurs morphologiques des tiges. Le R<sup>2</sup> global de l'ensemble des marqueurs est indiqué en caractère gras pour chaque caractère. La probabilité indiquée correspond à la probabilité de l'effet de chaque marqueur du modèle.

Caractère	Marqueur	Origine du marqueur	Dose du marqueur (*)	Moyenne de la classe 0 (absence du marqueur)	Moyenne de la classe 1 (présence du marqueur)	Effet du marqueur	Prob>F	R <sup>2</sup> marqueur	Localisation sur les cartes
<b>Hauteur (cm)</b>	CCAC88	Magali	S	102,62	109,88	+ 7,26 cm	0,0001	0,170	7
	ACAG500	Magali	S	102,9	108,24	+ 5,34 cm	0,0015	0,070	NC
	CTT1133	Mercedes	S	101,93	109,22	+ 7,29 cm	0,0050	0,054	3
	GGAA133	Magali/Mercedes	SS	111,07	104,19	- 6,88 cm	0,0087	0,046	1/12
	GCAC203	Mercedes	S	103,37	108,94	+ 5,57 cm	0,0208	0,035	34
	CTT133xACAG500						0,0426	0,027	
							<b>0,40</b>		
<b>Diamètre (mm)</b>	CCTC231	Mercedes	D	4,20	3,91	- 0,29 - 0,009 mm	0,0250	<b>0,080</b>	4
	CCAC88	Magali	S	0,64	0,58	- 0,099	0,00001	0,092	7
<b>FT</b>	GGTA149	Magali/Mercedes	SS	0,58	0,63	+ 0,139	0,0009	0,032	1/12
	GGAA105	Mercedes	S	0,63	0,58	- 0,11	0,0004	0,052	11
	GCAC88	Mercedes	S	0,63	0,59	- 0,12	0,0018	0,027	NC
	GGAA94	Mercedes	S	0,63	0,59	- 0,11	0,0015	0,030	11
	MTR58B	Magali	S	0,64	0,59	- 0,08	0,0012	0,097	7

(\*) La dose du marqueur correspond au dosage allélique au locus marqueur. Il est déterminé en comparant la ségrégation de chaque marqueur dans la descendance aux distributions théoriques attendues. S : Un allèle est dit simplex s'il est présent en une seule dose (la ségrégation dans la descendance sera 1:1 (présence : absence); D : un allèle est dit duplex s'il est présent en 2 doses (la ségrégation dans la descendance sera 5 : 1). NC : marqueur non cartographié.



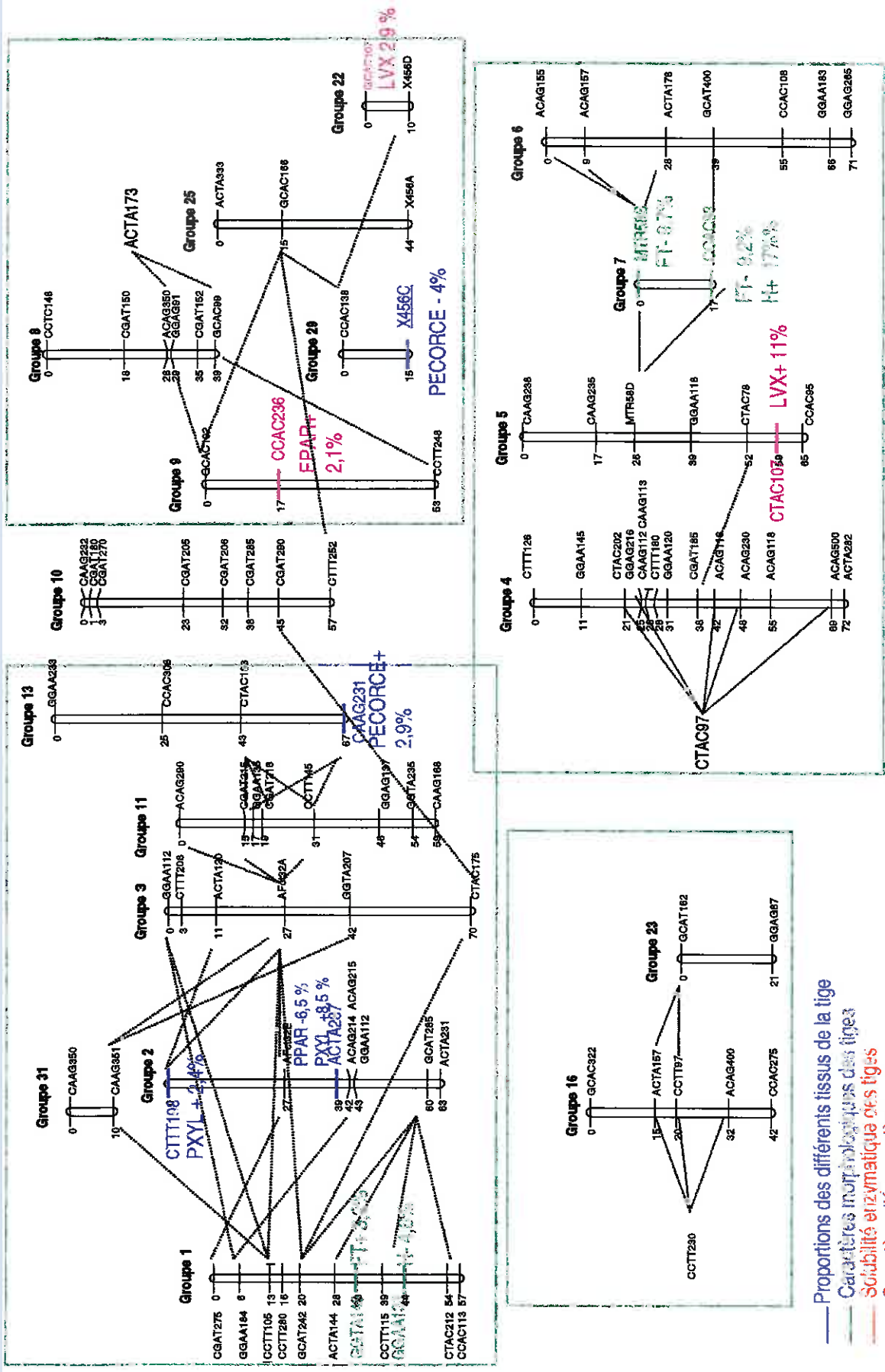


Figure 3.14 : Groupes de liaison (représentés par des bâtonnets) de la carte du parent Magali. Sur les groupes de liaison, les locus marqueurs sont identifiés par un trait horizontal. Les encadrés représentent les groupes d'homologie (en théorie 8 chez la luzerne) regroupant les groupes de liaisons (en théorie 4). En trait pointillé sont représentés les liaisons en répulsion entre marqueurs. L'effet du marqueur sur le caractère est noté par "+" et par "-", le pourcentage de variation expliquée par le marqueur est indiqué.











et représente un marqueur majeur expliquant 17 % de la variation phénotypique. Le marqueur GGAA133 cartographié sur le groupe 1 d'un autre groupe d'homologie de Magali a un effet négatif sur le caractère et explique 4,6 % de la variation du caractère. Les marqueurs provenant de Mercedes situés sur les groupes de liaison 34 et 3 du même groupe d'homologie ont un effet positif sur la hauteur et augmentent de 5 à 7 cm la hauteur des tiges, et le marqueur situé sur le groupe de liaison 12 d'un autre groupe d'homologie a un effet négatif et diminue la hauteur des tiges de 7 cm. On observe également un effet d'épistasie entre deux marqueurs (l'un provenant de Magali et l'autre de Mercedes) qui explique 2,7 % de la variation phénotypique. Lorsque cet effet est inclus avec les effets des marqueurs, l'ensemble explique 40 % de la variation phénotypique de la hauteur des tiges. Pour la hauteur des tiges, il existe des allèles favorables et défavorables chez chacun des parents, il est donc logique d'observer des phénomènes de transgression dans la descendance.

Pour le diamètre des tiges, 11 marqueurs provenant de Mercedes et 16 de Magali sont significativement associés aux variations du caractère. Après le tri des marqueurs, un seul marqueur significatif a été retenu. Il provient du parent Mercedes et agit négativement sur le caractère. Il diminue le diamètre de 0,0009 mm, et explique 8 % de la variation phénotypique totale. Ce marqueur est situé sur le groupe de liaison 4 du parent Mercedes. Le pourcentage de variation expliquée par ce marqueur est faible mais il faut rappeler que ce caractère a une héritabilité faible de 14 % et fait partie des caractères de plus faible héritabilité.

Pour le rapport feuilles/tiges, 15 marqueurs significatifs proviennent de Mercedes et 17 de Magali (Annexe 3.3). Après le tri des marqueurs (ceux dont la probabilité est inférieure à 0.005) 6 marqueurs ont été retenus : 2 marqueurs provenant de Magali, 3 de Mercedes et un marqueur biparental (tableau 3.20). Ces marqueurs participent de façon homogène à la variation phénotypique du caractère. Il n'y a pas de QTL majeur. Tous les marqueurs ont un effet négatif sur le caractère, sauf celui provenant à la fois des 2 parents (marqueur biparental). Chez le parent Magali, les marqueurs associés au rapport feuilles/tiges (FT) sont localisés sur les mêmes groupes de liaison que pour la hauteur des tiges. Chez le parent Mercedes, les 3 marqueurs cartographiés associés aux variations du rapport feuilles/tiges sont situés sur le même groupe d'homologie (groupe de liaison 11, avec un effet négatif et sur le groupe de liaison 12 avec un effet positif sur le caractère). Chez le parent Magali, 2 des 3 marqueurs sont situés sur le même groupe de liaison (groupe 7) et l'autre est situé sur dans un autre groupe d'homologie sur le groupe de liaison 1. Il existe dans chaque parent des allèles favorables et défavorables pour le rapport FT.



Tableau 3.21 : Marqueurs significativement liés aux variations des proportions des différents tissus composant les tiges. Le  $R^2$  global de l'ensemble des marqueurs est indiqué en caractère gras. La probabilité indiquée correspond à la probabilité de l'effet de chaque marqueur du modèle.

Caractère	Marqueur	Origine du marqueur	Dose du marqueur	Moyenne de la classe 0 (absence du marqueur)	Moyenne de la classe 1 (présence du marqueur)	Effet du marqueur	Prob>F	$R^2$ marqueur	Localisation (numéro du groupe de liaison)
<b>PECORCE</b>	GCAC196	Mercedes	S	0,112	0,106	- 0,006	0.0702	0,063	3
	X456C	Magali/Mercedes	SS	0,114	0,108	- 0,006	0.0082	0,040	29/31
	CAAG231	Magali	S	0,105	0,111	+ 0,006	0.0286	0,028	13
	GCAC203	Mercedes	S	0,112	0,106	- 0,006	0.0011	0,071	34
	GCAC196xX456C						0.0750	0,019	
							<b>0,22</b>		
<b>PXYL</b>	CTTT198	Magali	S	0,218	0,230	+ 0,012	0.0951	0,024	2
	ACTA287	Magali/Mercedes	SS	0,213	0,230	+ 0,017	0.0001	0,085	2/11
								<b>0,11</b>	
<b>PPAR</b>	ACTA287	Magali/Mercedes	SS	0,685	0,672	- 0,013	0.0042	<b>0,065</b>	2/11

### 3.2.2. Caractères histologiques liés à la proportion des différents tissus de la tige

(tableau 3.21, figure 3.14 et 3.15)

Au total, 7 marqueurs significatifs ont été retenus après le tri des marqueurs pour les proportions des différents tissus : 4 sont associés à la proportion d'écorce, 2 à la proportion de xylème et 1 à la proportion de parenchyme médullaire. Il n'y a pas de marqueurs à effet "fort", les marqueurs ont des effets assez homogènes allant de 3 % à 7 % de variation expliquée. L'ensemble des marqueurs associés à la proportion d'écorce explique 22 % de la variation phénotypique du caractère, comprenant une interaction entre deux de ces marqueurs mais dont le pourcentage de variation expliquée est faible (1,9 %). Les marqueurs provenant de Mercedes ont globalement un effet négatif et diminuent tous la proportion d'écorce de 0,006. Ces marqueurs sont cartographiés et sont situés sur le même groupe d'homologie et sur des groupes de liaison différents (groupe 3, 31 et 34). Les marqueurs provenant du parent Magali, sont localisés sur des groupes d'homologie différents et ont des effets à la fois positif et négatif avec des contributions homogènes.

Les marqueurs associés aux variations de la proportion de xylème ont un effet positif sur le caractère et augmentent la proportion de xylème dans la tige de 12 à 17 %. Les 2 marqueurs provenant de Magali sont situés sur le même groupe de liaison. L'ensemble des marqueurs explique 11 % de la variation du caractère et un des marqueurs explique 8,5 % à lui seul. Le marqueur ACTA287 impliqué dans l'augmentation de la proportion de xylème est également associé à une diminution de la proportion de parenchyme médullaire (pour les 2 parents puisque c'est un marqueur biparental). Il semble donc que ce marqueur partage un effet simultané sur la proportion des 2 types de tissus qui peut être un effet de causalité où le marqueur a un effet sur un caractère qui régulerait l'expression du deuxième ou un effet de pléiotropie où le QTL aurait un effet indépendant sur chacun des 2 caractères.

Un seul marqueur est associé à la variation de la proportion de parenchyme médullaire dans la tige. C'est un marqueur qui provient des 2 parents et qui explique 6,5 % de la variation totale.

Le marqueur (GCAC203) associé à un effet positif sur la hauteur des tiges est également associé à une diminution de la proportion d'écorce et une augmentation de la surface moyenne des fibres du xylème.

### 3.2.3. Caractères histologiques liés aux différents éléments du xylème

(tableau 3.22 et figures 3.14 et 3.15)

Quatre marqueurs sont associés significativement à la surface moyenne de la lumière des fibres et des vaisseaux du xylème. Ils ont tous les 4 un effet positif sur les caractères mais expliquent

Tableau 3.22 : Marqueurs significativement liés aux variations des éléments composant le xylème. Le R<sup>2</sup> global de l'ensemble des marqueurs est indiqué en caractères gras. La probabilité indiquée correspond à la probabilité de l'effet de chaque marqueur du modèle.

Caractère	Marqueur	Origine du marqueur	Dose du marqueur	Moyenne de la classe 0 (absence du marqueur)	Moyenne de la classe 1 (présence du marqueur)	Effet du marqueur	Prob>F	R <sup>2</sup> marqueur	Localisation (numéro du groupe de liaison)
<b>LVX (mm<sup>2</sup>)</b>	CTAC107	Magali/Mercedes	SS	0,00033	0,00037	+ 0,00004	0,0001	0,11	5/22
	GCAC107	Magali/Mercedes	SS	0,00034	0,00037	+ 0,00003	0,0118	0,029	22/NC
								<b>0,14</b>	
<b>LFX (mm<sup>2</sup>)</b>	ACTA244	Mercedes	D	0,0000277	0,0000289	+0,000001	0,0066	0,052	NC
	GCAC203	Mercedes	S	0,0000282	0,0000291	+0,000029	0,0101	0,049	34
								<b>0,10</b>	
<b>DPAR</b>	CTAC275	Mercedes	S	0,55	0,54	- 0,01	0,0004	0,079	1
	GCAC196	Mercedes	S	0,54	0,55	+ 0,01	0,0131	0,037	3
	CTAC275xGCAC196						0,0702	0,019	
								<b>0,14</b>	
<b>EPPAR (mm)</b>	CCAC286	Magali/Mercedes	SS	0,00447	0,00455	+ 0,00008	0,0011	0,035	NC/NC
	GCAT345	Mercedes	S	0,00450	0,00456	+ 0,00006	0,0039	0,039	6
	GGAA155	Magali/Mercedes	SS	0,00447	0,00454	+ 0,00007	0,0034	0,039	NC/NC
	GGAA216	Mercedes	S	0,00457	0,00450	- 0,00007	0,0072	0,035	13
	CCAC236	Magali	S	0,00449	0,00455	+ 0,00006	0,0387	0,021	9
	GCAC345xGGAA216						0,0283	0,026	
	GGAA145xCCAC236						0,0548	0,017	
							<b>0,21</b>		

peu de variation (14 % pour la surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème, et 10 % pour la surface moyenne des lumières des fibres du xylème). Les marqueurs associés à la variation de la surface moyenne des vaisseaux du xylème (LVX) proviennent à la fois des 2 parents. Un des marqueurs a un effet majeur sur le caractère et explique 11 % de la variation à lui seul. Deux marqueurs sont cartographiés chez le parent Magali et sont localisés sur des groupes d'homologie différents sur les groupes de liaison 22 et 5. Les marqueurs associés à la surface moyenne des fibres du xylème (LFX) proviennent du parent Mercedes et ont des effets homogènes sur le caractère. Un seul est cartographié et est localisé sur le groupe de liaison 34.

Pour les caractères liés aux parois du xylème (densité surfacique de parois et épaisseur des parois), 7 marqueurs ont été retenus après le tri des marqueurs. Deux marqueurs expliquent ensemble 14 % de la variation de la densité surfacique des parois. Les marqueurs associés à la densité surfacique des parois proviennent du parent Mercedes et ont à la fois des effets positifs ou négatifs. Ils sont localisés sur le même groupe d'homologie sur des groupes de liaison différents et ils sont liés en répulsion. En globalité l'interaction des 2 marqueurs diminue la densité surfacique des parois (augmentation des fréquences vers les valeurs faibles).

Cinq marqueurs comprenant deux interactions significatives entre marqueurs expliquent 21 % de la variation de l'épaisseur des parois du xylème. Les marqueurs associés à l'épaisseur des parois ont un effet global positif sur le caractère, avec toutefois un marqueur ayant un effet négatif. Les marqueurs associés à l'épaisseur des parois ont des effets individuels homogènes de 2 à 4 %. L'ensemble des marqueurs du modèle y compris les 2 interactions expliquent 21 % de la variation du caractère. Les marqueurs impliqués dans l'interaction sont situés sur des groupes d'homologie différents.

Un autre QTL impliqué dans la diminution de la proportion d'écorce est associé à une augmentation des densités surfaciques de parois.

### **3.2.4. Solubilité enzymatique des tiges**

(tableau 3.23 et figures 3.14 et 3.15)

Quatre marqueurs sont significativement associés à la variation phénotypique de la solubilité enzymatique des tiges. Ils proviennent tous les 4 du parent Mercedes. Deux d'entre eux ont un effet négatif (avec une diminution de 1,3 % du caractère) et les deux autres ont un effet positif (avec une augmentation de 1,3 % de la solubilité enzymatique). L'ensemble des marqueurs explique 18 % de la variation phénotypique du caractère dans la population F<sub>1</sub>. Ces marqueurs sont situés sur des groupes

Tableau 3.23 : Marqueurs significativement liés aux variations des valeurs de solubilité enzymatique des tiges. Le R<sup>2</sup> global de l'ensemble des marqueurs est indiqué en caractères gras. La probabilité indiquée correspond à la probabilité de l'effet de chaque marqueur du modèle.

Caractère	Marqueur	Origine du marqueur	Dose du marqueur	Moyenne de la classe 0 (%)	Moyenne de la classe 1 (%)	Effet du marqueur	Prob>F	R <sup>2</sup> marqueur	Localisation (numéro du groupe de liaison)
PCT (%)	ACAG150	Mercedes	S	50,38	51,69	+ 1,31	0,0018	0,078	NC
	ACAG130	Mercedes	S	51,62	50,38	- 1,24	0,0119	0,048	7
	CTTT133	Mercedes	S	51,66	50,35	- 1,31	0,0368	0,032	3
	MTR58A	Mercedes	D	49,86	51,18	+ 1,32	0,0962	0,020	17
								<b>0,18</b>	

La hauteur est également corrélée positivement avec la densité surfacique des parois du xylème, et négativement avec la proportion d'écorce. Comme la solubilité des tiges est corrélée négativement avec la hauteur et positivement avec les proportions d'écorce, par construction il est logique que la corrélation aille dans ce sens.

La proportion de parenchyme médullaire dans la tige est corrélée fortement à la proportion de xylème ( $r=-0,93$ ) et moins à la proportion d'écorce ( $r=-0,27$ ). On retrouve ce que l'on a déjà observé dans l'essai évaluant la variabilité génétique à l'intérieur des variétés (chapitre III.2). La proportion de xylème est corrélée positivement à la densité surfacique et à l'épaisseur des parois lignifiées du xylème. La relation positive avec la densité surfacique des parois semble logique. En effet plus il y a de nouvelles assises cellulaires dans le xylème secondaire, plus le compartiment constitué de parois lignifiées augmente, d'où la corrélation positive entre la place prise par le xylème et la densité surfacique des parois lignifiées. Cependant cette corrélation n'était pas observée dans le dispositif intra cultivar (chapitre III.2) mais la gamme de variation observée pour la densité surfacique et l'épaisseur des parois était légèrement inférieure à celle observée dans la population de cartographie. La densité surfacique des parois et l'épaisseur des parois jouant un rôle dans la rigidité des tiges, il sera difficile de sélectionner des génotypes digestibles (avec une plus faible proportion de xylème) sans en affecter la rigidité des tiges (impliqué dans la résistance à la verse). Cependant, les fibres du phloème et les fibres supraphloémiennes interviennent également dans le soutien et dans la rigidité des tiges. Ce qui permet d'envisager de diminuer la proportion de xylème des tiges tout en espérant garder un minimum de rigidité à la tige. Des notations de verse auraient permis d'apporter des éléments de réponse.

La corrélation génétique positive ( $r=0,67$ ) entre la surface moyenne de la lumière des vaisseaux du xylème et l'épaisseur des parois pourrait s'expliquer d'un point de vue du transport d'eau (sève brute) dans les vaisseaux. En effet des vaisseaux de grande taille pourraient permettre un flux d'eau plus rapide entraînant une pression plus importante sur les parois, ce qui pourrait expliquer que l'augmentation en taille des vaisseaux s'accompagne de l'épaississement des parois.

Au vu de ces corrélations, il apparaît que le fonctionnement du cambium a une importance cruciale. En effet, il met en place de nouvelles assises cellulaires dans les tissus matures, dont les parois s'épaississent et se lignifient fortement. Ceci se traduit par l'augmentation de la proportion de xylème qui se fait au dépend de la proportion d'écorce. Shenk et Elliott (1971) ont suggéré que la substitution de l'anneau de xylème fortement lignifié par un cambium moins actif serait une approche possible pour améliorer la digestibilité des tiges de luzerne.

Finalement le diamètre est faiblement corrélé aux niveaux phénotypiques et génétiques à la solubilité enzymatique des tiges. Contrairement aux "idées reçues" que des grosses tiges sont moins digestibles que les tiges fines, il n'existe pas de relation significative entre les deux caractères, étant donné que la solubilité enzymatique des tiges dépend plutôt de la proportions des divers tissus les constituant. Le diamètre est corrélé négativement à la proportion d'écorce et positivement à la proportion du parenchyme médullaire. L'absence de corrélation entre le diamètre et la proportion de xylème est surprenante. Etant donné que la croissance secondaire en diamètre dépend de l'activité du cambium et de sa capacité à mettre en place dans nouvelles assises cellulaires de xylème secondaire, on aurait pu s'attendre à une corrélation positive entre ces deux caractères. Cependant, l'expansion du xylème semble se faire au détriment des autres tissus.

### ***Recherche de marqueurs associés***

L'analyse marqueur par marqueur des liaisons entre des marqueurs et des caractères d'intérêt est peu répandue dans la littérature depuis le développement de logiciels spécialisés dans la recherche de QTL, et utilisée la plupart du temps chez les espèces à hérédité polysomique ou dans le cas de croisements interspécifiques. Dans le cas présent, ce travail de recherche de marqueurs associés à la variation des caractères mesurés reste très sommaire. Il ne permet pas de positionner précisément de QTLs sur les cartes, cependant il permet d'associer de façon sûre grâce aux analyses de variance l'effet d'un marqueur à la variation d'un caractère. Hackett et al. (2001) ont développé la théorie de l'intervall mapping (cartographie d'intervalle basée sur la présence d'un QTL entre deux marqueurs liés par un taux de recombinaison  $r$ ) sur les espèces autotétraploïdes. Le développement d'un logiciel adapté aux espèces tétraploïdes permettrait de localiser de façon précise les QTLs sur le génome des parents à partir des résultats trouvés ici.

Sur la carte de Magali, on trouve des marqueurs impliqués dans différents caractères et qui colocalisent sur la carte. Il s'agit en particulier de la hauteur des tiges et du rapport feuilles/tiges. On observe la même chose chez le parent Mercedes mais sur un seul groupe de liaison. De façon systématique, lorsque les marqueurs impliqués dans les variations de hauteur des tiges et du rapport feuilles/tiges colocalisent ou lorsqu'un même marqueur est impliqué dans la variation des deux caractères, les effets sont opposés. On retrouve cette association négative au niveau des corrélations génétiques. Il est donc possible d'associer une augmentation de la hauteur des tiges à une diminution du rapport feuilles/tiges.

De même l'augmentation de la hauteur et la diminution de la solubilité enzymatique des tiges sont associées sur le même groupe de liaison chez le parent Mercedes à une diminution de la



proportion d'écorce et à la densité surfacique des parois du xylème. Le marqueur impliqué dans l'augmentation de la proportion de xylème est associé à une diminution de la proportion de parenchyme médullaire. On retrouve la corrélation génétique négative entre la solubilité enzymatique des tiges et la densité surfacique des parois du xylème, ainsi que la corrélation génétique positive avec la proportion d'écorce.

Chez un même parent, on retrouve à la fois des marqueurs à effet positif et d'autres à effet négatif pour le même caractère. On trouve ces effets opposés soit sur des groupes d'homologie identiques (c'est le cas de la densité surfacique des parois et du rapport feuilles / tiges chez le parent Mercedes), soit sur des groupes d'homologie différents (c'est le cas de la solubilité enzymatique, de la hauteur des tiges et de l'épaisseur des parois). Chez le parent Magali, on n'observe pas ce type d'effets opposés sur le même groupe d'homologie. Dans le cas où les marqueurs à effets opposés sont sur le même groupe d'homologie, on peut suspecter des allèles à effets opposés. D'une manière générale, ceci met en évidence différents locus ou allèles à effets opposés. Marhadour (2001) dans ses travaux sur l'hybridation interspécifique entre la fétuque et le ray-grass a mis en évidence des marqueurs à effets opposés chez les parents de la population de cartographie pour la teneur en fibres et la vitesse de repousse au niveau d'un même groupe d'homologie. Meyer et al. (1998) ont également détecté des marqueurs ayant des effets contrastés à l'intérieur d'un même groupe d'homologie sur la pomme de terre avec des marqueurs associés à la fois à la résistance et à la sensibilité au mildiou. Il est donc important de repérer les allèles favorables pour fixer les allèles à effet fort.

Vu le faible taux de saturation des cartes des 2 parents (environ 40 %), il est difficile de définir si le fait d'avoir des effets opposés chez le même parent pour un même caractère correspond à des caractères gouvernés par plusieurs gènes ou aux différents allèles du gène correspondant. Par ailleurs, il est difficile d'interpréter l'association de caractères différents au niveau d'un même QTL (colocalisation de QTLs) et de déterminer si ce sont des relations de causalité, ou de pléiotropie directe ou indirecte (où le QTL aurait un effet indépendant sur différents caractères).

Ce travail constitue à notre connaissance la première étude concernant la recherche de marqueurs associés aux variations de caractères histologiques de tiges chez une espèce autotétraploïde. Il existe des travaux (Sasahara et al., 1999) liés à la détection de QTLs impliqués dans le contrôle du nombre de faisceaux cribro vasculaires dans le pédoncule et dans l'axe primaire de l'inflorescence chez le riz (*Oryza sativa*). Notre étude constitue le deuxième travail pour la recherche de QTLs chez la luzerne tétraploïde. En effet, Brouwer et al. (2000) ont réalisé la première recherche de QTL pour la résistance au froid chez la luzerne autotétraploïde sur deux populations de type backcross (à partir d'une population  $F_1$  rétrocroisée avec chacun des parents). Dans notre étude, l'évaluation d'une

année supplémentaire et la saturation des cartes permettront d'apporter des informations complémentaires plus précises et d'éclaircir la nature des liaisons entre les caractères morphologiques, histologiques et biochimiques des tiges de luzerne. La disponibilité d'un logiciel permettant de faire de l'Interval Mapping sur les espèces autotétraploïdes permettra de localiser précisément les QTLs sur les cartes.

**DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



## DISCUSSION GENERALE

La démarche suivie tout au long de ce travail de thèse a permis d'apporter des éléments de réponse pour déterminer les bases génétiques des caractères morphologiques, histologiques et biochimiques des tiges de luzerne. Pour cela nous avons répondu à plusieurs questions : (i) comment évoluent les caractères histologiques et biochimiques le long des tiges de luzerne (de l'apex vers le bas des tiges), (ii) existe-t-il de la variabilité génétique pour les caractères morphologiques et histologiques, (iii) quelles sont les relations entre ces caractères et quelles sont les zones du génome qui sont impliquées dans les variations de ces caractères?

### 1. Morphologie des tiges, relations avec l'évolution des caractères histologiques

L'analyse morphologique des tiges issues de deux génotypes contrastés en digestibilité a mis en évidence que la zone d'élongation des tiges est caractérisée par une augmentation rapide de la longueur des 4 premiers entre-nœuds depuis l'apex. La longueur maximale du quatrième entre-nœud est d'environ 10 cm pour les deux génotypes. La longueur de la zone d'élongation est d'environ 10 cm comme l'avait mis en évidence Vallet (1997) sur deux variétés de luzerne. La croissance en longueur correspond à de la croissance primaire (initiée par le fonctionnement des méristèmes primaires). En même temps le diamètre des 4 premiers entre-nœuds augmente rapidement due à la croissance primaire en haut des tiges. Au-delà des 4 premiers entre-nœuds, le cambium devient actif et met en place des tissus secondaires (xylème et phloème). L'augmentation de diamètre est alors plus lente. L'augmentation de diamètre est accompagnée par une augmentation des quantités de matière sèche, ce qui correspond au dépôt de parois au niveau des nouvelles assises cellulaires. Ceci a été mis en évidence par l'augmentation des teneurs en NDF depuis l'apex vers le bas des tiges mais également par l'augmentation de la densité surfacique de parois lignifiées dans le xylème. On note également que l'augmentation des teneurs en NDF est liée à une augmentation de la proportion de xylème depuis l'apex vers le bas des tiges au dépend du parenchyme médullaire.

D'autre part nous avons mis en évidence qu'il existe de la variabilité pour pratiquement tous les caractères due à la position verticale sur la tige. La hauteur a donc été systématiquement prise en covariable dans l'étude de la diversité génétique. Les caractères évoluent de la même façon le long de la tige quel que soit le génotype. Il serait donc possible d'établir des lois générales d'évolution de ces caractères le long des tiges de luzerne à condition d'élargir la gamme de variation et d'augmenter le nombre de génotypes dans l'échantillon. Un modèle global de mise en place des structures histologiques et explicatif de la digestibilité des tiges pourra être couplé à des modèles, développés par les écophysiologistes, de croissance en longueur et en épaisseur des tiges.

## 2. Etude la variabilité génétique pour les caractères histologiques et biochimiques

Chez la luzerne, la variabilité intra cultivar est égale voire supérieure à la variabilité inter cultivars. Ceci a été montré pour des caractères liés à la qualité du fourrage (Julier et al., 2000) mais également pour des caractères liés au rendement en graines et ses caractères associés (Bolaños-Aguilar et al., 2001). C'est pourquoi dans l'étude de la diversité génétique inter cultivars pour les caractères histologiques et morphologiques, il a été également nécessaire d'évaluer la variabilité à l'intérieur des cultivars. L'analyse des 2 dispositifs (essai inter et intra cultivar) a mis en évidence pour tous les caractères mesurés des gammes de variation à l'intérieur des cultivars supérieures aux gammes de variation entre cultivars. L'analyse de variance montre des différences significatives entre cultivars uniquement pour la surface moyenne des lumières des vaisseaux et des fibres du xylème et des différences significatives entre génotypes à l'intérieur des cultivars pour tous les caractères histologiques excepté pour la proportion de xylème chez un cultivar. Les analyses de covariance avec la hauteur en covariable ont montré que la hauteur avait un effet significatif sur certains caractères (proportion de xylème et de parenchyme médullaire, densité surfacique des parois du xylème, surface moyenne de la lumière des fibres et des vaisseaux du xylème) mais les différences entre génotypes à l'intérieur des cultivars restent significatives. La hauteur des tiges n'est donc pas uniquement responsable des variations observées, ce qui confirme que les différences observées sont d'ordre génétique.

De la variabilité génétique a été mise en évidence également dans la population  $F_1$  de cartographie. Elle est significative pour tous les caractères mesurés y compris la solubilité enzymatique des tiges, et les gammes de variation sont encore plus importantes que dans le dispositif intra cultivar. Ceci a permis de calculer l'héritabilité au sens large des caractères mesurés. Les valeurs d'héritabilité sont celles trouvées habituellement dans la littérature pour la hauteur (0,37), et le rapport feuilles/tiges (0,13). Les valeurs d'héritabilité les plus élevées sont trouvées pour la solubilité enzymatique des tiges (0,32), la hauteur (0,37), la proportion de xylème (0,22), la densité surfacique des parois (0,22), et la proportion de parenchyme médullaire (0,23). Ces valeurs d'héritabilité relativement faibles sont dues aux variances d'erreur importantes pour tous les caractères mesurés, ce qui peut être lié à un problème d'échantillonnage des tiges de chaque génotype étant donné qu'une seule tige a été prélevée par génotype. Jewett et Barnes (1994) ont montré dans un dispositif comprenant 20 cultivars que l'héritabilité du nombre de faisceaux cribro vasculaires, le rapport entre le parenchyme médullaire et le diamètre des tiges, et les proportions de tissus lignifiés avaient une hérédité de type additif.

### 3. Relations entre caractères morphologiques, histologiques et biochimiques

Sur l'ensemble des dispositifs de cette thèse, l'étude des corrélations a montré que la croissance en hauteur est associée à une augmentation en diamètre due à la mise en place de nouvelles assises cellulaires dans le xylème secondaire par le cambium.

Plus les tiges sont hautes et plus le rapport feuilles/tiges diminue du fait de l'accroissement de la taille des entre-nœuds (Lemaire et Allirand, 1993). Cette relation est confirmée au niveau génétique. D'après la littérature, on peut conclure que le nombre de faisceaux cribro vasculaires composant la tige devrait augmenter avec le nombre de feuilles. Il serait intéressant de quantifier le nombre de faisceaux cribro vasculaires et d'observer la relation avec le rapport feuilles/tiges. D'ailleurs Shenk et Elliott (1971) avaient observé un nombre de faisceaux plus important chez les génotypes de meilleure digestibilité *in vitro* mesurée sur plante entière. Ils mettaient en relation le nombre de faisceaux vasculaires et le rapport feuilles/tiges. En effet, une meilleure digestibilité de la plante entière est observée pour les génotypes ayant des rapports feuilles/tiges plus importants. L'augmentation du rapport feuilles/tiges requiert alors plus de support vasculaire assurés par des tissus dont les parois se lignifient. Cependant, on ne connaît pas la relation au niveau génétique entre le nombre de faisceaux et la digestibilité des tiges, mais on peut prévoir que cette relation soit négative.

Les corrélations génétiques entre la solubilité enzymatique des tiges et la proportion de xylème sont négatives et la proportion de xylème est corrélée positivement avec la densité surfacique et l'épaisseur des parois du xylème (chapitre III.3). Cependant l'étude des corrélations dans le dispositif intra cultivar (étude de la variabilité génétique : partie 2 du chapitre 3) montrait qu'il n'y avait pas de corrélations significatives entre la proportion de xylème et la densité surfacique et l'épaisseur des parois lignifiées du xylème. Une voie pour augmenter la digestibilité consisterait donc à réduire la proportion de xylème dans les tiges et à augmenter la proportion des tissus non lignifiés (parenchyme cortical et parenchyme médullaire) qui seraient rapidement dégradés. Ce qui est tout à fait possible vu la corrélation négative entre les proportions de ces deux types de tissus. La solubilité enzymatique des tiges est corrélée négativement au niveau génétique avec la densité surfacique et l'épaisseur des parois du xylème (dans la population de cartographie, chapitre III.3). Les parois cellulaires du xylème secondaire s'épaississent avec la croissance et se lignifient fortement, ce qui contribue à diminuer la digestibilité des tiges. Par ailleurs, dans les zones matures des tiges, des parois secondaires épaisses qui se lignifient sont déposées et jouent un rôle important dans la rigidité des tiges grâce à leur capacité de résister à des tensions et des forces compressives. La réduction de la proportion de xylème pourrait entraîner également une diminution de la densité surfacique et de l'épaisseur des parois avec un risque de diminuer la rigidité des tiges et d'entraîner des phénomènes de verse. Il faudra donc trouver un



compromis entre digestibilité du fourrage et rigidité de la tige (en relation avec la résistance à la verse). Toutefois, la corrélation entre la solubilité enzymatique des tiges et l'épaisseur des parois n'est que de -0,49. On peut donc espérer diminuer la proportion de xylème dans les tiges sans trop affecter l'épaisseur des parois. Par ailleurs, les fibres supraphloémiennes et les fibres du phloème participent également au support mécanique des tiges. L'idéotype de luzerne pour obtenir des géotypes de bonne digestibilité aurait des tiges ayant des proportions de parenchyme médullaire et de parenchyme cortical élevées, et une proportion de xylème faible. Cependant, la sélection pour une proportion de xylème faible dans la tige n'est pas réellement envisageable en routine. La méthodologie de l'analyse d'images serait lourde à gérer dans le cadre d'un programme de sélection comprenant un grand nombre d'échantillons.

Le diamètre est corrélé négativement à la proportion d'écorce et positivement à la proportion de parenchyme médullaire (au sein de la population  $F_1$ ) qui sont les 2 tissus les plus dégradables dans la tige de luzerne. Les corrélations entre le diamètre des tiges et la solubilité enzymatique, et entre le diamètre et la proportion de xylème dans la tige sont faibles. Ceci remet complètement en cause l'idée que des tiges fines seraient plus digestibles et n'implique pas de sélectionner sur le diamètre des tiges pour améliorer la digestibilité. Les tiges de gros diamètre sont plutôt digestibles parce qu'elles contiennent une plus grande proportion de tissus facilement dégradés. Cependant, des tiges de gros diamètre pourraient être problématiques pour l'ingestibilité du foin par les petits ruminants.

L'étude de la surface moyenne des lumières des vaisseaux et des fibres du xylème montre qu'il n'y a pas de relation entre ces caractères et la qualité des tiges de luzerne. On aurait pu s'attendre à une relation positive entre la surface moyenne de la lumière des fibres et des vaisseaux et la solubilité enzymatique. En effet, d'après la littérature (Wilson, 1993), pour les cellules à parois épaisses (dans le xylème) les bactéries ont accès à la paroi uniquement du côté de la lumière cellulaire, réduisant ainsi la surface d'attaque et la mobilité des microorganismes dans ces cellules, et par conséquent la dégradation. Si la surface des lumières cellulaires est augmentée, on peut s'attendre à ce que l'accessibilité à la paroi soit plus importante. Cependant, on trouve une relation positive entre la surface moyenne de la lumière des vaisseaux et l'épaisseur des parois du xylème.

#### 4. Recherche de marqueurs associés aux caractères morphologiques, histologiques et à la solubilité enzymatique des tiges

La présence de variabilité génétique dans la population  $F_1$  de cartographie a permis la recherche de marqueurs associés à la variation des caractères morphologiques, histologiques et à la solubilité enzymatique des tiges. Cette recherche de marqueurs associés est à notre connaissance la

deuxième étude de ce type chez la luzerne autotétraploïde après celle de Brouwer et al. (2000) sur la résistance au froid, cependant c'est la première étude de recherche de marqueurs associés à la variation de structures histologiques de tige.

Une variabilité génétique importante a été mise en évidence au sein de la population de cartographie pour tous les caractères mesurés, ainsi que des phénomènes de transgressions importants.

Au sein de chacun des parents, on note la présence de marqueurs à effets opposés pour la plupart des caractères mesurés. Ceci met en évidence qu'il existe chez un même parent des allèles favorables et défavorables pour un même caractère.

Selon les caractères, on a pu expliquer de 6,5 % à 40 % des variations phénotypiques. Seuls ont été identifiés des marqueurs ayant individuellement des effets faibles sauf un marqueur qui explique à lui seul 17 % de la variation de la hauteur des tiges, et un autre qui explique 11 % de la variation de la surface moyenne des fibres du xylème.

Sur les cartes des 2 parents, on trouve un certain nombre de colocalisations entre marqueurs impliqués dans différents caractères. En effet, la hauteur des tiges colocalise avec le rapport feuilles/tiges avec des effets opposés chez les 2 parents. De même l'augmentation de hauteur et la diminution de la solubilité enzymatique sont associés à une diminution de la proportion de parenchyme médullaire et à une augmentation de la proportion de xylème sur un même groupe de liaison chez un des 2 parents. Ces relations entre caractères sont retrouvées au niveau des corrélations génétiques. Nous avons mis en évidence une corrélation génétique positive entre le diamètre et la hauteur des tiges, cependant nous n'avons pas trouvé de colocalisation sur les cartes entre ces 2 caractères. Ceci n'est pas surprenant, car seul marqueur du parent Mercedes, est associé à la variation du diamètre des tiges et ce marqueur est sur un groupe de liaison qui n'est pas entièrement reconstitué. De plus ce marqueur explique seulement 8 % de la variation observée. Alors que l'on a trouvé une corrélation génétique négative entre la solubilité enzymatique des tiges et la proportion de xylème, et on ne trouve pas de colocalisation entre ces deux caractères sur les cartes. Sur les cartes des deux parents, on retrouve des colocalisations entre les marqueurs associés la solubilité enzymatique des tiges et l'épaisseur des parois avec des effets opposés.

Le fait que les cartes ne soient pas saturées limite fortement la recherche de marqueurs et leur interprétation. Les quelques colocalisations trouvées sont en accord avec les corrélations génétiques établies au sein de la population de cartographie. Cependant certains marqueurs ne colocalisent avec aucun autre alors que des corrélations génétiques élevées avaient été calculées. Ce

travail a montré que l'approche QTL est réalisable et cohérente chez une espèce tétraploïde allogame. Le développement d'un logiciel adapté spécifique aux espèces autotétraploïdes permettra de positionner plus précisément les QTLs sur les cartes.

## PERSPECTIVES

La suite des travaux consiste tout d'abord à saturer les cartes génétiques et à poursuivre la recherche de QTLs. Ce travail ouvre des perspectives pour permettre d'améliorer la digestibilité de la luzerne mais également pour comprendre le déterminisme génétique des caractères histologiques, morphologiques et de la solubilité enzymatique des tiges.

Les QTLs sont utiles dans la détection de gènes ou d'allèles à effets forts et dans l'introgession des gènes à effets favorables. Dans les schémas de sélection classique, l'information recueillie sur différents types de marqueurs liés à des QTLs peut permettre de réduire le temps et les moyens nécessaires à un gain génétique. Il serait ainsi possible en utilisant la sélection assistée par marqueurs de réduire le nombre d'individus à évaluer en sélection classique. Cependant chez les espèces autotétraploïdes allogames, la sélection assistée par marqueurs peut poser des problèmes. En effet, il est difficile voire impossible de fixer des QTLs favorables pour un caractère donné. La fixation d'un caractère implique l'homozygotie qui entraîne chez ces espèces des dépressions de consanguinité. Cependant, après avoir identifié des géniteurs portant les allèles favorables pour les caractères d'intérêt recherchés, on pourrait essayer d'imaginer de fixer les QTLs chez les parents en réalisant quelques autofécondations en veillant à éliminer tous les génotypes montrant une dépression de consanguinité ou de croiser les plantes portant les allèles favorables au caractère d'intérêt pour augmenter la fréquence allélique dans la descendance. On peut ainsi espérer s'approcher d'un caractère fixé dans une population synthétique. Il serait intéressant d'évaluer différentes voies d'utilisation de la sélection assistée par marqueurs pour la création de variétés synthétiques. Il faudrait tout d'abord valider les QTLs obtenus à partir du croisement entre Magali et Mercedes dans un autre fonds génétique et transformer les marqueurs dominants en marqueurs codominants portables. L'utilisation de marqueurs codominants permettrait également d'éliminer rapidement les génotypes qui portent des allèles défavorables pour le caractère d'intérêt. La sélection assistée par marqueurs aura autant d'intérêt que les caractères étudiés ont des héritabilités faibles (Moreau, 1998), ce qui est le cas de la plupart des caractères étudiés chez la luzerne. En effet, lorsque l'héritabilité est forte, le phénotype est un très bon prédicteur et les marqueurs apportent peu d'information supplémentaire.

Nous avons mis en évidence que la digestibilité pourrait être améliorée par une diminution de la proportion de xylème, et une augmentation des proportions des tissus non lignifiés, mais que ces caractères étaient difficilement mesurables en routine. Des marqueurs associés à ces caractères ont été identifiés, et l'utilisation de la sélection assistée par marqueur est envisageable pour ce genre de caractères.

Ce travail ne constitue une première étape de recherche de marqueurs associés aux caractères mesurés et la saturation des deux cartes permettra d'apporter des informations complémentaires sur les colocalisations qui ont été mises en évidence. Les connaissances acquises sur *Medicago truncatula*, espèce modèle des légumineuses, permettront d'accélérer la recherche de gènes candidats notamment en ce qui concerne les gènes impliqués dans la mise en place des tissus vasculaires des tiges et dans la voie de biosynthèse des lignines. Une carte de *Medicago truncatula* a été obtenue sur une population F<sub>2</sub> en ségrégation (Thoquet et al., 2002). Cette carte couvre 1225 cM et comprend 289 marqueurs répartis sur tout le génome, incluant des marqueurs RAPD, AFLP, des gènes connus et des isoenzymes formant 8 groupes de liaison, ce qui correspond au nombre chromosomique de base de l'espèce. En cartographiant un certain nombre de marqueurs communs avec la luzerne diploïde, les 8 groupes de liaisons sont apparus homologues entre les deux espèces. On peut espérer pouvoir aligner la carte de *Medicago truncatula* et de la luzerne tétraploïde grâce aux marqueurs codominants microsatellites, constituant des ponts ou marqueurs ancres. Si les cartes s'alignent correctement, il serait alors possible de localiser les QTL de *M. sativa* sur la carte de *M. truncatula* et de rechercher les séquences correspondant aux gènes situés à proximité du QTL grâce au criblage de banques BAC. La démarche consisterait dans un premier temps à faire de la cartographie fine dans la région du QTL chez *Medicago truncatula* de façon à réduire la zone encadrant le QTL avant d'aller rechercher les séquences. On peut aussi envisager que la recherche de QTLs se fasse directement sur *Medicago truncatula*, mais on ne sait pas si la variation observée chez l'espèce modèle a exactement la même base génétique que sur l'espèce d'intérêt. Une validation des QTLs sur *M. sativa* serait indispensable.

Une autre approche consisterait à rechercher des gènes d'*Arabidopsis thaliana* ou *Zinnia elegans* connus impliqués dans la différenciation des tissus vasculaires (xylème), l'élongation des tiges, les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des lignines, protéines liées aux parois, et à les cartographier chez *Medicago sativa*. S'il y a du polymorphisme dans la population et si les gènes colocalisent avec le QTL, ils pourraient expliquer en partie le QTL.

## CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les caractères histologiques des tiges de luzerne et leur évolution le long de la tige (depuis l'apex vers le bas des tiges). Nous avons mis en évidence qu'il existe de la variabilité génétique pour les caractères au sein de cultivars, et qu'elle est supérieure à la variabilité entre cultivars. La mise en évidence d'une variabilité génétique importante pour tous les caractères mesurés dans une descendance  $F_1$  issue du croisement contrôlé entre 2 plantes issues de 2 variétés différentes a permis d'engager une première étape de recherche de marqueurs associés à la variation de ces caractères et d'apporter d'autres connaissances sur leur déterminisme génétique. Cette thèse a été également l'occasion d'acquérir des connaissances sur les relations entre les structures histologiques des tiges de luzerne et leur qualité. Elle a montré que le xylème joue un rôle primordial dans la digestibilité des tiges, tant au niveau de ses proportions dans la tige qu'au niveau des éléments qui le constitue. En effet l'épaisseur des parois du xylème semble être également impliquée dans la digestibilité des tiges puisqu'elle diminue la digestibilité. Ce travail a mis en évidence qu'il serait possible de sélectionner des luzernes de meilleure qualité en retenant comme critère de sélection des caractères liés à la structure histologique des tiges. Cependant, comme ces caractères sont difficilement mesurables en routine, l'utilisation de la sélection assistée par marqueurs serait une voie possible pour améliorer la digestibilité des tiges. Cette première étape de recherche de marqueurs associés a montré qu'il était possible d'associer des zones du génome à la variation de caractères histologiques chez la luzerne autotétraploïde.

Ce travail de thèse doit son originalité essentiellement à la quantification des caractères histologiques par analyse d'images le long des tiges de luzerne et à la recherche de marqueurs associés à ces caractères chez une espèce autotétraploïde.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





- Agreste, Chiffres et Données, 2001.** Statistique agricole annuelle. Résultats provisoires 2000. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, N°130.
- Akin, D.E., 1979.** Microscopic evaluation of forage digestion by microorganisms. A review. *Journal of Animal Science*, 48 : 701-710.
- Akin, D.E., 1980.** Evaluation by electron microscopy and anaerobic culture of types of rumen bacteria associated with digestion of forage cell walls. *Appl. Environment Microbiology*, 39 : 242-252.
- Akin, D. E., 1982.** Section to slide technique for study of forage anatomy and digestion. *Crop Science*, 22 : 444-446.
- Akin, D. E, et E. L. Robinson, 1982.** Structure of leaves and stems of arrowleaf and Crimson clovers as related to *in vitro* digestibility. *Crop Science*, 22 : 24-29.
- Akin, D. E, R. H. Brown, et L. L. Rigsby, 2001.** Digestion of stem tissues in *Panicum* species. *Crop Science*, 24 : 769-773.
- Albrecht, K. A., W. F. Wedin, et D. R. Buxton, 1987.** Cell wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop Science*, 27 : 735-741.
- Allirand, J. M., 1998.** Modélisation morphologique de la croissance de la luzerne (*Medicago sativa* L.) en fonction de la température. Thèse, Université Paris-Sud, 97p.
- Aloni, R., 1987.** Differentiation of vascular tissues. *Annual Review of Plant Physiology*, 38 : 179-204.
- Altamura, M. M., M. Possenti, A. Matteucci, S. Baima, I. Ruberti, et G. Morelli, 2001.** Development of the vascular system in the inflorescence stem of *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 151 : 381-389.
- Aufrère, J., 1982.** Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Annales de Zootechnie*, 31 (2) : 111-130.
- Baucher, M., B. Monties, M. Van Montagu, et W. Boerjan, 1998.** Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17 : 125-197.
- Bell, A. D., 1993.** Les plantes à fleurs, guide morphologique illustré. Masson eds., Paris, 341p.
- Berleth, T., J. Mattsson, et C. S. Hardtke, 2000.** Vascular continuity and auxin signals. *Trends in Plant Science*, 5 : 387-393.
- Besle, J. M., A. Cornu, et J.-P. Jouany, 1994.** Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64 : 171-190.
- Bestajovsky, J., et W. Kühbauch, 1985.** Schätzung der verdaulichkeit von luzernestengeln über lignin mit hilfe der quantitativen bildanalyse. *Z. Acker- und Pflanzenbau*, 154 : 112-119.
- Bolaños-Aguilar, E.D., Huyghe,C.; Djukic,D.; Julier,B.; Ecalle,C. 2001.** Genetic control of alfalfa seed yield and its components. *Plant Breeding*, 120 : 67-72.
- Boudet, A. M., D. P. Goffner, et J. Grima-Pettenati, 1996.** Lignins and lignification: recent biochemical and biotechnological developments. *C.R. Acad.Sci.Paris, Sciences de la vie, Biologie et Pathologie*, 319 : 317-331.
- Boudet, A. M., 1998.** A new view of lignification. *Trends in Plant Science*, 3 : 67-71.
- Boudet, A. M., 2000.** Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 : 1-16.
- Bradshaw, J.E., C; Hackett, R.C. Meyer, D. Milbourne, J.W. McNicol, C. Phillips, et R.**

- Wagh, 1998.** Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 : 202-210.
- Broderick, G. A., et D. R. Buxton, 1991.** Genetic variation in alfalfa for ruminal protein degradability. *Canadian Journal in Plant Science*, 71 : 755-760.
- Brouwer, D.J., S.H. Duke, et T.C. Osborn, 2000.** Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth, and freezing injury in autotetraploid alfalfa. *Crop Science*, 40 : 1387-1398.
- Busse, J.S., et R.F. Evert, 1999.** Vascular differentiation and transition in seedling of *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Science*, 160 : 241-251.
- Buxton, D. R., J. S. Hornstein, W. F. Wedin, et G. C. Marten, 1985.** Forage quality in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil, and red clover. *Crop Science*, 25 : 273-279.
- Buxton, D. R., 1986.** Improve nutritive value of alfalfa by selecting for improved stem quality. Report of the thirtieth North American Alfalfa Improvement Conference, July 27-31, University of Minnesota, St Paul, Minnesota, 54.
- Buxton, D. R., J. S. Hornstein, et G. C. Marten, 1987.** Genetic variation for forage quality of alfalfa stems. *Canadian Journal in Plant Science*, 67 : 1057-1067.
- Buxton, D. R., et J. R. Russell, 1988.** Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Science*, 28 : 553-558.
- Buxton, D. R., et M. R. Brasche, 1991.** Digestibility of structural carbohydrates in cool-season grass and legume forages. *Crop Science*, 31 : 1338-1345.
- Bowes, B.G., 1998.** Atlas en couleur. Structure des plantes. INRA, 192p.
- Brett, C., et K. Waldron, 1985.** Physiology and biochemistry of plant cell walls. Dans *Topics in plant functional biology: 1*. Second edition, Chapman & Hall, 247p.
- Calvin, C.L., 1967.** The vascular tissues and development of sclerenchyma in the stem of the mistletoe, *Phoradendron flavescens*. *Botanical Gazette*, 128 : 35-59.
- Caño-Delgado, A. I., K. Metzlauff, et W. Bevan, 2000.** The eli-1 mutation reveals a link between cell wall expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 127 : 3395-3405.
- Carland, F. M., B. L. Berg, J. N. FitzGerald, S. Jinamornphongs, T. Nelson, et B. Keith, 1999.** Genetic regulation of vascular tissue patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 11 : 2123-2137.
- Carpita, N. C., et D. M. Gibeaut, 1993.** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3 : 1-30.
- Casler, M.D., 2000.** Correlated responses in forage yield and nutritional value from phenotypic recurrent selection for reduced fiber concentration in smooth brome grass. *Theoretical and Applied Genetics*, 99 : 1245-1254.
- Casler, M. D., 2001.** Breeding forage crops for increased nutritional value. *Advances in Agronomy*, 71 : 51-107.
- Charcosset, A., 1996.** L'identification de locus affectant des caractères quantitatifs (QTL) à l'aide de marqueurs génétiques est-elle justifiée pour la sélection? *Le Sélectionneur Français*, 46 : 35-45.

- Cheng, K.J., C.S. Stewart, D. Dinsdale, et J.W. Costerton**, 1983. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and Technology*, 10 : 93-120.
- Chesson, A., C.S. Stewart, K. Dalgarno, et T.P. King**, 1986. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell walls in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. *Journal of Applied Bacteriology*, 60 : 327-336.
- Chesson, A., et C.W. Forsberg**, 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Dans P.N. Hobson (ed.) *The rumen microbial system*. Elsevier Appl. Sci., London, p 251-283.
- Churchill, G.A., et R.W. Doerge**, 1994. empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138 : 963-971.
- Collett, C. E., N. P. Harberd, et O. Leyser**, 2000. Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *Plant Physiology*, 124 : 553-561.
- Coors, J. G., C. C. Lowe, et R. P. Murphy**, 1986. Selection for improved nutritional quality of alfalfa forage. *Crop Science*, 26 : 843-848.
- Dean, J.F.D., et K.-E.L. Eriksson**, 1992. Laccase and deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung*, 48: 21-33.
- Demarquilly, C.**, 1966. Valeur alimentaire de la luzerne. *Fourrages*, 21 : 12-33.
- De Vienne, D.**, 1995. Etablissement de cartes de liaisons génétique. Dans : Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. De Vienne, D., INRA, 49-79.
- Deyholos, M. K., G. Corder, D. Beebe, et L. E. Sieburth**, 2000. The SCARFACE gene is required for cotyledon and leaf vein patterning. *Development*, 127 : 3205-3213.
- Dharmawardhana, D. P., B. E. Ellis, et J. E. Carlson**, 1992. Characterization of vascular lignification in *Arabidopsis thaliana*. *Canadian Journal of Botany*, 70 : 2238-2244.
- Dolan, L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poething, K. Roberts, et B. Scheres**, 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119 : 71-84.
- Dolan, L., et K. Roberts**, 1995. Secondary thickening in roots of *Arabidopsis thaliana* anatomy and cell surface changes. *New Phytologist*, 131 : 121-128.
- Drapala, W.J., L.C. Raymond, et E.W. Crampton**, 1947. Pasture studies. XXVII. The effect of maturity of the plant and its lignification and subsequent digestibility by animals as indicated by methods of plant histology. *Sci. Agric.*, 27 : 36-41.
- Duru, M., et A. Langlet**, 1988. Indice foliaire, structure du peuplement de tiges et biomasse des repousses d'une luzerne irriguée. *Agronomie*, 8 : 603-611.
- Emile, J. C., M. Mauriès, G. Allard, et P. Guy**, 1997. Genetic variation in the feeding value of alfalfa genotypes evaluated from experiments with dairy cows. *Agronomie*, 17 : 119-125.
- Engels, F. M.**, 1996. Developments in application of light and scanning electron microscopy techniques for cell wall degradation studies. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 44 : 357-373.
- Engels, F. M., et H. G. Jung**, 1998. Alfalfa stem tissues: cell-wall development and lignification. *Annals of Botany*, 82 : 561-568.
- Esau, K.**, 1965. *Plant Anatomy*. Wiley, J. & Sons eds., New York, Second Edition, 767 p.
- Evans, P.S.**, 1965. Intercalary growth in the aerial shoot of *Eleocharia acuta*. *R. Br. Prod. Ann. Bot.*, 29 : 205-217.

- Fick, G. W., et C. G. Janson, 1990.** Testing mean stage as a predictor of alfalfa forage quality with growth chamber trials. *Crop Science*, 30 : 678-682.
- Fick, G.W., 1984.** Simple simulation models for yield prediction applied to alfalfa in the Northeast. *Agronomy Journal*, 16 : 235-239.
- Fisher, D.S., J.C. Burns, et K.R. Pond, 1989.** Kinetics of *in vitro* cell-wall disappearance and *in vivo* digestibility. *Agronomy Journal*, 81 : 25-33.
- Foord, K.E., 1985.** Physiological, environmental, and genetic determinants of seedling growth in *Medicago sativa* L. PhD Dissertation, University of California, Davis.
- Fosket, D. E., 1970.** The time course of xylem differentiation and its relation to DNA synthesis in cultured *Coleus* stem segments. *Plant Physiology*, 46 : 64-68.
- Fukazawa, K., et H Imagawa, 1981.** Quantitative analysis of lignin using an UV microscopic image analyser. Variation within one growth increment. *Wood Science Technology*, 15 : 45-55.
- Fukuda, H., et A. Komamine, 1980.** Establishment of an experimental system for the tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology*, 65 : 57-60.
- Fukuda, H., 1997.** Tracheary element differentiation. *The Plant Cell*, 9 : 1147-1156.
- Gallais, A., 1990.** Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Paris, Milan, Barcelone, Mexico, Masson, 588 p.
- Génier, G., Guy, P., and Prosperi, J. M., 1992.** Les luzernes. *Dans* : Amélioration des espèces végétales cultivées, Gallais, A. et H. Bannerot eds. , Paris, INRA, 323-348.
- Goering, H. K., et P. J. Van Soest, 1970.** Forage fiber analysis. *USDAA Agric.handbook*, 379 : 1-20.
- Gosse, G., M. Chartier, et G. Lemaire, 1984.** Mise au point d'un modèle de production pour une culture de luzerne. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 298 : 541-544.
- Gosse, G., G. Lemaire, M. Chartier, et F. Balfourier, 1988.** Structure of a lucerne population (*Medicago sativa* L.) and dynamics of stem competition for light during regrowth. *Journal of Applied Ecology*, 25 : 609-617.
- Greenwood, D. J., G. Lemaire, G. Gosse, P. Cruz, A. Draycott, et J. J. Neeteson, 1990.** Decline in percentage N of C3 and C4 crops with increasing plant mass. *Annals of Botany*, 66 : 425-436.
- Grenet, E., 1997.** Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen. *INRA Production Animale*, 10 : 241-249.
- Grima-Pettenati, J., et D. Goffner, 1999.** Lignin genetic engineering revisited. *Plant Science*, 145 : 51-65.
- Groover, A., et A. M. Jones, 1999.** Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology*, 119 : 375-384.
- Grove, A. R. et J.E., Carlson, 1972.** Morphology and Anatomy. *Dans* : Alfalfa Science and Technology, Hanson, C. H. eds., 103-122.
- Guines, F., B. Julier, C. Ecalle, et C. Huyghe, 2002.** Genetic control of quality traits of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 53 : 401-407..
- Gunn, C. R., W. H. Skrdla, et H. C. Spencer, 1978.** Classification of *Medicago sativa* L. using legume characters and flower colors.

US.Department of Agriculture, Agricultural Research Serv., Technical Bulletin, 1574.

**Hackett,C.A., J.E. Bradshaw, R.C. Meyer, J.W. McNicoll, D. Milbourne, et R. Waugh,** 1998. Linkage analysis in tetraploid species: a simulation study. *Genetic Research*, Cambridge, 71 : 143-154.

**Hackett,C.A., J.E. Bradshaw, et J.W. McNicoll,** 2001. Interval mapping of quantitative trait loci in autotetraploid species. *Genetics*, 159 : 1819-1832.

**Harris, P.J.,** 1990. Plant cell wall structure and development. *Dans* D.E. Akin (eds.). *Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants*. Elsevier Sci. Publ. Co., New York, p. 71-90.

**Hastert, A.A., C.E. Owensby, et L.H. Harbers,** 1983. Rumen microbial degradation of Indiangrass and big bluestem leaf blades. *Journal of Anima Science*, 57 : 1626-1636.

**Hatfield, R.D.,** 1989. Structural polysaccharides of forages and their degradability. *Agronomy Journal*, 81 : 39-46.

**Hatfield, R.D., H.J.G. Jung, J. Ralph, D.R. Buxton, et P.J. Weimer,** 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the klason lignin and acid detergent lignin procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65 : 51-58.

**Hayward, H. E.,** 1938. Leguminosae, *Medicago sativa*. *Dans* : The structure of economic plants, Macmilan Publishing Co eds., New York, 309-338.

**Heinrichs, D. H., et J. E. Troelsen,** 1965. Variability of chemical constituents in an alfalfa population. *Canadian Journal in Plant Science*, 45 : 405-412.

**Heinrichs, D. H., J. E. Troelsen, et F. G. Warder,** 1969. Variation of chemical constituents and morphology characters within

and between alfalfa populations. *Canadian Journal in Plant Science*, 49 : 293-305.

**Hill, R. R., et R. F. Barnes,** 1977. Genetic variability for chemical composition of alfalfa. II. Yield and traits associated with digestibility. *Crop Science*, 17 : 948-952.

**Howarth, R.E., W. Majak, D.E. Waldern, S.A. Brandt, A.C. Fesser, B.P. Goplen, et T. Spurr,** 1977. Relationship between ruminant bloat and the chemical composition of alfalfa herbage : nitrogen and protein fractions. *Canadian Journal of Animal Science*, 57 : 345-357.

**Jacobs, W. P.,** 1952. The role of auxine in the differentiation of xylem around wound. *American Journal of Botany*, 39 : 301-309.

**Jewett, J. G., et D. K. Barnes,** 1992. Variability for stem anatomy among entries in the perennial *Medicago* core collection. Report of the thirty third North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC) June 14-18, Atlanta, Georgia, 40.

**Jewett, J. G., et D. K. Barnes,** 1994. Inheritance and potential utility of alfalfa stem anatomy traits. Report of the thirty-fourth North American Alfalfa Improvement Conference, University of Guelph, Ontario, Canada, 134.

**Julier, B., P. Guy, C. Castillo-Acuna, G. Caubel, C. Ecalle, M. Esquibet, V. Furstoss, C. Huyghe, C. Lavaud, A. Porcheron, P. Pacros, et G. Raynal,** 1996. Genetic variation for disease and nematode resistances and forage quality in perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, 91 : 241-250.

**Julier, B., et C. Huyghe,** 1997. Effect of growth and cultivar on alfalfa digestibility in a multi-site trial. *Agronomie*, 17 : 481-489.

**Julier, B., C. Huyghe, et C. Ecalle,** 1999. Genetic variation and variety x environment interaction for digestibility, forage yield and



protein content in alfalfa. Eucarpia Medicago ssp. Group Meeting, Perugia, Italy, 359-364.

**Julier, B., C. Huyghe, et C. Ecalle, 2000.** Within- and among-cultivar genetic variation in alfalfa: forage quality, morphology, and yield. *Crop Science*, 40 : 365-369.

**Julier, B., A. Porcheron, C. Ecalle, et P. Guy, 1995.** Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Agronomie*, 15 : 295-304.

**Julier, B., F. Guines, T. Huguet, C. Hackett, S. Santoni, P. Barre, et C. Huyghe, 2002.** Mapping in autotetraploid alfalfa and identification of QTL of stem morphology and histology. North American Alfalfa Conference, Sacramento, Juillet 2002.

**Jung, H. G et D.A. Deetz, 1993.** Cell wall lignification and degradability. *Dans* : Forage cell wall structure and digestibility, Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, et J. Ralph eds., Madison, WI 53711, USA, ASA-CSSA-SSSA., 315-346.

**Jung, H.G., D.R. Mertens, et A. Payne, 1993.** Correlation of acid detergent and klason lignin in forages with in vitro and in vivo dry matter and neutral detergent fiber digestibility. *Journal of Dairy Science*, 76 (suppl 1) 248.

**Jung, H. G, R. R. Smith, et C. S. Endres, 1994.** Cell wall composition and degradability of stem tissue from lucerne divergently selected for lignin and *in vitro* dry-matter digestibility. *Grass and Forage Science*, 49 : 295-304.

**Jung, H. G., D. R. Mertens, et A. J. Payne, 1997.** Correlation of acid detergent lignin and klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. *Journal of Dairy Science*, 80 : 1622-1628.

**Jung, H.G., et F.M. Engels, 2002.** Alfalfa stem tissues : cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Science*, 42 : 524-534.

**Kalu, B. A., et G. W. Fick, 1981.** Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality. *Crop Science*, 21 : 267-271.

**Kalu, B., et G. W. Fick, 1983.** Morphological stage of development as a predictor of alfalfa herbage quality. *Crop Science*, 23 : 1167-1172.

**Kaufman, P.B., S.J. Cassel, et P.A. Adams, 1965.** On nature of intercalary growth and cellular differentiation in internodes of *Avena sativa*. *Botanical Gazette (Chicago)*, 126 : 1-13.

**Kephart, K. D., D. R. Buxton, et R. R. Hill, 1990.** Digestibility and cell wall components of alfalfa following selection for divergent herbage lignin concentration. *Crop Science*, 30 : 207-212.

**Klinkowski, M., 1933.** Lucerne: its ecological position and distribution in the world. Imperial Bureau of Plant Genetics: Herbage Plants, Bulletin 12, Aberysthwyth, Wales.

**Kondo, T., K. Mizuno, et T. Kanto, 1987.** Some characteristics of forage plant lignin. *Jpn Agric Res Quart*, 21 : 47-52.

**Koizumi, K., M. Sugiyama, et H. Fukuda, 2000.** A series of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular network: calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question. *Development*, 217 : 3197-3204.

**Kühbauch, W., et J. Bestajovsky, 1983.** Bestimmung der lignifizierung in luzerne mit hilfe der quantitativen bildanalyse. *Angewandte Botanik*, 57 : 381-389.

**Kühbauch, W., et J. Bestajovsky, 1985.** Determination of lignin concentration and digestibility in stem tissue of alfalfa by means of quantitative image analysis. *Proceedings of the XV IGC*, 825-827.

**Kuriyama, H., et H. Fukuda, 2000.** Regulation of trachey element differentiation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 : 35-51.

- Lawton, J.R., P.J. Harris, K.H. Lowry, et M.S. Dhanoa**, 1979. Apical intrusive growth of fibres from the flowering stem of *Lolium temulentum* L. *New Phytologist*, 82 : 739-745.
- Lemaire, G., P. Cruz, G. Gosse et M. Chartier**, 1985. Etude des relations entre la dynamique de prélèvement d'azote et la dynamique de croissance en matière sèche d'un peuplement de luzerne. *Agronomie*, 5 (8) : 685-692.
- Lemaire, G., et J. M. Allirand**, 1993. Relation entre croissance et qualité de la luzerne : interaction génotype-mode d'exploitation. *Fourrages*, 134 : 183-198.
- Leonards-Schippers C., W. Gieffers, R. Schäfer-Pregl, E. Ritter, S.J. Knapp, F. Salamini, et C. Gebhardt**, 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics*, 137 : 67-77.
- Lenssen, A. W., E. L. Sorensen, G. L. Posler, et L. H. Harbers**, 1991. Basic alfalfa germplasms differ in nutritive content of forage. *Crop Science*, 31 : 293-296.
- Lesins, K. A. et I. Lesins**, 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae). A Taxogenetic study. The Hague, Boston, London., 228 p.
- Lev-Yadun, S.**, 1994. Induction of sclereid differentiation in the pith of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Experimental Botany*, 45 : 1845-1849.
- Lev-Yadun, S., et M. A. Flaishman**, 2001. The effect of submergence on ontogeny of cambium an secondary xylem and on fiber lignification in inflorescence of *Arabidopsis*. *IAWA Journal*, 22 : 159-169.
- Lewis, N.G., et E. Yamamoto**, 1990. Lignin: occurrence, biogenesis, and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41: 455-496.
- Lewis, N.G., L.B. Davin, et S. Sarkanen**, 1999. The nature and function of lignins, dans Sir Darton, H.D.R., Nakaski, K., et Meth-Cohn, O. (eds.), *Comprehensive natural products chemistry*, Pergamon Press, 617-745.
- Lila, M., Y. Barrière et R. Traineau**, 1986. Mise au point et étude d'un test enzymatique de la digestibilité de fourrages pauvres ou riches en amidon. *Agronomie*, 6 (3) : 285-291.
- Littell, R. C., P. R. Henry, et C. B. Ammerman**, 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*, 76 : 1216-1231.
- Little, T.M., et F.J. Hills**, 1978. Subplots as repeated observations. Dans 'Agricultural experimentation. Design and analysis', 125-137.
- Liu S-C., Y-R. Lin, J.E. Irvine, et A.H. Paterson**, 1998. Mapping QTLs in autopolyploids. Dans *Molecular dissection of complex traits*; Patterson, A.H., CRC Press, New York, 95-101.
- Lorieux, M.**, 1993. Cartographie des marqueurs moléculaires et distorsion de ségrégation : modèles mathématiques. Thèse, Université Montpellier II.
- Luo,Z.W., C.A. Hackett, J.E. Bradshaw, J.W. McNicol, et D. Milbourne**, 2001. Construction of a genetic linkage map in tetraploid species using molecular markers. *Genetics*, 157 : 1369-1385.
- Marhadour S.**, 2001. Introgression de la fétuque dans le ray-grass au niveau tétraploïde : approche morphogénétique et apports du marquage moléculaire. Thèse, ENSA Rennes, 126 p.
- Marten, G. C., D. R. Buxton, et R. F. Barnes**, 1988. Feeding value (Forage quality). Dans : *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, Hanson, A. A., D. K. Barnes, et R. R. Hill eds., 463-491.



**Mauriès, M.**, 1994. La luzerne aujourd'hui. France Agricole, 254 p.

**Media Cybernetics**, L.P, Optimas Corporation: version 6.1, eighth edition (1996).

**Meyer, R.C., D. Millbourne, C. Hackett, J.E. Bradshaw, J.W. McNichol, et R. Waugh**, 1998. Linkage analysis in tetraploid potato and association of markers with quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*). Molecular General Genetics, 259 : 150-160.

**Michaud, R., W. F. Lehman, et M.D. Rumbauch**, 1988. World distribution and historical development. Dans : Alfalfa and Alfalfa improvement, Hanson, A. A., D. K. Barnes, et R. R. Hill eds., 25-91.

**Michelmore, R.W., I. Paran, et R.V. Keccell**, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academic of Science of the USA, 88 : 9828-9832.

**Miller, A. R., D. L. Crawford, et L. W Roberts**, 1985. Lignification and xylogenesis in *Lactuca* pith explants cultured *in vitro* in the presence of auxin and cytokinin: a role for endogenous ethylen. Journal of Experimental Botany, 36 : 110-118.

**Monson, W.G., J.G. Powell, et G.W. Burton**, 1972. Digestion of fresh forage in rumen fluid. Agronomy Journal, 64 : 231-233.

**Monties, B.**, 1994. Chemical assessment of lignin biodegradation: some qualitative and quantitative aspects. FEMS Microbiology Review, 13 : 277-284.

**Moreau, L.**, 1998. Contribution méthodologique et expérimentale à l'étude de la sélection assistée par marqueurs. Application au maïs. Thèse, INAPG, 257 p.

**Morrison, T. A., J. R. Kessler, et D. R. Buxton**, 1994. Maize internode elongation patterns. Crop Science, 34 : 1055-1060.

**Mowat, D. N., R. S. Fulkerson, W. E. Tossell, et J. E. Winch**, 1965. The *in vitro* digestibility and protein content of leaf and stem portions of forages. Canadian Journal in Plant Science, 45 : 321-331.

**Musgrave, D.J., et R.H.M. Langer**, 1977. Crown development of two diverse genotypes of luzerne. New Zealand Journal of Agricultural Research, 20 : 453-458.

**Nägeli, C.**, 1858. Beiträge zur Wissenschaftlichen Botanik, Part I, Engelman, Leipzig.

**Neff R, et U. Simon**, 1986. Heritability of protein content and *in vitro* digestibility in *Medicago sativa* L. Eucarpia, *Medicago sativa* group, 12-16 Mai 1986. Bulgaria, Pleven.

**Nultsch, W.**, 1998. Botanique Générale. De Boeck Université eds., Paris, Traduction de la 10ème édition allemande.

**Obert, D.E., D.Z. Skinner, et D.L. Stuteville**, 2000. Association of AFLP markers with downy mildew resistance in autotetraploid alfalfa. Molecular Breeding, 6 : 287-294.

**Onstad, D. W., et G. W. Fick**, 1983. Predicting crude protein, *in vitro* true digestibility, and leaf proportion in alfalfa herbage. Crop Science, 23 : 961-964.

**Ortiz, R., et S.J. Peloquin**, 1992. Association between genetic markers with quantitative traits in potato. Journal of Genetics and Breeding, 46 : 395-400.

**Parvathi, K., F. Cheng, D. Guo, J.W. Blount, et R.A. Dixon**, 2000. Substrate preferences of O-Methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. The Plant Journal, 25 (2) : 193-202.

**PLM, 2001.** Ration et santé. De la luzerne sur toutes les tables. Mai 2001, 8-11.

**Poussot, P., 2001.** Mise au point de méthodes de traitement d'images de coupes histologiques. Application à la segmentation automatique de parois lignifiées sur des sections transversales de feuilles de maïs (*Zea mays* L.). Mémoire d'Ingénieur Conservatoire National des Arts et Métiers, Poitiers, 123 p.

**Quiros, C. F. et G. R. Baughan, 1988.** The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. Dans : *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, Hanson, A. A., D. K. Barnes, et R. R. Hill eds., 93-124.

**Regal, V., 1960.** The evaluation of the quality of pasture grasses by microscopic method. Proc. 8<sup>th</sup> International Grassland Congress, England, 522-524.

**Ripol, M.I., G.A. Churchill, J.A.G. Da Sylva, et M. Sorrells, 1999.** Statistical aspects of genetic mapping in autopolyploids. *Gene*, 235 : 31-41.

**Roberts, L. W, et A. R. Miller, 1982.** Ethylene and xylem differentiation. *What's New in Plant Physiology*, 13 : 13-16.

**Roland, 1980.** Ultrastructure et texture des polysaccharides de la paroi des cellules végétales. Dans *Les polymères végétaux*, Gautier Villars (eds.), 46-55.

**Sachs, T., 1981.** The control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Advances in Botanical Research*, 9 : 151-262.

**Sanderson, M. A., J. S. Hornstein, et W. F. Wedin, 1988.** Cell wall composition of alfalfa stems at similar morphological stage and chronological age during spring growth and summer regrowth. *Crop Science*, 28 : 342-347.

**Sanderson, M. A., et W. F. Wedin, 1989.** Phenological stage and herbage quality

relationship in temperate grasses and legumes. *Agronomy Journal*, 81 : 864-869.

**SAS Institute. 1988.** SAS: STAT user's guide, release 6.03 edition. (SAS Institute Inc.: Cary, NC. USA).

**Sasahara, H., Y. Fukuta, et T. Fukuyama, 1999.** Mapping QTLs for vascular bundle system and spike morphology in rice, *Oryza sativa* L., *Breeding Science*, 49 : 75-81.

**Sato, Y., B. Wuli, R. Sederoff, et R Whetten, 2001.** Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Journal of Plant Research*, 114 : 147-155.

**Scarpella, E., S. Rueb, K. J. M. Boot, J. H. C. Hoge, et A. H. Meijer, 2000.** A role for the rice homeobox gene *Oshox1* in provascular cell fate commitment. *Development*, 127 : 3669.

**Sewalt, V. J. H, W. Ni, H.-J. G. Jung, et R. A. Dixon, 1997.** Lignin impact on fiber degradation; increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco '*Nicotiana tabacum*' stems reduced in lignin content. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45 : 1977-1983.

**Shenk, J. S., et F. C. Elliott, 1970.** Two cycles of directional selection for improved nutritive value of alfalfa. *Crop Science*, 10 : 710-712.

**Shenk, J. S., et F. C. Elliot, 1971.** Plant compositional changes resulting from two cycles of directional selection for nutritive value in alfalfa. *Crop Science*, 11 : 521-524.

**Shininger, T. L., 1975.** Is DNA synthesis required for the induction of differentiation in quiescent root cortical parenchyma? *Developmental Biology*, 45 : 137-150.

**Shininger, T. L., 1979.** The control of vascular development. *Annual Review of Plant Physiology*, 30 : 313-337.

- Simonds, A.O.**, 1935. Histological studies on the development of the root and crown of alfalfa. Iowa State Coll. Journal Science, 9 (4) : 641-659.
- Sinskaya, E. N.**, 1950. Flora of cultivated plants of the USSR. XIII Perennial Leguminous Plants. Part I. Medic, Sweetclover, Fenugreek. Sinskaya, E. N. *eds.*, 659 p.
- Steppler, H.A.**, 1951. Pasture studies. XXXI. Lignification studies with various grass species. *Sci. Agric.*, 31 : 1-14.
- Stewart, G.**, 1926. Alfalfa growing in the United States and Canada. MacMillan Publishing CO., New York.
- Terashima, N., K. Fukushima, Y. Sano, et K. Takabe**, 1988. Heterogeneity in formation of lignin. X. Visualization of lignification process in differentiating xylem of pine by microautoradiography. *Holzforschung*, 42: 347-350.
- Terashima, N.**, 1990. A new mechanism for formation of a structurally ordered protolignin macromolecule in the cell wall of tree xylem. *Journal of Pulp and Paper Science*, 16 : 150-155.
- Terashima, N., Fukushima, K., L-F. He, et K. Takabe**, 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. *Dans* : Forage cell wall structure and digestibility, Jung, H. G, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, et J. Ralph *eds.*, Madison, WI 53711, USA, ASA-CSSA-SSSA., 247-266.
- Terry, R. A., et J. M. A. Tilley**, 1964. The digestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin, as measured by an *in vitro* procedure. *Journal of the British Grassland Society*, 19 : 363-373.
- Teuber, L. R. et M.A. Brick**, 1988. Morphology and Anatomy. *Dans* : Alfalfa and Alfalfa Improvement, Hanson, A. A., D. K. Barnes, et R. R. Hill *eds.*, 125-162.
- Thoquet, P., M. Ghérardi, E.P. Journet, A. Kereszt, J.M. Ané, J.M. Prospéri et T. Huguet**, 2002. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biology*, 2 : 1-13.
- Tolivia, D., et J. Tolivia**, 1987. Fasga: a new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissue. *Journal of Microscopy*, 148 (1) : 113-117.
- Travis, A. J., S. D. Murison, et A. Chesson**, 1993. Quantitative measurement of stem anatomy as an indicator of varietal performance. *Aspects of Applied Biology*, 34 : 335-343.
- Travis, A. J., S. D. Murison, P. Perry, et A. Chesson**, 1997. Measurement of cell wall volume using confocal microscopy and its application to studies of forage degradation. *Annals of Botany*, 80 : 1-11.
- Turner, S. R., et C. R. Somerville**, 1997. Collapsed xylem phenotype of Arabidopsis identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *The Plant Cell*, 9 : 689-701.
- Tutin, T. G.**, 1968. *Medicago*. *Dans* : Flore of Europe, 153-157.
- Twidell, E. K., K. D. Johnson, C. E. Bracker, J. A. Patterson, et J. H. Cherney**, 1989. Plant tissue degradation measurement using image analysis. *Agronomy Journal*, 81 : 837-840.
- Vallet, C., B. Chabbert, Y. Czaninski, et B. Monties**, 1996. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stem. *Annals of Botany*, 626-632.
- Vallet, C.**, 1997. Analyse des relations entre la croissance et la structure des parois des tiges

de luzerne. Approches en conditions contrôlées et au champ. Thèse, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 104p.

**Vance, C.P., T.K. Kirk, et R.T. Sherwood,** 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Plant Pathology*, 18: 259-288.

**Walker, W.S.,** 1960. The effect of mechanical stimulation and etiolation on the collenchyma of *Datura stramonium*. *American Journal of Botany*, 47 : 717-724.

**Whyte, R.O., G. Nilsson-Leissner, et H.C. Trumble,** 1953. Legumes in agriculture. FAO Agriculture Studies, series 21, Rome, Italy.

**Wilman, D., et M. A. K. Altimimi,** 1984. The *in vitro* digestibility and chemical composition of plant parts in white clover, red clover and lucerne during primary growth. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35 : 133-138.

**Wilson, J. R.,** 1991. Plant structures: their digestive and physical breakdown. *Dans* : Recent advances on the nutrition of herbivores, Ho, Y. W. et al eds., Kuala Lumpur, Malaysia, 207-216.

**Wilson, J. R., K. L. Anderson, et J. B. Hacker,** 1989. Dry matter digestibility *in vitro* of leaf and stem of buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) and related species and its relation to plant morphology and anatomy. *Australian Journal of Agricultural Research*, 40 : 281-291.

**Wilson, J. R., B. Deinum, et F. M. Engels,** 1991. Temperature effect on anatomy and digestibility of leaf and stems of tropical and temperate forage species. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 39 : 31-48.

**Wilson, J. R.,** 1993. Organization of forage plant tissues. *Dans* : Forage cell wall structure and digestibility, Jung, H. G, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, et J. Ralph eds., Madison, WI 53711, USA, ASA-CSSA-SSSA., 1-32.

**Wilson, J. R., et D. R. Mertens,** 1995. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Science*, 35 : 251-259.

**Winter, C. W.,** 2001. Vascular system of young plants of *Medicago sativa*. *Botanical Gazette*, 94 : 152-167.

**Wittenberg, K. M., E. C. Thomsett, et N. Ames,** 1994. Use of histochemistry, section-to-slide digestion and image analysis for evaluation of digestibility in reed canarygrass. *Canadian Journal in Plant Science*, 74 : 83-89.

**Wricke, G., et W.E. Weber,** 1986. Quantitative genetics and selection in plant breeding. Walter de Gruyter Publ., Berlin.

**Yu, K. et K.P. Pauls,** 1993. Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Molecular Biology*, 22 : 269-277.

**Zhong, R., J. J. Taylor, et Z. H. Ye,** 1997. Disruption of interfascicular fiber differentiation in an arabidopsis mutant. *The Plant Cell*, 9 : 2159-2170.

**Zimnoch-Guzowska, E., W. Marczewski, R. Lebecka, B. Flis, R. Schäfer-Pregl, F. Salamini, et C. Gebhardt,** 2000. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Science*, 40 : 11456-1167.



ANNEXES





## Annexe 2.1



Centre de Recherches  
Poitou-Charentes

BONNES PRATIQUES DE  
LABORATOIRE

UGAPP- LUSIGNAN

**Histologie**

14/03/2001

H06

## UTILISATION DU VIBRATOME

### Description rapide

Le principe du vibratome consiste à couper du matériel frais ou fixé, à l'aide d'une lame de rasoir qui avance progressivement sur l'échantillon, tout en vibrant latéralement, le tout immergé dans un liquide. Cet appareil permet de contrôler différents paramètres : la vitesse de la lame, l'amplitude de la vibration, l'angle de la lame et la hauteur relative de l'échantillon.

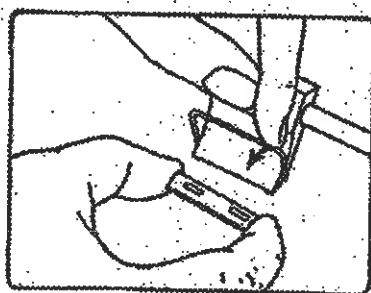
### Utilisation du vibratome

#### ☛ Etapes préliminaires

**Mise en place** de la lame de rasoir:

Les lames utilisées sont de marque Schick Injector. Ce sont des lames à simple tranchant. Il est possible d'utiliser des lames double tranchant (Gillette par exemple), mais celles-ci présentent deux inconvénients : Il faut les couper en deux pour les monter sur le vibratome. De plus, ce type de lame est beaucoup plus souple et ne peut couper que des tissus tendres. Il est impossible de couper proprement des tiges de maïs avec des lames Gillette.

La lame de rasoir est simplement serrée entre deux pinces. Cette pince s'ouvre avec un système de levier.



**Attention** : les lames de rasoirs sont rapidement usées par les tissus très résistants. Il ne faut pas hésiter à changer souvent de lame ou à changer sa position (3 positions : centrale, droite et gauche) dans le porte-lame de façon à toujours utiliser une portion de lame neuve. L'utilisation d'une lame usée est caractérisée par un déchirement des tissus tendres de la section. Pour la **luzerne**, une lame coupe 3 échantillons, avec 5-6 sections par échantillon.

### Remplissage de la cuve :

L'échantillon et la lame de rasoir doivent toujours être immergés dans un liquide. Tout type de solution peut être utilisé : une solution de fixation ou un tampon phosphate (pour conserver les activités protéiques). Si le matériel à sectionner n'a pas besoin de traitement particulier, la cuve peut être remplie avec de l'eau. Dans tous les cas, le liquide doit recouvrir le tranchant de la lame. La lame se libère ainsi des éventuels débris cellulaires au cours du sectionnement. De plus, le liquide rend la récupération de la section plus aisée, puisque celle-ci se détache facilement de l'échantillon et de la lame.

Pour observer la répartition des lignines dans les tiges de **maïs**, le liquide utilisé est de l'eau. Il en est de même pour les coupes histologiques de tiges de **luzerne**.

### Fixation de l'échantillon sur le support :

Le support du matériel à couper est un petit bloc noir. L'échantillon est simplement collé sur ce support (sur la plus grande face) à l'aide d'une colle forte (cyanoacrylate). La surface à coller doit être parfaitement plane (parallèle au plan de la section) et non poreuse pour une adhérence parfaite, sinon l'échantillon risque de se décoller en cours de coupe.

**Note**: Si l'échantillon est creux (tiges de **luzerne** par exemple), il faut éviter de mettre trop de colle à l'intérieur de la section de tige à coller car on risque de voir apparaître cette colle sur la section de tige.

Après avoir légèrement pressé l'échantillon sur le support pendant quelques secondes, le matériel est collé au support et peut être immergé dans la cuve.

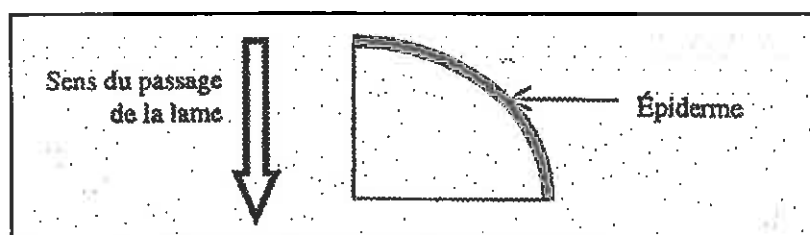
Le chemin de la lame sur la coupe ne doit pas dépasser 7mm. Si la lame doit couper plus de 7 mm, le bec du porte-lame vient buter sur l'échantillon en fin de parcours et l'écrase.

*Quelques conseils à suivre avant de coller le matériel.*

- Taille idéale de l'échantillon de tige de **luzerne** : 4mm

- Comment orienter une portion de tige de **maïs** sur le support ?

Il faut éviter de commencer ou de finir par l'épiderme : Sinon, l'écorce se détache du cylindre central. Voici la position utilisée pour le maïs :



Positionnement de l'échantillon devant la lame

Le support est placé dans l'emplacement prévu à cet effet et serré à l'aide de la vis. La hauteur relative de ce support est réglée à l'aide de la vis placée à l'avant du vibratome. Dans un premier temps, il faut la régler de manière à ce que le haut de l'échantillon soit au niveau du tranchant de la

## Annexe 2.2

## Composition de la solution de Fasga (Tolivia et Tolivia, 1987)

Préparation de la solution de Safranine 1% 100 ml

Safranine O	1g
Acétate de sodium	1 g
Ethanol absolu	75 ml
H <sub>2</sub> O	25 ml
Formaldéhyde	2 ml (sous la hotte)

Préparation de la solution de bleu alcian 8GX 0,5% 100 ml

Blau Alcian 8GX	500 mg
Ethanol absolu	100 ml

Préparation de la solution mère de Fasga 65 ml

Solution de Safranine O 1%	3 ml
Solution de bleu Alcian 0,5%	11 ml
Glycérine 99%	30 ml
H <sub>2</sub> O	20 ml
Acide Acétique glacial	1 ml



## Annexe 2.3

## Définitions relatives au traitement des images par Optimas

(extrait du site web INRA : <http://www.poitou-charentes.inra.fr/optimas6/optimas6.html>)

**Élément structurant** : Les transformations morphologiques consistent à balayer sur tous les points de l'image un masque de structure donnée (élément structurant) et de rechercher pour chaque position de l'image la relation ensembliste qui existe avec ce masque. Les éléments structurants peuvent avoir des formes et tailles variées : rond, carré, hexagonale.

**Erosion** :

L'érosion d'un objet par un élément structurant est l'ensemble des points de l'objet pour lesquels l'élément structurant est totalement inclus dans l'objet. L'érosion supprime les petites particules, réduit la taille des autres, supprime des pics et peut séparer certaines particules ou objets qui se touchent. Le principe est illustré par la figure suivante :

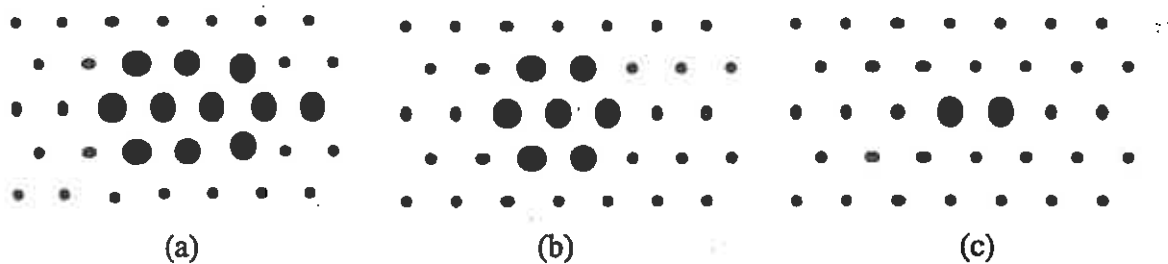


Figure 1 : exemple d'érosion binaire sur une trame hexagonale, a : image de départ, b : masque de forme circulaire, c : résultat de l'érosion.

**Dilatation** :

L'opérateur dual de l'érosion est la dilatation. Elle est représentée par la ligne externe à l'objet (figure x). L'étape de dilatation permet par exemple de boucher des trous présents dans des objets, l'augmentation de la taille de l'objet est compensée en appliquant un nombre égal d'érosions, l'ensemble constitue le principe de *fermeture morphologique*.

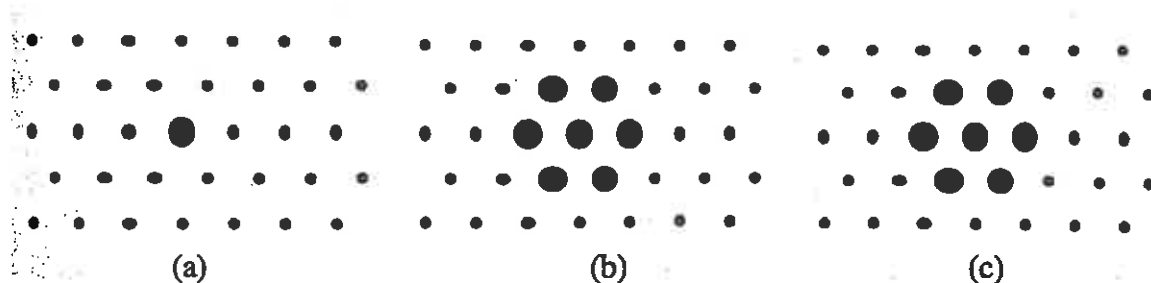


Figure 2 : Exemple de dilatation binaire sur une trame hexagonale, a : image de départ, b : masque de forme linéaire, c : résultat de la dilatation.

**L'ouverture morphologique :**

L'ouverture morphologique est une érosion suivie d'une dilatation, elle permet aussi de supprimer les petites composantes de l'image, et gomme les irrégularités des contours.

**Erosion – Reconstruction :**

Les objets subissant des traitements morphologiques, sont déformés. Si l'on veut effectuer des mesures précises il est nécessaire de retrouver l'objet tel qu'il était à l'origine. Cette fonction permet d'effectuer des érosions, dont la taille de l'élément structurant est demandée à l'utilisateur. Ensuite elle affiche les objets, qui n'ont pas été détruits par l'érosion, dans leur état d'origine.



Figure 3 : Exemple d'érosion reconstruction, a : image d'origine, b : résultat de 7 érosions de taille 3x3, c :dilatation conditionnelle

**Watershed (ou ligne de partage des eaux) :**

L'image en niveau de gris peut être comparée à un relief terrestre. Les parties sombres seront les vallées, les parties claires seront les pics, les zones intermédiaires sont les bassins versants. Le *watershed* est un processus d'inondation. Dans la figure ci-dessous (supposée être un lac), si nous remplissons le lac au début nous avons une frontière par le pic central, à un certain moment il devrait y avoir rencontre des 2 étangs. L'on va interdire cette rencontre en plaçant une frontière (trait vert) qui va monter au niveau des deux bords. Les lignes ainsi créées vont être les lignes de partage des eaux ou lignes de crêtes.

Dans Optimas cette fonction se trouve dans le menu:

Image --> Binary\_Morphology --> Watershed

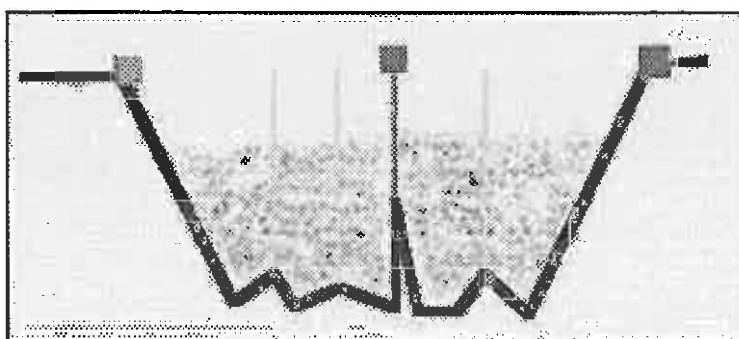


Figure 4 : Illustration de la ligne de partage des eaux

Un paramètre : PreeFlood apparaît, il va permettre de définir la sensibilité du watershed. Si l'indice est assez élevé (60 par exemple), dans l'image ci-dessous on aura la frontière verte. Si on diminue cet indice

(10 par exemple), notre fonction va être plus sensible et tenir compte des rochers plus petits se trouvant dans le fond du lac, et on aura les frontières jaunes.

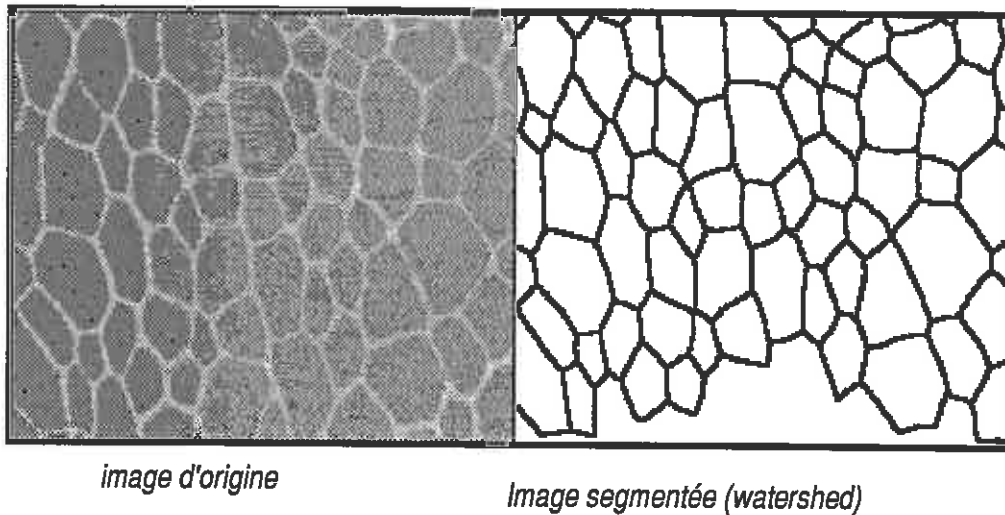


Figure 5 : Exemple de watershed

#### *Squeletisation :*

Le squelette est la représentation simplifiée d'un objet, en amincissant ces composantes connexes jusqu'à obtenir une ligne (ou un point pour un cercle parfait). La notion d'amincissement s'apparente à une érosion et consiste à enlever des points (pixels) à un objet de l'image. La squeletisation produit des barbules qui peuvent être supprimées par une opération d'ébarbulage (*fonction Thiningfilter*) (voir figure).

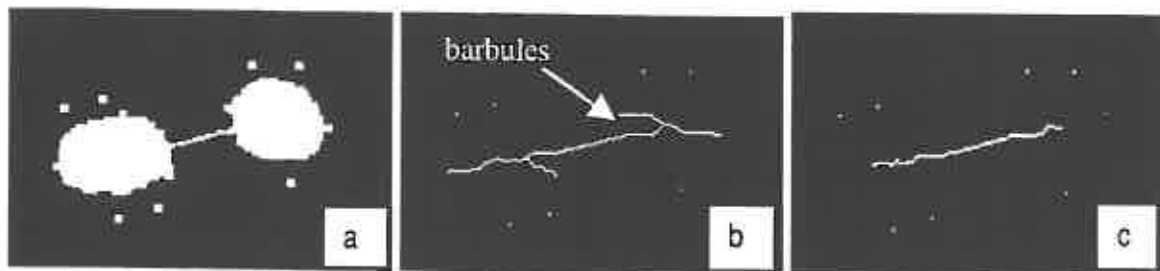


Figure 6 : Exemple de squeletisation, a : image d'origine binaire, b : squelette avec barbules (résultat de *squeletisation*), c : squelette ébarbulé (résultat de *Thiningfilter*)

#### *Filtre médian :*

Le filtre non linéaire le plus connu est le filtre médian. Il est basé sur le classement des intensités par ordre croissant. Chaque pixel de l'image aura pour nouvelle intensité, la valeur médiane des intensités du voisinage.

#### *Filtre SharpenHigh :*

Les filtres "Sharpen" sont des filtres passe-haut. Les filtres passe-haut accentuent le contraste de l'image (ainsi que le bruit de fond) en mettant en évidence les contours des plages de niveaux de gris. Ils permettent aussi d'augmenter ou d'améliorer la netteté de l'image. Ce sont des filtres de "rehaussement".





## Annexe 2.4

## Exemple de macro principale permettant d'analyser les images au grossissement X30

L'analyse des images au grossissement X 30 nécessite l'enchaînement de 4 macros principales (chacune d'elles appelle des sous macros de segmentation)

**ETAPE 1 : chargement des fichiers ayant l'extension .TIFF dans le répertoire désigné et segmentation des images (coupe entière et parenchyme médullaire)**

```
/* SEGMENTATION automatique séquentielle des images de coupes de LUZERNE en bas de tige pour mesure de surface
totale coupe+parenchyme médullaire et distances épiderme/parenchyme médullaire
* lecture du fichier de configuration fguines8.txt
* créer une image segmentée .ENT (coupe entière) et .MED (uniquement le parenchyme médullaire)
date: 4 Septembre 2000
par P. Poussot et F. Guines
```

```
*/
```

```
/****** ZONE DE PARAMETRAGE ANALYSTE PROGRAMMEUR*****
```

```
Char MacroPrincipale= "segauto1.mac";
```

```
Char CheminOptimas="c:/programfiles/optimas6.1/macros/fguines/";
```

```
//appelle des sous macros pour segmenter les images
```

```
char Macro2="lpegrad"; // segmentation coupe entière
```

```
Char Macro1="parmed1"; // segmentation parenchyme médullaire
```

```
//Char Macro3="lpegradh"; //segmentation coupe entière adaptée pour les hauts de tige
```

```
//Char Macro4="parmedh"; // segmentation parenchyme médullaire adaptée pour le haut des tiges
```

```
//Chargement des fichiers du répertoire indiqué dans le fichier texte : guines8.txt
```

```
integer debutFichier=0; // indique le premier fichier à charger
```

```
integer debutRepertoire=1; // indique le numéro du répertoire à charger
```

```
integer finRepertoire=1; // indique la fin des numéros de répertoire à charger
```

```
char ConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines8.txt"; //va lire dans le fichier texte d'entrée
```

```
char OptimasConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines.cfg"; //lit le fichier de configuration
```

```
char CalibrationConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines.cal"; //lit le fichier de calibration
```

```
//localpathname=CheminOptimas;
```

```
/******FIN ZONE DE PARAMETRAGE ANALYSTE PROGRAMMEUR*****
```

```
// *****variables de programme*****
```

```
char ResultatFile;
```

```
INTEGER iOffset1=0, iFnd1[2];
```

```
INTEGER iOffset2=0, iFnd2[2];
```

```
INTEGER iOffset3=0, iFnd3[2];
```

```
INTEGER iOffset4=0, iFnd4[2];
```

```
char ConfigTxt1D[];
```

```
char ConfigTxt2D[.];
```

```
char Chaîne1;
```

```
char Chaîne2[];
```

```
char Chaîne3;
```

```
char Chaîne4;
```

```

char vide[];
char ResultatTxt1D[];
real ResultatNum1D[50];
char FichierMesuresTXT2D[.];
real FichierMesuresNUM2D[.];
char FichierMesuresSortie="";
real ResultatNum1D[50];
ResultatNum1D[0..49]=0;
real valeur;
char ConfigCalibrations1D;
char ConfigCalibrations2D[.];
integer ChoixFile;
char choix="";
integer colone;
integer Nbcolones;
integer ligne=0;
integer dimConfigTxt2D;
integer nbrepertoires;
char repertoire;
char extension;
char calibration;
char fichiers[.];
char ParametrageLigne;
char nouveaurepertoire;
char chemin;
Char NomFichier0;
char CheminFichier;
char SuffixeExtension;
char PrefixeExtension;
char NomCalibration;
char ResultatTxt;
integer appreciation;

//*****Lecture fichiers de configuration .TXT *****

lfile=Openfile(ConfigFile , 0x0000);
long taillefichier= PositionFile (lfile ,0,2);
PositionFile (lfile ,0);
char ConfigTxt=readfile(lfile,taillefichier,null);
//ConfigTxt=0:ConfigTxt;
closefile(lfile);
while ( (iFnd1=SearchString("\n",ConfigTxt,0x1,iOffset1)) )
{
Chaine1= ConfigTxt[(iOffset1..iFnd1[0]):"t";
ConfigTxt2D::=Chaine1;
iOffset1 = iFnd1[0]+iFnd1[1];
}

// Pour chaque repertoire, extrait la liste des fichiers comportant l'extension spécifiée (.TIFF)

dimConfigTxt2D=Getshape(ConfigTxt2D);
nbrepertoires=dimConfigTxt2D[0];

//***** TRAITEMENT DE CHAQUE REPERTOIRE *****

for (rep=debutRepertoire;rep<=finRepertoire;rep++)
{

// lecture ligne du fichier

```

```

ParametrageLigne=ConfigTxt2D[rep,];
iOffset2=0;
iFnd2=SearchString("\t",ParametrageLigne,0x1,iOffset2) ;
repertoire= ParametrageLigne[(iOffset2..iFnd2[0]):"\\";
iOffset2 = iFnd2[0]+iFnd2[1];
iFnd2=SearchString("\t",ParametrageLigne,0x1,iOffset2);
extension= ParametrageLigne[(iOffset2..iFnd2[0])];
iOffset2 = iFnd2[0]+iFnd2[1];
iFnd2=SearchString("\t",ParametrageLigne,0x1,iOffset2) ;

// recherche liste de fichiers avec extension prédéfinie (.TIFF)

iFnd3=SearchString(".", extension ,0x02,iOffset3) ;
SuffixeExtension= extension[(iFnd3[0]+1)..(iFnd3[0]+4)];
PrefixeExtension= extension[0..iFnd3[0]];
chemin=repertoire:extension;
fichiers=FileWildcardList( chemin,0x01);

// ***** Segmentation séquentielle de chaque fichier image *****

integer dimFichiers=Getshape(fichiers);
integer nbFichiers=dimFichiers[0];

For (fic=debutFichier; fic<nbFichiers;fic++)

{

CheminFichier=repertoire:fichiers[fic,];
iFnd3=SearchString(SuffixeExtension, CheminFichier ,0x02,iOffset3) ;
NomFichier= CheminFichier[(iOffset3..iFnd3[0])];

OpenImage (CheminFichier,,true);
ZoomFactor = -2;
BandToView = 0;
SetColorMode (0 : 1 : 8 : 1 : 1 : 3);
RoiToList("Imageorigine");

RunMacro (CheminOptimas:macro2:".mac" , ); // segmentation "CoupeEntiere" appelle la macro2 : lpegrad
SaveImage (NomFichier:"ent" , , 8, 0, , "fichier config: ":ConfigFile, "segm ":CheminOptimas:MacroPrincipale, Macro2, TRUE, 0,
TRUE, );// sauvegarde l'image segmentée de la coupe entière en fichier image .ENT

RunMacro (CheminOptimas:macro1:".mac" , ); // segmentation "Parenchymemedulaire"
SaveImage (NomFichier:"med" , , 8, 0, , "fichier config: ":ConfigFile, "segm ":CheminOptimas:MacroPrincipale, Macro1, TRUE, 0,
TRUE, );// sauvegarde l'image segmentée du parenchyme médullaire en fichier image .MED

//RunMacro (CheminOptimas:macro3:".mac" , ); // segmentation "CoupeEntiere" hauts de tige
//SaveImage (NomFichier:"ent" , , 8, 0, , "fichier config: ":ConfigFile, "segm ":CheminOptimas:MacroPrincipale, Macro2, TRUE, 0,
TRUE, );

//RunMacro (CheminOptimas:macro4:".mac" , ); // segmentation "Parenchymemedulaire" hauts de tige
//SaveImage (NomFichier:"med" , , 8, 0, , "fichier config: ":ConfigFile, "segm ":CheminOptimas:MacroPrincipale, Macro1, TRUE,
0, TRUE, );

DeleteImage("ImageMorcelee");
DeleteImage("CoupeEntiere");
DeleteImage("Imageorigine");
DeleteImage("Parenchymemedulaire");

CloseWindow("Image1");
}
debutFichier=0;

```

```

}
// ***** fin segmentation séquentielle de chaque fichier image *****

//***** FIN TRAITEMENT de chaque REPERTOIRE *****

```

## **ETAPE 2 : Retouche possible des images binaires segmentées de la surface entière, du parenchyme médullaire si elles ne se superposent pas totalement à l'image initiale**

```

/* Retouche semi-automatique séquentielle des images de coupes de LUZERNE en bas de tige pour
* lecture du fichier de configuration fguines8.txt
* charges l'image segmentee .ENT (coupe entiere) et .MED(uniquement le parenchyme medulaire)
date: 4 Septembre 2000
par P. Poussot
*/

```

```

//***** ZONE DE PARAMETRAGE ANALYSTE PROGRAMMEUR *****

```

```

Char MacroPrincipale= "segauto1a.mac";
Char CheminOptimas="c:/programfiles/optimas6.1/macros/fguines";
Char Macro="litcalib";
char Macro1="retouch1";
char Macro2="retouch2";
char Macro3="apprecie";
char Macro4="stocmes2";
Char Macro5="enregmes";
Char Macro6="enregsas";

```

```

integer debutFichier=0;
integer debutRepertoire= 3;
integer finRepertoire= 3;
char ConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines8.txt";
char OptimasConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines.cfg";
char CalibrationConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines.cal";

```

```

//***** FIN ZONE DE PARAMETRAGE ANALYSTE PROGRAMMEUR *****

```

```

// variables de programme

```

```

char ResultatFile;
INTEGER iOffset1=0, iFnd1[2];
INTEGER iOffset2=0, iFnd2[2];
INTEGER iOffset3=0, iFnd3[2];
INTEGER iOffset4=0, iFnd4[2];
char ConfigTxt1D[];
char ConfigTxt2D[.];
char Chaine1;
char Chaine2[];
char Chaine3;
char Chaine4;
char vide[];
char ResultatTxt1D[];
real ResultatNum1D[50];
char FichierMesuresTXT2D[.];
real FichierMesuresNUM2D[.];
char FichierMesuresSortie="";
real ResultatNum1D[50];

```

```

ResultatNum1D[0..49]=0;
real valeur;
char ConfigCalibrations1D;
char ConfigCalibrations2D[.];
integer ChoixFile;
char choix="";
integer colone;
integer Nbcolones;
integer ligne=0;
integer dimConfigTxt2D;
integer nbrepertoires;
char repertoire;
char extension;
char calibration;
char fichiers[.];
char ParametrageLigne;
char nouveaurepertoire;
char chemin;
Char NomFichier;
char CheminFichier;
char SuffixeExtension;
char PrefixeExtension;
char NomCalibration;
char ResultatTxt;
integer appreciation;

// initialisation et lecture fichier résultat des mesures, stockage dans "resultattxt2d"
//il faut donner un nom au fichier de sortie texte

ResultatFile= Prompt("Chemin d'accès du fichier resultat (maxi 8 lettres+extension.TXT): ex d:/johnatan/resultat.txt", "char");
OutFile=Openfile(ResultatFile , 0x4000);

if (OutFile)
{

ChoixFile= Prompt("Le fichier de mesures existe deja: ecrire a la suite(0), modifier (1), ecraser (2):", "integer");

if (ChoixFile<2)
{
    OutFile=Openfile(ResultatFile , 0x0000);
    long taillefichier= PositionFile (OutFile ,0,2);
    PositionFile (OutFile ,0);
    ResultatTxt=readfile(OutFile,taillefichier,null);
    closefile(Outfile);
    while ( (iFnd1=SearchString("\r\n",ResultatTxt,0x1,iOffset1)) )
    {
        Chaine1= ResultatTxt[(iOffset1..iFnd1[0]):"\t";
        iFnd2=SearchString("\t",Chaine1,0x1,0);
        Chaine2= Chaine1[(iFnd2[0]+2)..(iFnd1[0]-iOffset1)]:"\t";
        Chaine4= Chaine1[0..(iFnd2[0]+iFnd2[1])];
        FichierMesuresTXT2D::=Chaine4;
        colone=0;
        while ( (iFnd3=SearchString("\t",Chaine2,0x1,iOffset3)) )
        {
            Chaine3= Chaine2[(iOffset3..iFnd3[0])];
            fromtext(Chaine3,valeur);
            ResultatNum1D[colone]=valeur;
            colone++;
            iOffset3 = iFnd3[0]+iFnd3[1];
        }
        iOffset1 = iFnd1[0]+iFnd1[1];
    }
}
}

```

```

        iOffset3 =0;
        FichierMesuresNUM2D:=ResultatNum1D[0..colone];
    }
}
else choixfile=2;

iOffset1 =0;

//***** lecture fichier de configuration calibrations .CAL *****

CalFile=Openfile(CalibrationConfigFile , 0x0000);
long taillefichier= PositionFile (CalFile ,0,2);
PositionFile (CalFile ,0);
char Text=readfile(CalFile,taillefichier,null);
char ConfigTxt=0:Text;
closefile(CalFile);
while ( (iFnd1=SearchString("\n",ConfigTxt,0x1,iOffset1)) )
{
    Chaine1= ConfigTxt[(iOffset1..iFnd1[0]]:"\t";
    ConfigCalibrations2D:=Chaine1;
    iOffset1 = iFnd1[0]+iFnd1[1];
}
iOffset1=0;

//***** lecture fichiers de configuration .TXT *****

lfile=Openfile(ConfigFile , 0x0000);
long taillefichier= PositionFile (lfile ,0,2);
PositionFile (lfile ,0);
char ConfigTxt=readfile(lfile,taillefichier,null);
//ConfigTxt=0:ConfigTxt;
closefile(lfile);
while ( (iFnd1=SearchString("\n",ConfigTxt,0x1,iOffset1)) )
{
    Chaine1= ConfigTxt[(iOffset1..iFnd1[0]]:"\t";
    ConfigTxt2D:=Chaine1;
    iOffset1 = iFnd1[0]+iFnd1[1];
}

// pour chaque repertoire, extrait la liste des fichiers comportant l'extension specifiee

dim ConfigTxt2D=Getshape(ConfigTxt2D);
nbreperitoires=dim ConfigTxt2D[0];

//***** TRAITEMENT DE CHAQUE REPERTOIRE *****

for (rep=debutRepertoire;rep<=finRepertoire;rep++)
{
    // lecture ligne du fichier

    ParametrageLigne=ConfigTxt2D[rep,];
    iOffset2=0;
    iFnd2=SearchString("\t",ParametrageLigne,0x1,iOffset2) ;
    repertoire= ParametrageLigne[(iOffset2..iFnd2[0]]:"\t";
    iOffset2 = iFnd2[0]+iFnd2[1];
    iFnd2=SearchString("\t",ParametrageLigne,0x1,iOffset2);
    extension= ParametrageLigne[(iOffset2..iFnd2[0]]);
    iOffset2 = iFnd2[0]+iFnd2[1];
}

```



```

iFnd2=SearchString("\",ParametrageLigne,0x1,iOffset2) ;

// recherche nom calibration

calibration= ParametrageLigne[(iOffset2..iFnd2[0])];
chemin=repertoire:calibration;
calibrat=FileWildCardList( chemin,0x01);
iFnd4=SearchString(".", calibrat ,0x02,iOffset4) ;
NomCalibration= calibrat[0..iFnd4[0]];
RunMacro (CheminOptimas:Macro:".mac", ); // activation parametres calibration

// recherche liste de fichiers avec extension predefinie

iFnd3=SearchString(".", extension ,0x02,iOffset3) ;
SuffixeExtension= extension[(iFnd3[0]+1)..(iFnd3[0]+4)];
PrefixeExtension= extension[0..iFnd3[0]];
chemin=repertoire:extension;
fichiers=FileWildCardList( chemin,0x01);

// ***** segmentation séquentielle de chaque fichier image *****

integer dimFichiers=Getshape(fichiers);
integer nbFichiers=dimFichiers[0];

For (fic=debutFichier; fic<nbFichiers;fic++)

{
ResultatTxt1D=repertoire:"\":fichiers[fic]:"\\";
CheminFichier=repertoire.fichiers[fic,];
iFnd3=SearchString(SuffixeExtension, CheminFichier ,0x02,iOffset3) ;
NomFichier= CheminFichier[(iOffset3..iFnd3[0])];

OpenImage (CheminFichier,,true);
ZoomFactor = -2;
BandToView = 0;
SetColorMode (0 : 1 : 8 : 1 : 1 : 3);
RoiToList(,"Imageorigine");

OpenImage (NomFichier:"ent",,false);
RoiToList(,"CoupeEntiere");

OpenImage (NomFichier:"med",,false);
RoiToList(,"Parenchymemedulaire");

RunMacro (CheminOptimas:macro3:".mac", ); // appreciation

if (appreciation==1||appreciation==3)
{
RunMacro (CheminOptimas:macro1:".mac", ); // retouche segmentation "Parenchymemedulaire"
SaveImage (NomFichier:"med", , 8, 0, , "fichier config: ":ConfigFile, "segm ":CheminOptimas:MacroPrincipale, Macro1, TRUE, 0,
TRUE, );
}

if (appreciation==2||appreciation==3)
{
RunMacro (CheminOptimas:macro2:".mac", ); // retouche segmentation "Parenchymemedulaire"
SaveImage (NomFichier:"ent", , 8, 0, , "fichier config: ":ConfigFile, "segm ":CheminOptimas:MacroPrincipale, Macro2, TRUE, 0,
TRUE, );
}

```

```

RunMacro (CheminOptimas:macro4:".mac", ); // stockage de l'appréciation

DeleteImage("CoupeEntiere");
DeleteImage("Imageorigine");
DeleteImage("Parenchymemedulaire");

CloseWindow("Image1");
}
debutFichier=0;
}
// ***** fin segmentation sequentielle de chaque fichier image *****
//pause();

//***** FIN TRAITEMENT de chaque REPERTOIRE *****

RunMacro (CheminOptimas:macro5:".mac", );
RunMacro (CheminOptimas:macro6:".mac", );// fichier utilisateur

```

### **ETAPE 3 : Macro automatique de traçage des distances entre l'épiderme et le parenchyme médullaire (créer une image segmentée avec une extension .SEG)**

/\* SEGMENTATION automatique séquentielle des images de coupes de LUZERNE en bas de tige pour mesure de surface totale coupe+parenchyme médullaire et distances épiderme/parenchyme médullaire

- \* lecture du fichier de configuration fgunes8.txt
- \* charge les images préalablement segmentées .ENT (coupe entière) et .MED(uniquement le parenchyme médullaire)
- \* crée une image .SEG (segments epi/parenchymemedulaire)

date: 4 Septembre 2000

par P. Poussot

\*/

**le traitement des images est le même que dans les étapes 1 et 2 sauf la partie qui suit :**

\$\$\$\$\$\$\$\$\$ ZONE DE PARAMETRAGE ANALYSTE PROGRAMMEUR \$\$\$\$\$\$\$\$\$\$

```

Char MacroPrincipale= "segauto1b.mac";
Char CheminOptimas="c:/programfiles/optimas6.1/macros/fgunes/";

```

```

Char Macro7="autodist"; // trace auto des segments epi/parenmed

```

```

integer debutFichier=0;
integer debutRepertoire= 0;
integer finRepertoire= 0;
char ConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fgunes8.txt";
char OptimasConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fgunes.cfg";
char CalibrationConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fgunes.cal";

```

\$\$\$\$\$\$\$\$\$ FIN ZONE DE PARAMETRAGE ANALYSTE PROGRAMMEUR \$\$\$\$\$\$\$\$\$\$

les étapes "\*\*\*\*\*lecture des fichiers de configuration .TXT\*\*\*\*\*"  
 "\*\*\*\*\*traitement de chaque répertoire\*\*\*\*\*"  
 sont les mêmes que dans les deux autres macros

```
// *****segmentation séquentielle de chaque fichier image*****

integer dimFichiers=Getshape(fichiers);
integer nbFichiers=dimFichiers[0];

For (fic=debutFichier; fic<nbFichiers;fic++)
{
CheminFichier=repertoire:fichiers[fic,];
iFnd3=SearchString(SuffixeExtension, CheminFichier ,0x02,iOffset3) ;
NomFichier= CheminFichier[(iOffset3..iFnd3[0])];

OpenImage (CheminFichier,,true);
ZoomFactor = -2;
BandToView = 0;
SetColorMode (0 : 1 : 8 : 1 : 1 : 3);
RoiToList("Imageorigine");

OpenImage (NomFichier:"ent",,false);
RoiToList("CoupeEntiere");

OpenImage (NomFichier:"med",,false);
RoiToList("Parenchymemedulaire");

RunMacro (CheminOptimas:"selecmax.mac" , ); // selection objet a S maxi

RunMacro (CheminOptimas:macro7:".mac" , );// segmentation "SegmentsEpi/Parenmed"
SaveImage (NomFichier:"seg" , , 8, 0 , , "fichier config: ":ConfigFile, "segm ":CheminOptimas:MacroPrincipale, Macro7, TRUE, 0,
TRUE, );

DeletelImage("Parenchymemedulaire");
DeletelImage("CoupeEntiere");
DeletelImage("Imageorigine");
DeletelImage("SegmentsEpi/Parenmed");
DeletelImage("ParenmedExcluCoupeEntiere");
DeletelImage("SegmentsEpi/Paren");

CloseWindow("Image1");
}
debutFichier=0;
}
// ***** fin segmentation sequentielle de chaque fichier image *****
//pause();

//***** FIN TRAITEMENT de chaque REPERTOIRE *****
```

**ETAPE 4 : ETAPE DE MESURE SUR LES FICHIERS .ENT, .MED et .SEG** obtenus à partir des étapes 1 (.ent : surface de la coupe entière, et .med : surface du parenchyme médullaire) et de l'étape 3 (.seg : distance entre l'épiderme et le parenchyme médullaire).

/\* Mesures automatique sequentielle des images de coupes de  
 LUZERNE en bas de tige pour

mesure de surface totale coupe+parenchymemedulaire et distances epiderme/parenchymemedulaire

\* lecture du fichier de configuration fguines8.txt  
 \* charge les images prealablement segmentees ENT (coupe entiere) et .MED(uniquement le parenchyme medulaire)  
 et .SEG (segments epi/parenchymemedulaire)  
 \* effectue les mesures+appreciation operateur puis enregistre dans fichier de sortie .TXT et .PRN  
 date: 4 Septembre 2000  
 par P. Poussot et F. Guines

\*\*\*\*\* ZONE DE PARAMETRAGE ANALYSTE PROGRAMMEUR \*\*\*\*\*

**Char MacroPrincipale= "segauto1c.mac";**

Char CheminOptimas="c:/programfiles/optimas6.1/macros/fguines/";

Char Macro="litcalib";

Char Macro3="mesmed1"; // mesure de surface coupe entiere et parenchyme medulaire et trace manuel des segments epi/parenmed

Char Macro4="stocmes2";

Char Macro5="enregmes";

Char Macro6="enregsas";

integer debutFichier=0;

integer debutRepertoire= 0;

integer finRepertoire= 0;

char ConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines8.txt";

char OptimasConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines.cfg";

char CalibrationConfigFile="d:/fgluz/mesures/optimas6/fguines.cal";

\*\*\*\*\* FIN ZONE DE PARAMETRAGE ANALYSTE PROGRAMMEUR \*\*\*\*\*

/\* COUPES ENTIERES BAS DE TIGE: superposition image .MED (Parenchymemedulaire) , image .ENT (coupeentiere)  
 et image en niveau de gris (imageorigine)

- 1) possibilité de faire des mesures manuelles de la distance parenchyme médullaire et épiderme de la coupe : enlever les//
- 2) acquisition de l' appreciation de l'operateur et validation

nota: appreciation= 0 si l'utilisateur ne rentre pas d'information

3) acquisition de la surface totale du parenchyme medulaire et de la coupe entiere

par Pascal Poussot

le 12 Aout 2000

\*/

// activation parametres calibration

RunMacro (CheminOptimas:Macro:".mac", );

// extrait les mesures de l'image xyleme

clearscreen();

ArithmeticOp ("Copy", "ParenchymeMedulaire", null, , "Clip", FALSE, FALSE);

AreaCNVFactors[0..14] = 0.0 : 1.0 : 0.0 : 1.0 : 0.0 : 1.0 : -1.0 : -1.0 : -1.0 : 0.0 : 255.0 : -1.0 : 2.0 : 0.0;

LineCNVFactors[0..6] = 0.0 : 1.0 : 0.0 : 1.0 : 0.0 : 1.0;

DataCollectionType = 2;

```

CreateArea(,TRUE);
SetExport (ArArea, 1, TRUE);
SetExport(mArPoints);
MultipleExtract (TRUE);
real SurfaceParenchymeMedulaire=max(ArArea);
real PointsParenchymeMedulaire=mArPoints;

//extrait les mesures de l'image coupe entiere sans le parenchyme medulaire
clearscreen();
Invertfilter();
ArithmeticOp ("and", "CoupeEntiere", null, , "Clip", FALSE, FALSE);
CreateArea(,TRUE);
SetExport (ArTotaltally, 1,TRUE);
SetExport (mArAreaFore, 1,TRUE);
MultipleExtract (TRUE);

SurfaceEcorce=mArAreaFore;

// extrait les mesures de l'image coupe entière

clearscreen();
ArithmeticOp ("Copy", "Coupeentiere", null, , "Clip", FALSE, FALSE);
CreateArea(,TRUE);
SetExport (ArTotaltally, 1,TRUE);
SetExport (mArArea, 1,TRUE);
SetExport (mArpoints, 1,TRUE);
MultipleExtract (TRUE);

real SurfaceCoupeEntiere=mArArea;
real PointsCoupeEntiere=mArPoints;
real SurfaceEcorce=SurfaceCoupeEntiere-SurfaceParenchymeMedulaire;

//extrait les mesures des traces des segments automatiques
clearscreen();
ArithmeticOp ("Copy", "SegmentsEpi/Paren", null, , "Clip", FALSE, FALSE);
Createline (, TRUE);
SetExport (LnTotalTally, 1, TRUE);
SetExport (mLnLength, 1, TRUE);
SetExport (mLnSampledPoints, 1, TRUE);
MultipleExtract (TRUE);
real PointsSegments=mLnSampledPoints;
real distances=0;
real distancemoyenne=0;
clearscreen();

for(segm=0;segm<LnTotalTally;segm++) distances+=mLnLength[segm];
if (LnTotalTally!=0) distancemoyenne=distances/LnTotalTally;
else distancemoyenne=0;

// redessine les limites des images xyleme et coupeentiere et superpose l'image en niveau de gris

real PointsAdessiner=PointsParenchymeMedulaire::PointsCoupeEntiere::PointsSegments;
clearscreen();
ArithmeticOp ("Copy", "ImageOrigine", null, , "Clip", FALSE, FALSE);
CreateArea(PointsAdessiner,,);

// donne la main a l'utilisateur pour valider

choix=prompt("Noter l'appreciation: ":"\r\n": "DefautSurfxyieme (1,2) DefautSurfCoupe (3,4)", "char");

```

```

if (choix == "") Appreciation=0;
else fromtext(choix,Appreciation);
clearscreen();

/*
// donne la main a l'utilisateur pour valider tracer les lignes et extrait les mesures

choix=prompt("Tracer les lignes epiderme / parenchyme medulaire puis taper OK");

SetExport (LnTotalTally, 1, TRUE);
SetExport (mLnLength, 1, TRUE);
MultipleExtract (TRUE);
real distances=0;
real distancemoyenne=0;
clearscreen();

for(seg=0;seg<LnTotalTally;seg++) distances+=mLnLength[seg];
if (LnTotalTally!=0) distancemoyenne=distances/LnTotalTally;
else distancemoyenne=0;
*/

//nomme les colonnes du fichier de sortie
ResultatNum1D[1]=SurfaceParenchymeMedulaire;
ResultatNum1D[2]=SurfaceCoupeEntiere;
ResultatNum1D[3]=SurfaceEcorce;
ResultatNum1D[4]=distancemoyenne;
ResultatNum1D[5]= SurfaceParenchymeMedulaire/ SurfaceCoupeEntiere;
ResultatNum1D[6]= SurfaceEcorce /SurfaceCoupeEntiere;
colone=6; // info utilisee dans le pg de stockage: nb de mesures a stocker

```

### EXEMPLE DE FICHIER D'ENTREE

D:/Fgluz/mesures/optimas6/coupeshisto/intravariete \*.tif \*.ref

Optimas lit tous les fichiers qu'il rencontre et qui possèdent une extension .TIF et .REF (pour l'image de calibration)

### EXEMPLE DE FICHIER DE SORTIE

INTRA VARIETES : LUISANTE / LUZELLE CYCLE 1 intVS1.TXT Bino X 30  
02/01/2001

Nom du fichier	App	PAR	ENT	ECORCE	DISTEP	PPAR	PECORCE
LuisantellB.tif	0	3.98861	8.39861	4.41	0.521087	0.4749	0.52508

app : appréciation de la qualité du traitement de l'image

PAR : surface du parenchyme médullaire

ENT : surface de la cope entière

ECORCE : surface de l'écorce + xylème

DISTEP : distance entre l'épiderme et le parenchyme médullaire dans la coupe

PPAR : proportion de parenchyme médullaire

PECORCE : proportion d'écorce + xylème dans la coupe

## Annexe 2.5

## Dosage des parois par la méthode de Van Soest

Cette méthode permet suite à l'action de différents réactifs, de déterminer les différents constituants membranaires. L'ensemble de ces constituants est appelé parois ou NDF, et est obtenu après attaque par une solution de détergent neutre (NDS).

Le complexe ligno-cellulose (ADL) est obtenu après attaque du résidu NDF par une solution de détergent acide (ADS).

Les lignines ou ADL sont obtenues après l'action d'une solution à 72% d'acide sulfurique sur le résidu ADF (si l'attaque a lieu directement sur le résidu NDF, on parlera de lignine Klason du NDF).

## Solution de NDS

Sodium lauryl sulfate	30,00 g
Disodium éthylène diamine tétraacétate (EDTA) déshydraté	18,61 g
Sodium borate décahydraté	6,81 g
Disodium hydrogène phosphate anhydre	4,56 g
Tri-éthylène glycol	10 ml
Eau déminéralisée	q.s.p. 1000ml

Dissoudre l'EDTA avec de l'eau déminéralisée dans un bécher de 2 litres, après dissolution ajouter le lauryl sulfate.

Dans un deuxième bécher dissoudre le phosphate di-sodique avec de l'eau déminéralisée puis y ajouter le borate de sodium.

Mélanger les deux solutions, ajouter le tri-éthylène glycol, ajuster à 1 litre et vérifier que le pH soit bien entre 6,9 et 7,1.

## Solution ADS (pour obtenir le résidu ADF)

CTAB	20,00 g
Solution d'acide sulfurique 1N	1000 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N = 27,7 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pur dans de l'eau déminéralisée, ajuster à 1000 ml.	

Solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 72%

665 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pur dans de l'eau déminéralisée, ajuster à 1000 ml





## Annexe 3.1

Carrés moyens de l'analyse de variance par strate de 10 cm de hauteur pour tous les caractères histologiques mesurés pour le génotype D+ et le génotype D-.

## I- Génotype D+

Distance entre l'épiderme et le bord externe du parenchyme médullaire ( $10^{-3}$ )

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	2,6	13,36**	12,91	10,21*	11,79	1,37*	88,2	68,42**
Tige	3	0,23	0,68	1,90	2,35	0,25	9,09	3,8	60,76**
Erreur	2	1,8	0,09	1,12	0,26	1,83	14,36	6,8	0,089

Proportions d'écorce plus faisceaux ( $10^{-3}$ )

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,37	0,05	0,27	0,82	0,58	4,75	4,75	2,14
Tige	3	0,83	0,18	2,8	2,49	0,29	0,14	3,26	27,8
Erreur	2	2,6	0,08	0,21	0,72	1,7	3,1	1,74	1,26

Proportions de parenchyme médullaire ( $10^{-3}$ )

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,37	0,05	0,27	0,82	0,58	4,75	4,75	2,14
Tige	3	0,83	0,18	2,8	2,49	0,29	0,14	3,26	27,8*
Erreur	2	2,6	0,08	0,21	0,72	1,7	3,1	1,74	1,26

Proportions de xylème dans la coupe moins le parenchyme médullaire ( $10^{-3}$ )

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	112	1,16	2,22	1,95	4,74	12,57	2,08	21,16*
Tige	3	0,4	0,90	0,19	2,97	2,69	0,12	3,92	2,63
Erreur	2	1,8	2,65	3,74	3,13	2,02	2,69	1,87	0,37

Proportions de xylème dans la coupe ( $10^{-3}$ )

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	6,2	0,86	0,18	0,75	7,24	4,41*	0,24	11,72
Tige	3	0,8	0,21	0,05	0,51	0,26	2,36	0,63	2,22
Erreur	2	0,011	0,04	0,46	0,17	1,05	0,19	0,04	3,16

Epaisseur de l'écorce ( $10^{-2}$ )

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,45	0,12	0,61	0,04	1,80	0,42	11,3	12,6
Tige	3	0,14	0,07	0,091	0,35	0,96	0,09	1,6	3,5
Erreur	2	0,15	0,37	0,95	0,5	2,70	0,78	0,8	2,3

**Surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème ( $10^{-5}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	9,3	0,58	0,12	0,11	1,25	0,039	0,52	0,82
Tige	3	1,5	11,27	10,87	1,12	6,29	1,62	0,68	1,93
Erreur	2	0,69	23,86	5,88	0,065	8,57	0,19	3,97	0,84

**Surface moyenne des lumières des fibres du xylème ( $10^{-7}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	3,2	5,6	1,9	1,4	2,5	6,8	2,1	1,8
Tige	3	7,6		0,4	1,2	1,3	0,3	2,2	6,1
Erreur	2	2,7	0,8	1,6	1,0	2,1	0,5	3,3	2,0

**Densité surfacique de parois du xylème ( $10^{-3}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,21	3,35	0,56	1,74	9,78	6,15*	0,42	5,41
Tige	3	0,045	2,99	0,045	2,43	0,98	2,19	3,53	4,27
Erreur	2	0,59	3,72	0,21	1,46	0,64	0,28	1,24	1,34

**Epaisseur des parois du xylème ( $10^{-6}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	5,0	19,8	2,67	0,22	6,19	29,1	11,97	4,65
Tige	3	3,6	19,05	26,03	4,50	6,81	212,3	1,60	3,72
Erreur	2	1,6	2,78	2,09	7,02	8,06	4,44	0,85	0,56

**II- Géotype D-****Distance entre l'épiderme et le bord externe du parenchyme médullaire ( $10^{-2}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,41	0,10	0,53	0,19	0,27	2,52	3,35	0,09
Tige	3	1,09	0,28	0,89	0,70	0,37	1,45	4,95	0,75
Erreur	2	0,13	0,06	0,47	0,70	0,34	0,43	1,28	0,24

**Proportions de parenchyme médullaire ( $10^{-2}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,24	0,59	2,44	6,86	2,72	0,94	0,35	0,19
Tige	3	0,47	1,30	0,83	3,37	3,69	5,46	2,06	0,57
Erreur	2	1,1	0,53	1,05	5,07	3,07	4,21	0,28	0,48

**Proportions d'écorce plus faiscaux ( $10^{-2}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,054	0,59	0,17	0,14	0,12	1,15	0,35*	0,19
Tige	3	0,44	1,30	0,098	0,18	0,038	0,61	2,06*	0,57
Erreur	2	0,46	0,53	0,042	0,066	0,15	0,02	0,28	0,48

**Proportions de xylème dans la coupe moins le parenchyme médullaire ( $10^{-2}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	-	0,007	0,13	0,019	0,0057	0,23	0,6	0,70*
Tige	3	-	0,85	0,33	0,0005	0,0084	0,16	0,5	0,055
Erreur	2	-	0,09	0,87	0,13	0,24	0,12	0,25	0,024

**Proportions de xylème dans la coupe ( $10^{-2}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	-	0,05	0,01	0,203*	0,64	0,42	0,34	0,04
Tige	3	-	0,04	0,04	0,017	0,006	0,65	0,83*	0,35
Erreur	2	-	0,07	0,02	0,005	0,16	0,22	0,04	0,20

**Epaisseur de l'écorce ( $10^{-2}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	-	0,001	0,019	0,006	0,09	0,097	0,000001	0,53
Tige	3	-	0,013	0,068	0,120	0,09	0,090	0,054	0,024
Erreur	2	-	0,012	0,019	0,070	0,05	0,057	0,21	0,11

**Surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème ( $10^{-5}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,01	0,17	0,007	1,31	1,98	0,03	6,32*	2,10
Tige	3	2,00	1,76	31,4	4,93	0,18	2,09	0,90	4,75
Erreur	2	0,98	1,49	15,6	11,16	16,79	4,81	0,018	4,8

**Surface moyenne des lumières des fibres du xylème ( $10^{-7}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	4,7		3,4	0,8		0,2	0,5	2,0
Tige	3	1,1	1,0	0,8	1,1	0,3	0,7	0,2	0,2
Erreur	2	15,8	0,4	6,4	4,2	2,1	1,6	1,7	3,7

**Densité surfacique de parois du xylème ( $10^{-3}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	0,92	2,08	1,64	0,26	0,1	5,15	6,88	3,73
Tige	3	1,38	0,21	1,43	4,43	0,76	1,13	0,07	0,28
Erreur	2	0,77	0,66	6,61	0,22	9,05	4,88	7,01	8,34

**Epaisseur des parois du xylème ( $10^{-6}$ )**

	d,d,l	1	2	3	4	5	6	7	8
Coupe	1	32,79	51,35	0,45	12,71	5,11	31,7	41,16	10,99
Tige	3	9,55	3,62	12,81	8,02	12,39	5,03	0,79	3,97
Erreur	2	3,29	2,94	34,80	11,93	45,18	3,32	4,74	0,19

## Annexe 3.2

Marqueurs significatifs ( $p < 0.05$ ) pour le parent Magali à l'issu de l'analyse de variance (GLM)

(MARQ : Nom du marqueur testé dans le modèle, VAR : variable testée, DFE : degrés de libertés de l'erreur résiduelle, SSE : somme des carrés de l'erreur résiduelle, DFMODEL : degrés de liberté du modèle, F : , PROB: probabilité associée, RSQUARE :  $R^2$  associé à chaque marqueur)

MARQ	VAR	DFE	SSE	DFMODEL	SSMODEL	F	PROB	RSQUARE
ACAG155	H	136	19697.98	1	658.58	4.5470	0.03477	0.03235
ACAG500	H	136	19100.20	1	1256.36	8.9457	0.00330	0.06172
ACTA195d	H	101	13021.86	1	540.29	4.1906	0.04325	0.03984
ACTA231	H	127	16512.64	1	645.13	4.9617	0.02768	0.03760
ACTA287	H	127	16795.22	1	709.76	5.3670	0.02212	0.04055
CAAG305	H	121	17070.31	1	661.45	4.6886	0.03233	0.03730
CCAC286	H	151	20352.62	1	977.19	7.2499	0.00789	0.04581
CCAC300d	H	151	20742.28	1	587.53	4.2771	0.04034	0.02755
CCAC88	H	149	19191.72	1	1976.09	15.3419	0.00014	0.09335
CCTC165	H	129	18532.65	1	681.49	4.7437	0.03122	0.03547
CTAC106d	H	150	20141.08	1	1036.79	7.7214	0.00616	0.04896
GCAC86d	H	152	20311.91	1	1050.48	7.8610	0.00571	0.04917
GGAA120	H	152	20777.27	1	662.16	4.8442	0.02925	0.03089
GGAA133	H	151	19985.66	1	1378.21	10.4130	0.00153	0.06451
GGAA155	H	152	20897.81	1	541.63	3.9395	0.04896	0.02526
GGAA287	H	152	20791.37	1	648.07	4.7378	0.03105	0.03023
GGAA360	H	152	20724.97	1	714.47	5.2400	0.02345	0.03333
GGAG216	H	149	20256.71	1	1012.12	7.4448	0.00713	0.04759
GGAG259d	H	150	20037.55	1	1150.25	8.6107	0.00387	0.05429
GGAG270d	H	148	18498.66	1	1149.86	9.1996	0.00286	0.05852
GGAG98	H	149	20318.23	1	950.60	6.9711	0.00917	0.04469
GGTA149	H	147	20013.31	1	788.66	5.7928	0.01733	0.03791
MTR58B	H	157	20446.39	1	1978.07	15.1888	0.00014	0.08821
X870E	H	153	21501.02	1	710.77	5.0578	0.02594	0.03200
ACAG500	DIAM	136	174977869414.66	1	5107691319.95	3.9699	0.04832	0.02836
ACTA92d	DIAM	138	175359027159.62	1	4991065434.80	3.9278	0.04948	0.02767
ACTG120d	DIAM	110	128639125010.45	1	7451420441.99	6.3717	0.01302	0.05475
ACTG121d	DIAM	109	129655994929.41	1	5279339490.99	4.4383	0.03744	0.03912
CAAG232	DIAM	122	136813423461.21	1	5048691997.59	4.5020	0.03588	0.03559
CCAC286	DIAM	151	179462864354.94	1	4853619759.39	4.0838	0.04506	0.02633
CCAC300d	DIAM	151	173630033878.25	1	10686450236.08	9.2936	0.00272	0.05798
CGAT195d	DIAM	114	128566775942.86	1	6779591136.75	6.0115	0.01573	0.05009
CTAC202	DIAM	153	174210415226.63	1	10317742329.99	9.0615	0.00305	0.05591
GCAC102	DIAM	152	179015431110.23	1	5706898677.31	4.8457	0.02922	0.03089
GGAA120	DIAM	152	174276780630.56	1	9969342858.28	8.6950	0.00370	0.05411
GGAA145	DIAM	152	175201350555.70	1	9044772933.13	7.8470	0.00575	0.04909
GGAA360	DIAM	152	176405245348.40	1	7840878140.44	6.7561	0.01026	0.04256
GGAG136	DIAM	149	172698841665.61	1	8276688766.17	7.1409	0.00837	0.04573
GGAG216	DIAM	149	174500259853.29	1	6475270578.48	5.5290	0.02001	0.03578
MTR58B	DIAM	157	198818045651.74	1	4964455428.75	3.9203	0.04946	0.02436
ACTA112d	PECORCE	138	120284611.74	1	4132117.25	4.7407	0.03116	0.03321
ACTA305d	PECORCE	133	117912946.53	1	5376097.87	6.0640	0.01508	0.04361
ACTG121d	PECORCE	109	87821509.18	1	3265241.85	4.0527	0.04657	0.03585
CAAG170d	PECORCE	122	105114637.83	1	5474176.58	6.3535	0.01301	0.04950
CAAG203	PECORCE	122	105656758.80	1	4932055.62	5.6950	0.01855	0.04460
CAAG231	PECORCE	122	100261103.53	1	10327710.89	12.5670	0.00056	0.09339
CCAC286	PECORCE	151	125597256.88	1	4145226.70	4.9836	0.02706	0.03195
CCAC300d	PECORCE	151	124460256.08	1	5282227.50	6.4086	0.01238	0.04071
CCAC88	PECORCE	149	120598159.47	1	7945018.73	9.8161	0.00208	0.06181

CCTT138d	PECORCE	154	123735240.29	1	8097234.86	10.0778	0.00181	0.06142
CCTT145	PECORCE	153	126604649.64	1	5091076.34	6.1525	0.01421	0.03866
CCTT166d	PECORCE	154	127635066.41	1	4197408.74	5.0644	0.02584	0.03184
CGAT115	PECORCE	115	93489837.90	1	4127439.24	5.0771	0.02614	0.04228
CGAT188d	PECORCE	113	93882494.50	1	3410621.45	4.1051	0.04511	0.03506
CGAT215	PECORCE	114	93439578.56	1	4249398.22	5.1844	0.02466	0.04350
CGAT216	PECORCE	114	92067528.40	1	5621448.39	6.9606	0.00950	0.05754
CTAC183	PECORCE	153	125227099.53	1	6040497.02	7.3802	0.00735	0.04602
CTTT126	PECORCE	124	94781112.40	1	3663124.46	4.7924	0.03046	0.03721
GGAA117d	PECORCE	151	125108820.19	1	5808170.05	7.0102	0.00897	0.04437
GGAA120	PECORCE	152	127406136.19	1	3680820.02	4.3913	0.03778	0.02808
GGAA145	PECORCE	152	125319932.32	1	5767023.90	6.9948	0.00903	0.04399
GGAG140	PECORCE	149	122966933.86	1	3837702.09	4.6502	0.03265	0.03026
GGAG216	PECORCE	149	121444033.36	1	5360602.58	6.5769	0.01132	0.04227
GGAG265	PECORCE	151	125393776.25	1	3691764.98	4.4456	0.03664	0.02860
GGAG270d	PECORCE	148	119124488.11	1	9158472.96	11.3785	0.00095	0.07139
MTR58B	PECORCE	157	126121936.84	1	8484175.76	10.5613	0.00141	0.06303
X456C	PECORCE	157	124836955.03	1	9769157.57	12.2861	0.00059	0.07258
X456D	PECORCE	157	130802326.11	1	3803786.49	4.5656	0.03417	0.02826
ACTA231	PXYL	127	780648964.08	1	29544806.30	4.8065	0.03017	0.03647
ACTA287	PXYL	127	726064028.08	1	85787465.87	15.0056	0.00017	0.10567
ACTG197d	PXYL	109	705610432.35	1	41951524.64	6.4805	0.01230	0.05612
AFct32E	PXYL	157	972773685.41	1	32538847.66	5.2516	0.02326	0.03237
CAAG190	PXYL	122	737542931.25	1	26435380.42	4.3728	0.03859	0.03460
CCAC164	PXYL	150	965996793.69	1	28500117.25	4.4255	0.03707	0.02866
CCAC236	PXYL	151	947533009.74	1	46976312.03	7.4862	0.00696	0.04724
CCTC165	PXYL	129	808192065.21	1	29632481.10	4.7298	0.03147	0.03537
CTAC212	PXYL	153	974298402.75	1	25672167.47	4.0315	0.04642	0.02567
CTAC280	PXYL	154	973508365.76	1	27591125.80	4.3647	0.03834	0.02756
CTTT198	PXYL	124	756148307.96	1	44879938.74	7.3598	0.00762	0.05603
GCAC166	PXYL	152	951826916.61	1	47232100.74	7.5426	0.00675	0.04728
GGTA237d	PXYL	146	934976762.65	1	31825522.18	4.9697	0.02732	0.03292
ACAG175	PPAR	130	647734118.78	1	23566834.21	4.7299	0.03145	0.03511
ACTA287	PPAR	127	653162886.60	1	48058882.66	9.3445	0.00273	0.06854
ACTG180	PPAR	109	607707510.33	1	23856804.75	4.2790	0.04095	0.03777
ACTG197d	PPAR	109	595232603.37	1	36331711.71	6.6531	0.01123	0.05753
AFct32E	PPAR	157	835957760.16	1	35447717.17	6.6574	0.01079	0.04068
CAAG168	PPAR	123	625404018.17	1	25297373.88	4.9753	0.02752	0.03888
CAAG203	PPAR	122	627795977.43	1	22397672.92	4.3526	0.03904	0.03445
CCAC236	PPAR	151	816813626.50	1	30371185.03	5.6146	0.01908	0.03585
CTAC212	PPAR	153	833709721.31	1	21391106.26	3.9256	0.04935	0.02502
CTTT198	PPAR	124	625876752.83	1	32336602.67	6.4066	0.01262	0.04913
GCAC166	PPAR	152	824985419.02	1	29465848.38	5.4290	0.02112	0.03449
GCAT155d	PPAR	153	790802130.77	1	27026130.20	5.2289	0.02359	0.03305
GGAA93	PPAR	91	492075210.01	1	22102771.15	4.0875	0.04614	0.04299
GGAG98	PPAR	149	801788712.09	1	21731147.39	4.0384	0.04628	0.02639
GGTA128	PPAR	147	797889282.19	1	29757491.05	5.4824	0.02055	0.03595
ACAG205	LVX	136	44945712.87	1	1334784.87	4.0389	0.04644	0.02884
ACAG295d	LVX	136	43952448.03	1	2328049.70	7.2036	0.00818	0.05030
ACTA202	LVX	121	36027284.07	1	1270165.69	4.2659	0.04102	0.03406
ACTG121d	LVX	109	37830475.07	1	1441681.81	4.1539	0.04396	0.03671
ACTG181	LVX	109	37538259.90	1	1733896.98	5.0347	0.02686	0.04415
CCTT145	LVX	153	48843251.17	1	1677300.50	5.2541	0.02326	0.03320
CGAT215	LVX	114	38969832.65	1	1525912.28	4.4638	0.03680	0.03768
CGAT216	LVX	114	38944249.38	1	1551495.55	4.5416	0.03523	0.03831
CTAC107	LVX	151	46204678.31	1	4812354.89	15.7271	0.00011	0.09433
GCAC107	LVX	152	47652133.65	1	2865476.71	9.1403	0.00294	0.05672
GGAA135	LVX	152	48653457.60	1	2301560.38	7.1904	0.00814	0.04517
GGAA233	LVX	138	43422826.04	1	2321368.60	7.3774	0.00745	0.05075
GGAG137	LVX	148	46991621.80	1	2128828.77	6.7047	0.01058	0.04334
MTP66A	LVX	157	49501396.16	1	1791285.05	5.6813	0.01834	0.03492
X456D	LVX	157	49879274.83	1	1413406.39	4.4488	0.03651	0.02756
ACTA195d	LFX	101	31880.07	1	1385.52	4.3895	0.03866	0.04165



CCTC200d LFX	129	37029.95	1	2243.61	7.8160	0.00597	0.05713
CGAT195d LFX	114	32133.26	1	1885.10	6.6878	0.01097	0.05541
CTAC107 LFX	151	43632.04	1	2147.33	7.4314	0.00717	0.04691
CTAC212 LFX	153	44348.15	1	1461.34	5.0416	0.02618	0.03190
GCAT370d LFX	153	44143.38	1	1928.29	6.6834	0.01067	0.04185
GGAG382d LFX	144	43596.66	1	1815.62	5.9970	0.01553	0.03998
ACTA173 DPAR	136	699632627.01	1	23096231.42	4.4896	0.03592	0.03196
ACTA305d DPAR	133	695351956.31	1	21358792.77	4.0853	0.04526	0.02980
ACTG133d DPAR	109	597170246.31	1	48886893.96	8.9232	0.00348	0.07567
CAAG168 DPAR	123	646003876.00	1	29249944.77	5.5692	0.01985	0.04332
CAAG320 DPAR	125	661815095.40	1	27708621.53	5.2335	0.02384	0.04019
CCAC88 DPAR	149	783821309.31	1	20886195.32	3.9703	0.04813	0.02596
CCTC165 DPAR	129	675800761.68	1	40638047.31	7.7572	0.00616	0.05672
CCTC200d DPAR	129	690172919.40	1	26265889.59	4.9093	0.02847	0.03666
CCTT166d DPAR	154	759806194.83	1	52302532.32	10.6008	0.00139	0.06440
CCTT230 DPAR	152	774846168.39	1	34658904.96	6.7990	0.01003	0.04281
CTAC106d DPAR	150	750455996.98	1	47236091.49	9.4415	0.00252	0.05922
CTAC274 DPAR	153	761247088.22	1	37312480.40	7.4993	0.00691	0.04672
CTTT180 DPAR	121	621781167.69	1	24003690.28	4.6712	0.03264	0.03717
GCAC99 DPAR	152	787422234.77	1	22087056.58	4.2636	0.04064	0.02728
GGAA155 DPAR	152	786256389.58	1	23206962.01	4.4864	0.03579	0.02867
GGAG259d DPAR	150	744636750.13	1	41202327.21	8.2998	0.00455	0.05243
GGTA149 DPAR	147	759194755.36	1	32420500.50	6.2775	0.01332	0.04095
MTR58B DPAR	157	801560268.81	1	28383439.43	5.5594	0.01961	0.03420
X206A DPAR	157	804435789.03	1	25507919.21	4.9783	0.02708	0.03073
ACAG260 EPPAR	136	213924744.18	1	6540826.93	4.1582	0.04337	0.02967
ACAG400 EPPAR	136	213369823.40	1	7095747.70	4.5228	0.03525	0.03219
ACTA202 EPPAR	121	184041214.45	1	6093878.30	4.0065	0.04756	0.03205
ACTG400d EPPAR	109	175285420.28	1	7088075.68	4.4077	0.03809	0.03887
CAAG169d EPPAR	121	194849417.44	1	8637659.16	5.3639	0.02224	0.04245
CCAC236 EPPAR	151	227391556.34	1	12200394.14	8.1017	0.00504	0.05092
CCAC286 EPPAR	151	221604159.30	1	17987791.17	12.2568	0.00061	0.07508
CCTT126 EPPAR	154	229714368.45	1	10954463.32	7.3438	0.00749	0.04552
CTAC202 EPPAR	153	233845739.18	1	6837789.92	4.4738	0.03604	0.02841
CTTT151d EPPAR	124	196989844.88	1	7061989.44	4.4453	0.03701	0.03461
CTTT198 EPPAR	124	196537528.76	1	7514305.56	4.7409	0.03135	0.03683
GCAC102 EPPAR	152	231407368.57	1	8224080.97	5.4020	0.02144	0.03432
GCAC238 EPPAR	151	232938849.46	1	6593298.08	4.2740	0.04041	0.02753
GCAC380d EPPAR	142	221970391.83	1	10320707.16	6.6024	0.01122	0.04443
GCAC86d EPPAR	152	233084643.40	1	6546806.14	4.2693	0.04050	0.02732
GGAA145 EPPAR	152	226560816.10	1	10691543.31	7.1730	0.00822	0.04506
GGAA155 EPPAR	152	225462007.80	1	11790351.61	7.9487	0.00545	0.04970
GGAA279 EPPAR	151	228339204.88	1	8842106.35	5.8473	0.01679	0.03728
GGAA86 EPPAR	115	174359054.21	1	7801896.72	5.1458	0.02517	0.04283
GGAG229d EPPAR	149	226439911.62	1	8590513.14	5.6527	0.01870	0.03655
GGTA237d EPPAR	146	225911645.23	1	6118483.01	3.9542	0.04862	0.02637
ACAG290 PCT	136	754.51	1	35.30	6.3629	0.01281	0.04469
ACTA287 PCT	127	640.73	1	37.61	7.4554	0.00722	0.05544
ACTA305d PCT	133	663.61	1	32.00	6.4126	0.01249	0.04600
CAAG305 PCT	121	585.69	1	33.61	6.9427	0.00952	0.05427
CCAC164 PCT	150	830.72	1	24.82	4.4809	0.03593	0.02901
CCTT145 PCT	153	839.76	1	22.41	4.0821	0.04508	0.02599
CCTT193d PCT	141	740.99	1	39.47	7.5106	0.00693	0.05057
CTAC106d PCT	150	840.92	1	28.26	5.0403	0.02623	0.03251
CTAC274 PCT	153	851.75	1	21.77	3.9106	0.04978	0.02492
CTTT151d PCT	124	690.94	1	25.37	4.5525	0.03484	0.03542
GCAC99 PCT	152	813.90	1	45.46	8.4890	0.00411	0.05290
GCAT227 PCT	152	873.79	1	27.99	4.8692	0.02884	0.03104
GCAT232 PCT	152	882.80	1	24.11	4.1509	0.04335	0.02658
GGAA135 PCT	152	834.22	1	25.95	4.7287	0.03121	0.03017
GGAA287 PCT	152	832.71	1	27.47	5.0134	0.02660	0.03194
GGAA360 PCT	152	835.01	1	25.17	4.5809	0.03392	0.02926
GGAG137 PCT	148	838.81	1	27.52	4.8556	0.02910	0.03177
GGAG218 PCT	149	834.25	1	32.13	5.7387	0.01784	0.03709

---

GGAG259d	PCT 150	838.28	1	31.66	5.6649	0.01856	0.03639
GGAG91	PCT 151	818.11	1	51.88	9.5757	0.00235	0.05963
GGTA315	PCT 147	825.65	1	25.36	4.5143	0.03528	0.02980
MTR58B	PCT 157	919.81	1	26.66	4.5498	0.03448	0.02817
X870E	PCT 153	815.16	1	34.91	6.5530	0.01144	0.04107

Marqueurs significatifs ( $p < 0.05$ ) pour le parent Mercedes à l'issu de l'analyse de variance (GLM)

MARQ	VAR	DFE	SSE	DFMODEL	SSMODEL	F	PROB	RSQUARE
ACAG124	H	136	19768.85	1	587.71	4.0432	0.04633	0.02887
ACAG250	H	131	18866.71	1	606.87	4.2138	0.04209	0.03116
ACTA106d	H	140	18427.98	1	696.52	5.2916	0.02291	0.03642
ACTA231	H	127	16512.64	1	645.13	4.9617	0.02768	0.03760
ACTA287	H	127	16795.22	1	709.76	5.3670	0.02212	0.04055
AFct32D	H	157	21577.44	1	847.02	6.1630	0.01410	0.03777
CCAC286	H	151	20352.62	1	977.19	7.2499	0.00789	0.04581
CCTC231	H	129	18056.53	1	1157.61	8.2702	0.00472	0.06025
CCTT312	H	152	20571.14	1	650.16	4.8040	0.02992	0.03064
CGAT121	H	115	15692.41	1	1190.84	8.7269	0.00380	0.07053
CTAC106d	H	150	20141.08	1	1036.79	7.7214	0.00616	0.04896
CTAC135	H	151	20604.86	1	675.08	4.9472	0.02762	0.03172
CTTT133	H	124	15031.44	1	1661.04	13.7026	0.00032	0.09951
GCAC196	H	152	20258.98	1	1103.40	8.2786	0.00459	0.05165
GCAC203	H	152	20172.78	1	1189.60	8.9635	0.00322	0.05569
GCAC235	H	151	20314.37	1	810.70	6.0261	0.01523	0.03838
GCAC86d	H	152	20311.91	1	1050.48	7.8610	0.00571	0.04917
GCAT270	H	153	21061.21	1	590.98	4.2932	0.03994	0.02729
GGAA105	H	152	20530.09	1	909.35	6.7326	0.01039	0.04241
GGAA133	H	151	19985.66	1	1378.21	10.4130	0.00153	0.06451
GGAA155	H	152	20897.81	1	541.63	3.9395	0.04896	0.02526
GGAA94	H	151	19100.50	1	701.38	5.5448	0.01982	0.03542
GGAG98	H	149	20318.23	1	950.60	6.9711	0.00917	0.04469
GGTA149	H	147	20013.31	1	788.66	5.7928	0.01733	0.03791
GGTA157	H	147	19641.58	1	1160.39	8.6845	0.00373	0.05578
X870E	H	153	21501.02	1	710.77	5.0578	0.02594	0.03200
ACAG130	DIAM	136	17502820258841	1	505735814619.98	3.9297	0.04946	0.02808
ACTA92d	DIAM	138	17535902715963	1	499106543479.73	3.9278	0.04948	0.02767
ACTG242	DIAM	110	12997015008934	1	543653348622.72	4.6012	0.03415	0.04015
CAAG232	DIAM	122	13681342346121	1	504869199759.05	4.5020	0.03588	0.03559
CCAC286	DIAM	151	17946286435494	1	485361975938.60	4.0838	0.04506	0.02633
CCTC225	DIAM	129	15910569872791	1	756442259629.06	6.1331	0.01456	0.04539
CCTC231	DIAM	129	15442408735128	1	1224603397291.6	10.2299	0.00174	0.07347
CTTT133	DIAM	124	13218132901688	1	524796210344.96	4.9231	0.02832	0.03819
GCAC196	DIAM	152	17970575198258	1	501657780495.24	4.2432	0.04111	0.02716
GCAC235	DIAM	151	17715684335546	1	635023440726.34	5.4126	0.02132	0.03460
GGAG136	DIAM	149	17269884166560	1	827668876617.15	7.1409	0.00837	0.04573
ACAG150	PECORCE	133	11424956311.26	1	468123441.33	5.4495	0.02107	0.03936
ACTA244	PECORCE	132	11917674549.14	1	380502432.95	4.2144	0.04206	0.03094
ACTA270d	PECORCE	132	11687598183.06	1	610578799.03	6.8959	0.00966	0.04965
ACTA305d	PECORCE	133	11791294653.10	1	537609786.90	6.0640	0.01508	0.04361
CAAG203	PECORCE	122	10565675880.38	1	493205561.56	5.6950	0.01855	0.04460
CCAC123	PECORCE	150	12616270132.78	1	350739401.43	4.1701	0.04290	0.02705
CCAC125	PECORCE	150	12623202928.36	1	343806605.85	4.0854	0.04503	0.02651
CCAC286	PECORCE	151	12559725688.13	1	414522670.04	4.9836	0.02706	0.03195
CCTC240	PECORCE	129	10484431456.95	1	326008930.84	4.0112	0.04730	0.03016
CCTT166d	PECORCE	154	12763506640.86	1	419740873.89	5.0644	0.02584	0.03184
CGAT340	PECORCE	115	9200816922.75	1	568126402.03	7.1009	0.00881	0.05816
CTAC370	PECORCE	154	12799780314.88	1	379589485.12	4.5670	0.03417	0.02880
CTTT133	PECORCE	124	9306325005.88	1	538098679.83	7.1698	0.00842	0.05466
CTTT231	PECORCE	124	9281901760.13	1	562521925.58	7.5149	0.00702	0.05714
GCAC196	PECORCE	152	11776724243.27	1	1322334365.17	17.0671	0.00006	0.10095
GCAC203	PECORCE	152	12041592553.90	1	1057466054.55	13.3483	0.00036	0.08073
GCAC235	PECORCE	151	12388523780.38	1	700827542.49	8.5422	0.00400	0.05354
GGAA17d	PECORCE	151	12510882019.50	1	580817005.34	7.0102	0.00897	0.04437

GGAG265	PECORCE	151	12539377624.73	1	369176498.15	4.4456	0.03664	0.02860
GGAG269	PECORCE	149	12148674106.40	1	531789488.30	6.5222	0.01166	0.04194
GGTA157	PECORCE	147	11638635605.82	1	448137611.63	5.6601	0.01864	0.03708
MTP66C	PECORCE	157	13000107960.24	1	460503300.14	5.5614	0.01959	0.03421
X456C	PECORCE	157	12483695503.35	1	976915757.03	12.2861	0.00059	0.07258
ACAG150	PXYL	133	82389945008.26	1	3383291565.07	5.4616	0.02093	0.03944
ACTA106d	PXYL	140	83334259959.50	1	4049868302.47	6.8037	0.01008	0.04635
ACTA231	PXYL	127	78064896408.46	1	2954480630.30	4.8065	0.03017	0.03647
ACTA287	PXYL	127	72606402807.95	1	8578746587.39	15.0056	0.00017	0.10567
AFct32C	PXYL	157	97688130106.34	1	2843123200.57	4.5693	0.03410	0.02828
C12F1C	PXYL	156	97497537785.72	1	2824121594.66	4.5187	0.03510	0.02815
CCAC184d	PXYL	150	95891267093.60	1	3558424000.47	5.5663	0.01960	0.03578
CCTT107	PXYL	154	96305178148.33	1	3676018651.67	5.8783	0.01649	0.03677
CCTT203	PXYL	154	95310927188.57	1	4670269611.43	7.5461	0.00673	0.04671
CTTT420d	PXYL	120	71291757686.96	1	2940110670.42	4.9489	0.02798	0.03961
GCAT128	PXYL	153	91295279128.84	1	4756349835.03	7.9711	0.00539	0.04952
GGAA91	PXYL	153	96556744213.84	1	3524923457.13	5.5855	0.01937	0.03522
GGTA106	PXYL	147	93068841731.34	1	3970543092.82	6.2714	0.01336	0.04092
GGTA237d	PXYL	146	93497676265.11	1	3182552218.00	4.9697	0.02732	0.03292
GGTA262	PXYL	149	92481416726.94	1	5248497569.75	8.4560	0.00420	0.05370
ACAG175	PPAR	130	64773411878.50	1	2356683420.74	4.7299	0.03145	0.03511
ACTA106d	PPAR	140	71905319755.59	1	2946447416.25	5.7367	0.01794	0.03936
ACTA287	PPAR	127	65316288659.84	1	4805888265.74	9.3445	0.00273	0.06854
ACTG180	PPAR	109	60770751033.23	1	2385680474.88	4.2790	0.04095	0.03777
AFct32C	PPAR	157	84317952172.21	1	2822595561.12	5.2557	0.02320	0.03239
CAAG168	PPAR	123	62540401816.50	1	2529737388.29	4.9753	0.02752	0.03888
CAAG203	PPAR	122	62779597742.62	1	2239767292.06	4.3526	0.03904	0.03445
CCAC106	PPAR	150	82164794001.22	1	2492984519.18	4.5512	0.03452	0.02945
CCTT107	PPAR	154	82336099393.30	1	3597042167.59	6.7278	0.01041	0.04186
CCTT203	PPAR	154	82642947714.28	1	3290193846.61	6.1311	0.01436	0.03829
CTTT420d	PPAR	120	59061795596.86	1	3491469937.56	7.0939	0.00880	0.05582
GCAT128	PPAR	153	79210659872.22	1	2572166224.54	4.9683	0.02727	0.03145
GGAA91	PPAR	153	83035393144.16	1	2478818929.38	4.5674	0.03417	0.02899
GGAG98	PPAR	149	80178871208.95	1	2173114739.40	4.0384	0.04628	0.02639
GGTA106	PPAR	147	78422324982.04	1	4342352341.46	8.1396	0.00496	0.05247
GGTA262	PPAR	149	79079596444.88	1	4472341990.88	8.4267	0.00426	0.05353
ACAG103	LVX	136	4467907122.59	1	160142651.38	4.8746	0.02893	0.03460
ACAG205	LVX	136	4494571286.65	1	133478487.32	4.0389	0.04644	0.02884
ACTA106d	LVX	140	4369457835.41	1	180038423.59	5.7685	0.01763	0.03957
ACTA202	LVX	121	3602728406.96	1	127016569.01	4.2659	0.04102	0.03406
CAAG142	LVX	122	3940772286.03	1	240079506.58	7.4325	0.00735	0.05742
CAAG143	LVX	122	3940772286.03	1	240079506.58	7.4325	0.00735	0.05742
CCTC205d	LVX	129	4241906926.21	1	264692587.96	8.0495	0.00529	0.05873
CTAC107	LVX	151	4620467830.62	1	481235489.27	15.7271	0.00011	0.09433
CTAC275	LVX	153	4975092885.12	1	127217807.87	3.9124	0.04973	0.02493
CTAC93	LVX	151	4948374178.05	1	153329141.84	4.6788	0.03211	0.03005
CTTT133	LVX	124	4273745079.14	1	162409685.40	4.7122	0.03185	0.03661
CTTT420d	LVX	120	4096189306.89	1	277729508.27	8.1362	0.00511	0.06350
GCAC107	LVX	152	4765213364.98	1	286547670.56	9.1403	0.00294	0.05672
GCAC203	LVX	152	4923806876.60	1	127954158.94	3.9500	0.04867	0.02533
GCAC235	LVX	151	4874809739.52	1	176712481.40	5.4738	0.02061	0.03498
GCAC370d	LVX	142	4665148304.23	1	180974753.26	5.5086	0.02030	0.03734
GGTA157	LVX	147	4684019512.95	1	196990281.72	6.1822	0.01402	0.04036
MTP66A	LVX	157	4950139616.50	1	179128505.35	5.6813	0.01834	0.03492
ACAG117	LFX	136	4018047.79	1	145676.04	4.9307	0.02804	0.03499
ACAG450	LFX	136	4029738.92	1	133984.92	4.5219	0.03527	0.03218
ACAG460	LFX	136	3976683.57	1	187040.26	6.3967	0.01258	0.04492
ACTA244	LFX	132	3678493.17	1	238966.91	8.5752	0.00402	0.06100
ACTG242	LFX	110	3242380.90	1	127900.43	4.3391	0.03956	0.03795
CAAG228d	LFX	122	3521421.05	1	120725.73	4.1826	0.04299	0.03315
CTAC107	LFX	151	4363204.07	1	214733.14	7.4314	0.00717	0.04691
GCAC203	LFX	152	4283359.93	1	276479.85	9.8112	0.00208	0.06063
GCAT370d	LFX	153	4414337.96	1	192829.15	6.6834	0.01067	0.04185
GGAA114	LFX	152	4410029.68	1	171913.85	5.9253	0.01608	0.03752



GGAA225d	LFX	150	4343124.74	1	135854.63	4.6921	0.03188	0.03033
GGAA295	LFX	152	4400233.65	1	181709.87	6.2769	0.01329	0.03966
GGTA262	LFX	149	4322939.78	1	169840.51	5.8539	0.01675	0.03780
X870D	LFX	153	4409935.54	1	167533.13	5.8125	0.01710	0.03660
ACAG150	DPAR	133	71383672744.74	1	2581846830.08	4.8104	0.03003	0.03491
ACTA106d	DPAR	140	71962756514.18	1	2102996781.60	4.0913	0.04501	0.02839
ACTA175	DPAR	134	69099082746.46	1	2768145393.97	5.3681	0.02202	0.03852
ACTA305d	DPAR	133	69535195631.22	1	2135879276.93	4.0853	0.04526	0.02980
CAAG168	DPAR	123	64600387599.85	1	2924994476.96	5.5692	0.01985	0.04332
CAAG320	DPAR	125	66181509540.15	1	2770862152.77	5.2335	0.02384	0.04019
CCAC184d	DPAR	150	76574874674.41	1	3933669072.97	7.7055	0.00621	0.04886
CCTT166d	DPAR	154	75980619483.16	1	5230253231.59	10.6008	0.00139	0.06440
CCTT95	DPAR	152	78537366139.98	1	2413141195.08	4.6704	0.03225	0.02981
CGAT121	DPAR	115	56222195414.38	1	3032272977.07	6.2024	0.01419	0.05117
CGAT149	DPAR	113	56082014625.22	1	2665769832.17	5.3713	0.02227	0.04538
CTAC106d	DPAR	150	75045599697.92	1	4723609148.79	9.4415	0.00252	0.05922
CTAC275	DPAR	153	73719757639.16	1	6136199222.77	12.7352	0.00048	0.07684
CTTT133	DPAR	124	62904119413.44	1	3246868069.10	6.4004	0.01266	0.04908
GCAC196	DPAR	152	75369171718.21	1	5581757416.85	11.2570	0.00100	0.06895
GCAC235	DPAR	151	77716147421.53	1	3175754650.36	6.1704	0.01408	0.03926
GCAT128	DPAR	153	76588459047.89	1	3353969207.60	6.7002	0.01057	0.04195
GGAA155	DPAR	152	78625638957.54	1	2320696200.90	4.4864	0.03579	0.02867
GGTA113d	DPAR	147	76969701534.73	1	2191824051.85	4.1860	0.04254	0.02769
GGTA149	DPAR	147	75919475536.22	1	3242050050.35	6.2775	0.01332	0.04095
GGTA157	DPAR	147	76050951130.69	1	3110574455.89	6.0125	0.01538	0.03929
ACTA175	EPPAR	134	19864767170.50	1	755367240.53	5.0954	0.02561	0.03663
ACTA202	EPPAR	121	18404121445.23	1	609387829.56	4.0065	0.04756	0.03205
ACTG400d	EPPAR	109	17528542028.31	1	708807568.09	4.4077	0.03809	0.03887
CAAG169d	EPPAR	121	19484941744.44	1	863765915.72	5.3639	0.02224	0.04245
CCAC128	EPPAR	150	23327771202.84	1	625213386.63	4.0202	0.04676	0.02610
CCAC286	EPPAR	151	22160415929.77	1	1798779117.29	12.2568	0.00061	0.07508
CCTC260	EPPAR	128	20177356563.94	1	999761328.36	6.3422	0.01302	0.04721
CTTT231	EPPAR	124	19514833045.62	1	890350386.92	5.6574	0.01891	0.04363
GCAC115	EPPAR	148	22824959343.03	1	608860414.30	3.9479	0.04877	0.02598
GCAC238	EPPAR	151	23293884945.95	1	659329808.29	4.2740	0.04041	0.02753
GCAC86d	EPPAR	152	23308464340.31	1	654680613.59	4.2693	0.04050	0.02732
GCAT235	EPPAR	153	23109406412.99	1	811741816.69	5.3743	0.02176	0.03393
GCAT345	EPPAR	153	22619266293.86	1	1301881935.81	8.8061	0.00349	0.05442
GGAA155	EPPAR	152	22546200780.16	1	1179035160.75	7.9487	0.00545	0.04970
GGAA216	EPPAR	152	22335483421.21	1	1389752519.70	9.4577	0.00249	0.05858
GGAA295	EPPAR	152	23114219775.40	1	611016165.51	4.0181	0.04679	0.02575
GGTA237d	EPPAR	146	22591164523.48	1	611848300.85	3.9542	0.04862	0.02637
ACAG105	PCT	136	756228930434069	1	33584254047531	6.0398	0.01525	0.04252
ACAG130	PCT	136	736777380170295	1	53035804311306	9.7898	0.00215	0.06715
ACAG150	PCT	133	659493516330365	1	56930320446148	11.4811	0.00093	0.07946
ACTA287	PCT	127	640729126819507	1	37613321470221	7.4554	0.00722	0.05545
ACTA305d	PCT	133	663605214735060	1	31995573097452	6.4126	0.01249	0.04600
C12F1B	PCT	156	877422731539527	1	42987559686329	7.6429	0.00639	0.04670
CAAG201	PCT	122	594589704288028	1	24767856749093	5.0820	0.02596	0.03999
CCAC123	PCT	150	832895607222311	1	22642634635161	4.0778	0.04523	0.02647
CCTC240	PCT	129	660437963804136	1	21721914716504	4.2428	0.04143	0.03184
CCTT193d	PCT	141	740988085477672	1	39469934817624	7.5106	0.00693	0.05057
CGAT121	PCT	115	607866706423081	1	24866910753239	4.7045	0.03214	0.03930
CTAC106d	PCT	150	840915312001304	1	28256500908776	5.0403	0.02623	0.03251
CTAC148	PCT	150	840446683947906	1	28725128962174	5.1268	0.02499	0.03305
CTTT133	PCT	124	663474358136093	1	52827468471459	9.8732	0.00210	0.07375
GCAC196	PCT	152	836259751165249	1	23096457955391	4.1981	0.04219	0.02688
GCAC235	PCT	151	830956935239330	1	22238903921822	4.0412	0.04618	0.02607
GCAT232	PCT	152	882803337921522	1	24108242340110	4.1509	0.04335	0.02658
GGAG218	PCT	149	834246647785907	1	32131008506957	5.7387	0.01784	0.03709
GGTA157	PCT	147	811188502187379	1	39812835022093	7.2147	0.00806	0.04678
GGTA315	PCT	147	825645939201006	1	25355398008466	4.5143	0.03528	0.02979

MTR58A	PCT	157	899109519937602	1	47356625558847	8.2693	0.00459	0.05004
X870E	PCT	153	815161503362313	1	34913530511799	6.5530	0.01144	0.04107

## Annexe 3.3

Marqueurs significatifs ( $p < 0.05$ ) à l'issu du test non paramétrique de Wilcoxon de classement des données non appariées pour le rapport feuilles / tiges (FT) pour les deux parents

(MARQ : effet du marqueur, VAR : variable testée, PKW : probabilité associée)

Mercedes

MARQ	VAR	PKW
ACAG117	FT	0.03009
ACTA106d	FT	0.03226
ACTA175	FT	0.02307
AFct32C	FT	0.03874
CCAC187	FT	0.02236
CCTC231	FT	0.01592
CTAC106d	FT	0.04871
CTTT173d	FT	0.01749
GCAC88	FT	0.00187
GGAA105	FT	0.00043
GGAA133	FT	0.04147
GGAA94	FT	0.00151
GGTA149	FT	0.00097
GGTA157	FT	0.01657
GGTA237d	FT	0.00108

Magali

MARQ	VAR	PKW
ACAG500	FT	0.01669
CAAG230d	FT	0.04626
CCAC88	FT	0.00001
CCTT115	FT	0.02093
CGAT115	FT	0.02581
CGAT275	FT	0.00975
CTAC106d	FT	0.04871
CTAC97	FT	0.01673
CTTT126	FT	0.02625
GCAC213d	FT	0.03672
GGAA133	FT	0.04147
GGAA184	FT	0.02085
GGAA287	FT	0.00573
GGAG216	FT	0.04009
GGTA149	FT	0.00097
GGTA237d	FT	0.00108
MTR58B	FT	0.00123





## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1 : La luzerne (*Medicago sativa* L.). 1. graine, 2. gousse, 3. inflorescence et fleur, 4. racine pivotante, 5. feuille trifoliolée
- Figure 1.2 : Evolution du complexe *Medicago sativa* (Quiros et Bauchan, 1988)
- Figure 1.3 : Production de luzerne (en hectares) par région (données Agreste, 2000)
- Figure 1.4 : Développement d'une plante de luzerne (Martensen, cité dans Teuber et Brick, 1988)
- Figure 1.5 : Pivot et collet d'un pied de luzerne adulte (MoKeyeva, cité dans Teuber et Brick, 1988)
- Figure 1.6 : Développement des tiges de luzerne (Musgrave et Langer, 1977)
- Figure 1.7 : Digestibilité des tiges dominantes du peuplement en fonction de leur hauteur au cours d'une repousse pour deux variétés de luzerne (Luisante et Europe) (Lemaire et Allirand, 1993).
- Figure 1.8 : Les différents niveaux d'étude de la tige : biochimique, écophysiological, et anatomique (Vallet, 1997)
- Figure 1.9 : Evolution du rapport feuilles / tiges (F/T) au cours de repousses estivales de luzerne en fonction de la biomasse aérienne (Msa) en conditions irriguées ou sèches (Lemaire et Allirand, 1993).
- Figure 1.10 : Représentation schématique des faisceaux près de l'apex de tige montrant l'anatomie vasculaire de 5 entre-nœuds chez *Medicago lathyris*. Chaque feuille est fournie par un faisceau médian et 2 faisceaux latéraux. La phyllotaxie alternée des feuilles est indiquée par le départ des traces foliaires ABC, DEF, GHI, LMN, OPQ. Les faisceaux R, S, T et U fournissent les bourgeons axillaires (d'après Nägeli, 1858, dans Hayward, 1938).
- Figure 1.11 : Coupe longitudinale radiale du point végétatif caulinaire de luzerne (d'après Dobrenz et al., 1965, cité dans Teuber et Brick, 1988).
- Figure 1.12 : A- Image d'une coupe transversale de jeune tige de luzerne (X 30). B- Détail d'un faisceau au grossissement X 200, C- Schéma d'un faisceau : 1 épiderme, 2 Collenchyme, 3 Endoderme, 4 Fibres supraphloémiennes, 5 Phloème, 6 Cambium, 7 Xylème secondaire, 8 Xylème primaire, 9 Parenchyme médullaire ou moelle (d'après Hayward, 1938).
- Figure 1.13 : Schéma d'un faisceau de tige de luzerne mature (adapté de Hayward, 1938). Les illustrations photographiques sont prises au microscope à un objectif X10
- Figure 1.14 : Schéma d'un tube criblé du phloème en coupe longitudinale (adapté de Nultsch, 1998).
- Figure 1.15 : Schéma d'une coupe longitudinale dans le xylème primaire d'une dicotylédone (Bowes, 1996).
- Figure 1.16 : Aspects microscopiques d'une cellule végétale de feuille de blé, au niveau du sclérenchyme (d'après Brett et Waldron, 1992).
- Figure 1.17 : Association entre la cellulose et les autres polysides de la paroi primaire des dicotylédones (Carpita et Gibeault, 1993).
- Figure 1.18 : Schéma représentant les différentes couches constituant les parois des cellules végétales (d'après Roland, 1980)
- Figure 1.19 : Voies de biosynthèse des monolignols de la lignine. La voie en vert est la voie conduisant à la sous unité guaiacyl (G) et faisant intervenir la CCoAOMT. La voie en rouge indique une nouvelle voie de biosynthèse des sous-unités syringyl (S) où intervient la COMT dans les deux étapes de méthylation. La voie orange est potentiellement commune à la biosynthèse des deux sous-unités S et G (Parvathi et al., 2001).
- Figure 1.20 : Observation microscopique en fluorescence des fibres supraphloémiennes au niveau de l'entre-nœud 9 d'une tige de luzerne. La lignine des parois est autofluorescente. A :

- Seules les parois primaires fluorescent au niveau des fibres supraphloémiennes en début de différenciation. B : Fibres supraphloémiennes totalement différenciées, la fluorescence est observée également au niveau des parois secondaires. cp : parenchyme cortical, FS : fibres supraphloémiennes (Vallet et al., 1996).
- Figure 1.21 : Faisceau de tige de luzerne non digéré (a), et faisceau ayant subi une digestion pendant 48h dans du jus de rumen (coupes de 100  $\mu$ m d'épaisseur) (Wilson, 1993). Le collenchyme (CO) et le phloème (PH) sont digérés.
- Figure 1.22 : Représentation schématique de la digestion d'une paroi primaire du mésophylle par une bactérie du côté externe de la paroi (a), et comparaison avec la digestion d'une paroi secondaire de sclérenchyme du côté interne au niveau de la lumière cellulaire (b), montrant la progression de la digestion vers la paroi primaire pendant 8 à 48 heures (d'après Wilson et Mertens, 1995).
- Figure 2.1 : Schéma global résumant les différentes parties de la thèse, et du matériel végétal et dispositifs correspondant à chaque partie
- Figure 2.2 : Origine des deux génotypes D+ et D- pour étudier l'évolution des caractères histologiques, biochimiques et morphologiques le long de la tige
- Figure 2.3 : Représentation schématique du mode de prélèvement des portions (H) de 2 cm de tige pour l'analyse histologique tous les 5 cm, et pour l'analyse chimique des teneurs en NDF et en lignine Klason tous les 10 cm (P).
- Figure 2.4 : Dispositif de mise en place des 6 cultivars en 3 blocs randomisés
- Figure 2.5 : Séquence d'acquisition, de prétraitement et d'analyse d'une image
- Figure 2.6 : Images de calibration pour les images capturées à chaque grossissement, a : objectif X 0.8 (loupe binoculaire, grossissement X 30), b : objectif X 2 (loupe binoculaire, grossissement X 80), c : objectif X 4.0 (microscope, grossissement X 200).
- Figure 2.7 : Principe de quantification des tissus des tiges de luzerne au grossissement X 30. Les opérations morphologiques utilisées sont décrites en annexe 2.3.
- Figure 2.8 : Principe de quantification des tissus des tiges de luzerne au grossissement X 80
- Figure 2.9 : Principe de quantification des tissus des tiges de luzerne au grossissement X 200
- Figure 2.10 : Illustration des différents caractères mesurés en bas des tiges dans l'étude de la diversité génétique, et de la recherche de marqueurs dans la population F<sub>1</sub>.  
a : au grossissement X30, b : grossissement X 200, E : écorce, XYL : xylème, PAR : parenchyme médullaire, FS : fibres supraphloémiennes, CA : cambium, FX : fibres du xylème, VX : vaisseaux du xylème, XS : xylème secondaire.
- Figure 2.11 : Représentation des différents types de liaison possibles entre marqueurs simplex et duplex chez une espèce tétraploïde (les batonnets représentent les 4 chromosomes homologues, et les points représentent les locus marqueurs sur les chromosomes).
- Figure 3.1 : Longueur des entre-nœuds en cm depuis l'apex vers le bas des tiges (a) pour le génotype D+ (●) et le génotype D- (△) et diamètre des entre-nœuds en mm depuis l'apex vers le bas des tiges (b) : chaque point représente un entre-nœud  
La récolte 1 est représentée par — et la récolte 2 par .... Pour l'origine des génotypes D+ et D- voir figure 2.2 dans la partie matériel et méthodes.
- Figure 3.2 : Profils d'évolution des quantités de matières sèche par strate de 10 cm de hauteur
- Figure 3.3 : Evolution des teneurs en NDF en % de la matière sèche (a) et en Lignine Klason en % de la matière sèche (b) le long de la tige de l'apex vers le bas, pour le génotype D+ (●) et D- (△) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -)
- Figure 3.4 : Evolution des structures histologiques du haut vers le bas des tiges de luzerne (exemple du génotype D+, sur une des 3 tiges) (grossissement X 200). H1 : 1 cm de

- l'apex, H2: 3 cm, H3 : 8-10 cm, H4 : 15-17 cm, H5 : 22-24 cm, H6 : 29-31 cm, H7 : 36-38 cm, H8 : 43-45 cm, H9 : 50-52 cm, H10 : 57-59 cm, H11 : 64-66 cm, H12 : 71-73 cm, H13 : 78-80 cm, H14 : 85-87 cm, H15 : 89-91 cm de l'apex.
- Figure 3.5 : Evolution de l'apex vers le bas des tiges des caractères histologiques mesurés à un grossissement X 30 sur 3 tiges pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -) : distance entre l'épiderme et le bord externe du parenchyme médullaire (a), proportion de parenchyme médullaire dans la coupe (b), et proportion d'écorce et de faisceaux dans la coupe (c)
- Figure 3.6 : Evolution des caractères histologiques mesurés à un grossissement X 80 sur 3 tiges pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -) : proportion de xylème dans la coupe (a), et épaisseur de l'écorce (b).
- Figure 3.7 : Evolution des caractères histologiques mesurés à un grossissement X 200 sur 3 tiges pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -) : Surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème en mm<sup>2</sup> (a), surface moyenne des lumières des fibres du xylème en mm<sup>2</sup> (b).
- Figure 3.8 : Evolution des caractères histologiques mesurés à un grossissement X 200 sur 3 tiges pour le génotype D+ (●) et D- (Δ) à la première récolte (—) et à la deuxième récolte (- - -) : Epaisseur des parois du xylème en mm (a), densité surfacique des parois du xylème (b).
- Figure 3.9 : Relations entre les caractères histologiques et la teneur en NDF (%) des tiges mesurés le long des tiges. Relation entre la teneur en NDF (%) des tiges et a : la proportion de parenchyme médullaire, b : l'épaisseur de l'écorce (mm), c : la proportion de xylème, d : l'épaisseur des parois du xylème, e : la densité surfacique des parois du xylème. Chaque point représente un génotype (moyenne des 3 tiges prélevées) et une position sur la tige. La position du haut et du bas des tiges est représentée par des flèches sur le premier graphique, elle est la même sur tous les autres.
- Figure 3.10 : Proportions des différents tissus composant les tiges de luzerne, dans le dispositif entre variétés en couvert dense (a) et le dispositif intra-variétés en plantes isolées (b)
- Figure 3.11 : Distribution des données phénotypiques en relation avec la morphologie des tiges dans la population F<sub>1</sub>, avec en ordonnées le nombre de génotypes. H : hauteur des tiges, DIAM : diamètre de la section prélevée pour l'analyse histologique, et FT : rapport feuilles/tiges. La position de la moyenne des parents Magali : Mag et Mercedes : Mer est indiquée par une flèche dans ces distributions). En abscisse : valeur moyenne des individus de la population, et en ordonnées : nombre de génotypes.
- Figure 3.12 : Distribution des données phénotypiques des caractères histologiques liés aux proportions des différents tissus, avec en ordonnées le nombre de génotypes. PPAR : proportion de parenchyme médullaire, PXYL : proportion de xylème, PECORCE : proportion d'écorce dans la tige. (Mag : moyenne du parent Magali, Mer : moyenne du parent Mercedes).
- Figure 3.13 : Distribution des valeurs phénotypiques des caractères histologiques liés au xylème, avec en ordonnées le nombre de génotypes. LVX : surface moyenne des lumières des vaisseaux du xylème, LFX : surface moyenne des lumières de fibres du xylème, DPAR : densité surfacique des parois du xylème, EPPAR : épaisseur des parois du xylème, et PCT : solubilité enzymatique des tiges. (Mag : moyenne du parent Magali, Mer : moyenne du parent Mercedes).
- Figure 3.14 : Groupes de liaison (représentés par des bâtonnets) de la carte du parent Magali. Sur les groupes de liaison, les locus marqueurs sont identifiés par un trait horizontal. Les encadrés représentent les groupes d'homologie (en théorie 8 chez la luzerne) regroupant les groupes de liaisons (en théorie 4). En trait pointillé sont représentés les

- liaisons en répulsion entre marqueurs. L'effet du marqueur sur le caractère est noté par "+" et par "-", le pourcentage de variation expliquée par le marqueur est indiqué.
- Figure 3.15a : Groupes de liaison (représentés par des bâtonnets) de la carte du parent Mercedes. Les encadrés représentent les groupes d'homologie regroupant les groupes de liaison. En trait pointillé sont représentés les liaisons en répulsion entre marqueurs. L'effet du marqueur sur le caractère est noté par "+" et par "-", le pourcentage de variation expliquée par le marqueur est indiqué.
- Figure 3.15b : Groupes de liaison (représentés par des bâtonnets) de la carte du parent Mercedes. Les encadrés représentent les groupes d'homologie regroupant les groupes de liaison. En trait pointillé sont représentés les liaisons en répulsion entre marqueurs. L'effet du marqueur sur le caractère est noté par "+" et par "-", le pourcentage de variation expliquée par le marqueur est indiqué.

### LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.1 : Evolution des surfaces cultivées (en culture pure) de luzerne en France
- Tableau 1.2 : Définition des stades morphologiques de développement de tiges individuelles de luzerne (d'après Kalu et Fick, 1983)
- Tableau 1.3 : Description des différents types tissulaires et types cellulaires correspondants, des tiges de légumineuses, et leurs fonctions
- Tableau 2.1 : Origine des cultivars choisis pour étudier la diversité génétique des caractères histologiques et morphologiques
- Tableau 3.1 : Valeurs du F et probabilités associées du test à effet fixe en utilisant la structure de covariance asymétrique dans la procédure MIXED de SAS pour les caractères morphologiques des tiges. Analyse par récolte, et analyse conjointe sur les 2 récoltes.
- Tableau 3.2 : Carrés moyens de l'analyse de variance par strate de 10 cm de hauteur, pour la teneur en NDF (%) et en lignine Klason (%), testant l'effet du génotype, de la récolte et l'interaction entre le génotype et la récolte.
- Tableau 3.3 : Valeurs du F et probabilités associées du test à effet fixe en utilisant la structure de covariance asymétrique de la procédure MIXED de SAS pour les caractères histologiques mesurés à un grossissement X 30
- Tableau 3.4 : Valeurs du F et probabilités associées du test à effet fixe en utilisant la structure de covariance asymétrique de la procédure MIXED de SAS pour les caractères histologiques mesurés à un grossissement X 80
- Tableau 3.5 : Valeurs du F et probabilités associées du test à effet fixe en utilisant la structure de covariance asymétrique de la procédure MIXED de SAS pour les caractères histologiques mesurés à un grossissement X 200 au niveau d'un faisceau dans le xylème.
- Tableau 3.7 : Gamme de variation des 6 cultivars (moyenne des 9 tiges des 3 blocs) dans l'essai inter cultivars et des génotypes dans l'essai intra cultivar par coupe, et moyenne des 6 cultivars et des 10 génotypes par cultivar, par récolte pour les caractères morphologiques des tiges
- Tableau 3.8 : Carrés moyens de l'analyse de variance dans les essais inter et intra cultivar pour les caractères morphologiques des tiges
- Tableau 3.9 : Gamme de variation des 6 cultivars (moyenne des 9 tiges des 3 blocs) dans l'essai inter cultivars et des génotypes dans l'essai intra cultivar par récolte, et moyenne des 6



- cultivars et des 10 géotypes par cultivar, par récolte pour les caractères histologiques liés aux proportions des différents tissus (mesurés au grossissement X 30)
- Tableau 3.10 : Carrés moyens de l'analyse de variance et de l'analyse de covariance avec la hauteur en covariable pour les caractères histologiques liés aux proportions des différents tissus dans la coupe (mesurés au grossissement X 30) dans les essais inter et intra cultivar.  
(- analyse de variance sans la covariable)
- Tableau 3.11 : Gamme de variation des 6 cultivars (moyenne des 9 tiges des 3 blocs) dans l'essai inter cultivars et des géotypes dans l'essai intra cultivar par récolte, et moyenne des 6 cultivars et des 10 géotypes par cultivar, par récolte pour les caractères histologiques mesurés au niveau du xylème (mesurés au grossissement X 200)
- Tableau 3.12 : Carrés moyens de l'analyse de variance et de covariance avec la hauteur en covariable pour les caractères mesurés au niveau du xylème à un grossissement X 200 dans les essais inter et intra cultivar.
- Tableau 3.13 : Analyse des corrélations phénotypiques entre les caractères histologiques mesurés au sein des deux cultivars : Luisante et Luzelle sur la moyenne des répétitions des 10 géotypes par cultivar (les corrélations en gras sont significatives à  $p < 0.05$ , d.d.l.= 38)
- Tableau 3.14 : Valeurs moyennes phénotypiques de chaque parent et de la population  $F_1$ .  
N : effectif, ET : écart-type de la moyenne des 3 blocs et des individus de la population  $F_1$  et des clones des 2 parents, DT : test de comparaison de moyennes des 2 parents (les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes), Norm : normalité de la distribution des valeurs phénotypiques.
- Tableau 3.15 : Carrés moyens de l'analyse de variance pour les caractères morphologiques et la solubilité enzymatique en bas des tiges
- Tableau 3.16 : Carrés moyens de l'analyse de variance pour les caractères histologiques liés aux proportions des différents tissus de la tige
- Tableau 3.17 : Carrés moyens de l'analyse de variance pour les caractères histologiques liés aux structures du xylème
- Tableau 3.18 : Corrélations phénotypiques sur la moyenne des répétitions de la population  $F_1$  (au dessus de la diagonale), et corrélations génétiques (sous la diagonale). Les corrélations signalées en caractères gras sont significatives à un seuil de 0,05.
- Tableau 3.19 : Variance des 161 individus ( $\sigma^2_{GE}$ ) de la population  $F_1$  ayant servi à faire les cartes des deux parents et variance d'erreur ( $\sigma^2_E$ ) et calcul de l'héritabilité au sens large ( $h^2$ ).
- Tableau 3.20 : Marqueurs significativement liés aux variations des valeurs morphologiques des tiges. Le  $R^2$  global de l'ensemble des marqueurs est indiqué en caractère gras pour chaque caractère. La probabilité indiquée correspond à la probabilité de l'effet de chaque marqueur du modèle.
- Tableau 3.21 : Marqueurs significativement liés aux variations des proportions des différents tissus composant les tiges. Le  $R^2$  global de l'ensemble des marqueurs est indiqué en caractère gras. La probabilité indiquée correspond à la probabilité de l'effet de chaque marqueur du modèle.
- Tableau 3.22 : Marqueurs significativement liés aux variations des éléments composant le xylème. Le  $R^2$  global de l'ensemble des marqueurs est indiqué en caractère gras. La probabilité indiquée correspond à la probabilité de l'effet de chaque marqueur du modèle.
- Tableau 3.23 : Marqueurs significativement liés aux variations des valeurs de solubilité enzymatique des tiges. Le  $R^2$  global de l'ensemble des marqueurs est indiqué en caractère gras. La probabilité indiquée correspond à la probabilité de l'effet de chaque marqueur du modèle.







**RESUME :**

Les tiges constituent l'élément fondamental du peuplement de luzerne et la partie aérienne limitant la digestibilité. Au cours de la croissance les tissus de soutien et de transport d'eau se mettent en place dans la tige. La proportion de ces tissus et des éléments constitutifs pourrait jouer un rôle déterminant dans leur dégradabilité. L'objectif de la thèse est de déterminer les bases génétiques des variations de la structure histologique des tiges de luzerne et d'établir la relation avec la digestibilité des tiges.

Sur deux génotypes contrastés en digestibilité, différents caractères histologiques ont été quantifiés par analyse d'images, les teneurs en parois et en lignine mesurées et leur profil d'évolution observé le long de tiges caractérisées pour leur morphologie. La variabilité génétique pour ces caractères histologiques a été recherchée au sein et à l'intérieur de cultivars choisis pour leur différence de digestibilité. Enfin, la recherche de marqueurs associés à la variation de ces caractères a été initiée grâce au marquage d'une population F<sub>1</sub> autotétraploïde issue du croisement entre deux plantes hétérozygotes. Les corrélations génétiques entre les différents caractères ont été calculées.

L'analyse le long des tiges montre que la hauteur joue un rôle primordial dans la variation des caractères, et qu'ils évoluent simultanément quel que soit le génotype. L'augmentation des teneurs en parois et en lignine en bas des tiges est associée à la mise en place du cambium responsable du développement de nouvelles assises cellulaires dont les parois se lignifient (xylème secondaire). Peu ou pas de variabilité entre cultivars mais une forte variabilité intra cultivar pour tous les caractères mesurés ont été mises en évidence. Une variabilité génétique importante au sein de la population F<sub>1</sub> a permis de rechercher des marqueurs associés aux caractères histologiques, morphologiques et à la solubilité enzymatique des tiges. Cette étude a mis en évidence des marqueurs significativement associés à tous les caractères, expliquant de 6,5 % de la variation observée pour la proportion de parenchyme médullaire dans la tige à 40 % pour la hauteur des tiges. Nous avons également pu mettre en évidence des colocalisations entre la hauteur des tiges et le rapport feuilles/tiges, entre la hauteur des tiges, leur solubilité enzymatique, et la proportion d'écorce et la densité surfacique des parois du xylème.

D'autre part l'analyse des corrélations a montré une relation négative entre la proportion de xylème, l'épaisseur et la densité surfacique des parois cellulaires du xylème, et la solubilité enzymatique des tiges; et une relation positive entre la solubilité enzymatique et la proportion des tissus non lignifiés. Cette thèse a montré qu'il est possible de sélectionner des luzernes de meilleure digestibilité en retenant comme critère de sélection des caractères liés à la proportion des différents tissus des tiges, et de rechercher des QTLs impliqués dans leur variation chez une espèce autotétraploïde.

La saturation des cartes et la disponibilité d'un logiciel permettant de localiser des QTLs chez les espèces autotétraploïdes pourraient permettre d'envisager d'améliorer la digestibilité du fourrage grâce à la sélection assistée par marqueur. Une voie possible pour améliorer la digestibilité du fourrage serait de diminuer les proportions de xylème en introgressant les QTLs responsables de la diminution de ce caractère, et de l'épaisseur de ses parois en prenant garde à ne pas affecter la rigidité des tiges.

Mots-clés : analyse d'images, corrélations génétiques, histologie, *Medicago sativa*, qualité, QTLs, tissus, tiges, variabilité génétique

**Genetic bases of the variations for histological structure in lucerne stems (*Medicago sativa* L.)**

**ABSTRACT:**

Stems are the essential constitutive elements of the lucerne canopy, and the aerial part that limits forage digestibility. During growth, tissues develop to confer stem rigidity and to allow water transport. The proportion of the different tissues may play a determinant role in stem degradability. The aim of this thesis was to determine the genetic bases of variations for histological structures of lucerne stems and the relationships between histological structures and digestibility of the stems.

Two genotypes contrasted in digestibility were used to quantify histological structures along the stem characterised for its morphology. Cell wall and lignin contents were also determined. The patterns of the evolution of these traits were observed from the apex to the bottom part of the stem. Genetic variability was assessed among 6 cultivars and among 10 genotypes within 2 cultivars. The effect of AFLP and SSR molecular markers on histological, morphological traits and enzymatic solubility of the stem was estimated in a F<sub>1</sub> tetraploid population. Genetic correlations between all these traits were calculated.

The analysis along the stem showed that stem height played an important role in the variation for histological traits, and that the histological traits evolved in the same pattern for both genotypes. The increase in cell wall and lignin contents in the bottom part of the stem was related to the cambial activity responsible for the differentiation of new cell layers in vascular tissues (secondary xylem). Few or no genetic variation was found among-cultivars, but the within-cultivar variation was highly significant for most of the traits. Genetic variation was also found in the F<sub>1</sub> population and was the largest one. Molecular markers were significantly associated with the variation of all traits. These markers explained from 6.5 % of the variation of the proportion of pith parenchyma to 40 % of the stem height. Some of the genomic regions were associated with more than one trait. Some markers were collocated on the same linkage or homology group for the stem height, and the leaf to stem ratio, but also for the stem height and the enzymatic solubility, the proportion of the cortex and the xylem cell wall surface density.

Moreover the analysis of the correlations showed a negative relationship between xylem proportion, xylem cell wall thickness, xylem cell wall surface density and enzymatic solubility of the stems. Enzymatic solubility of the stems was also positively correlated to the proportion of the non lignified tissues. It is therefore possible to breed more digestible lucerne with the proportion of the different tissues in the stem as selection criteria. This thesis also showed that it is possible to detect QTLs associated to histological traits in an autotetraploid species.

Map saturation and the availability of a QTL software specific to autotetraploid species would permit to consider the improvement of forage digestibility thanks to markers assisted selection. A possible way to improve digestibility would be to decrease xylem proportion in the stem by introducing QTLs responsible for the decrease of this trait, and for the decrease of xylem cell wall thickness without reducing the rigidity of the stem.

Mots-clés : genetic correlations, genetic variation, histology, image analysis, *Medicago sativa*, QTLs, quality, stem tissues