

Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen

La microscopie permet d'étudier la structure et l'ultrastructure des tissus végétaux, notamment les parois, leurs proportions relatives et leur degré de lignification. Elle permet aussi de suivre les processus de leur dégradation par les micro-organismes du rumen.

L'analyse chimique des aliments des ruminants ne peut pas, à elle seule, expliquer tous les aspects de leur digestion et de leurs digestibilité et ingestibilité. Elle permet de connaître les teneurs en cellulose, en hémicelluloses, en pectines et en lignines, mais ne fournit pas d'indication sur la distribution de ces constituants dans les parois et, surtout, sur les proportions respectives d'hémicelluloses et de cellulose digestibles et indigestibles dans ces parois. Les méthodes microscopiques permettent de mettre en évidence les différents tissus végétaux de composition et de dégradation différentes. Seul un petit nombre d'équipes de recherche ont utilisé jusqu'à maintenant ces méthodes (Grenet 1989).

Les premières études microscopiques ont été réalisées par Drapala *et al* (1947), Stepler (1951) et Regal (1960), qui ont évalué la proportion de parois lignifiées dans les plantes fourragères et observé la nature des tissus retrouvés dans les fèces. La structure microscopique comparée des particules du contenu de feuillet et des particules fécales a été observée plus tard (Grenet 1970). La possibilité d'utiliser des ruminants porteurs d'une canule permanente du rumen a ouvert la voie à des études de cinétique de dégradation des aliments à l'intérieur du rumen grâce à la méthode des sachets de nylon (Demarquilly et Chenost 1969), adaptée ensuite aux études microscopiques (Grenet et Barry 1988).

Résumé

L'étude microscopique des différents tissus d'une plante fourragère montre que les parois des cellules diffèrent d'un tissu à l'autre par leur épaisseur et par leur lignification. Dans le rumen le phloème et le parenchyme sont dégradés et disparaissent les premiers, tandis que les tissus lignifiés sont peu (sclérenchyme) ou pas dégradés (xylème). La dégradation des tissus des feuilles est plus rapide que celle des tiges. Une étude comparative du maïs normal et du maïs bm3 (plus digestible) montre que les parois lignifiées du bm3 sont partiellement dégradées dans le rumen, contrairement à ce qu'on observe avec le maïs normal. Lorsque la plante vieillit, la dégradation des tissus diminue en même temps que les parois se lignifient. Le traitement des pailles de céréales aux alcalis permet à des parois lignifiées d'être partiellement dégradées dans le rumen.

Les micro-organismes responsables de la dégradation des parois cellulaires peuvent être observés grâce à la microscopie. L'adhésion des bactéries aux parois, les fragments de plantes ingérés par les protozoaires et le mode particulier utilisé par les champignons anaérobies du rumen pour coloniser les tissus lignifiés sont décrits.

La structure et l'ultrastructure des parois ainsi que leur dégradation dans le rumen peuvent être étudiées grâce à la microscopie photonique, la microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique à transmission. Le microscope photonique permet l'étude rapide des différents tissus et de leurs proportions respectives, de la taille des parois cellulaires et la détermination de la présence ou de l'absence de lignines. Le microscope électronique à balayage permet de connaître la nature des tissus dégradés à la surface des échantillons. Il fournit également des informations sur les relations entre les micro-organismes, en particulier les champignons du rumen, et les parois cellulaires. Le microscope électronique à transmission donne des renseignements uniques à la fois sur la structure des parois et sur leur mode de dégradation par les micro-organismes.

1 / Les tissus des plantes fourragères

Une cellule végétale comprend un protoplaste et une enveloppe, la paroi, dont l'épaisseur augmente avec l'âge (cf. revue bibliographique de Jarrige *et al* 1995). On distingue la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (celle-ci n'existe pas dans tous les tissus) : ces trois parties ont une composition différente (figure 1).

Les Angiospermes, auxquelles appartiennent les plantes fourragères, se caractérisent par la diversité de leurs tissus, qui diffèrent par la nature et les fonctions de leurs cellules.

1.1 / Les parenchymes

Les parenchymes sont des tissus soit compacts soit aérés, comme le mésophylle entre les cellules duquel les espaces intercellulaires abondants permettent une circulation d'air, mais leur structure cytotogique est simple (Esau 1962). La moelle et le cortex des tiges et des racines et le mésophylle des feuilles sont largement ou entièrement constitués de parenchyme.

1.2 / Les tissus de soutien

Les tissus de soutien possèdent des parois épaisses, lignifiées ou non. Leurs cellules sont plus ou moins allongées dans le sens de l'axe

de l'organe : lorsqu'elles sont très longues par rapport à leur diamètre, elles sont appelées fibres.

Le collenchyme est composé de cellules avec des parois primaires épaisses non lignifiées. C'est un tissu de soutien des organes en croissance. On le trouve dans les tiges et les feuilles des Dicotylédones (comme par exemple la luzerne ou le trèfle) mais non dans les Monocotylédones (Graminées) qui développent très tôt du sclérenchyme. Le collenchyme est situé à la périphérie des organes, soit directement sous l'épiderme, soit séparé de ce dernier par une ou plusieurs couches de cellules de parenchyme.

Le sclérenchyme est un tissu composé de cellules à parois épaisses, souvent lignifiées, et dont la fonction est mécanique (figure 2). On y distingue des fibres, cellules longues, et des sclérites, cellules courtes. Ces cellules, lorsqu'elles arrivent à maturité, ne renferment plus de protoplaste vivant. Les fibres se trouvent dans le cortex de la tige, dans le phloème, dans le xylème, ou constituent les gaines entourant les faisceaux libéro-ligneux. Chez le maïs et le sorgho par exemple, les faisceaux libéro-ligneux, en particulier ceux de la périphérie de la tige, possèdent d'importantes gaines de fibres (figure 3). Dans les feuilles des Monocotylédones on trouve également des gaines de fibres autour des faisceaux libéro-ligneux, ou encore des îlots de fibres situés entre l'épiderme et les faisceaux.

Figure 1. Les différentes parties de la paroi d'une cellule lignifiée. Protéines HRGP : glycoprotéines riches en hydroxyproline. Le féruloïl-arabinose établit des liens entre lignines et hémicelluloses.

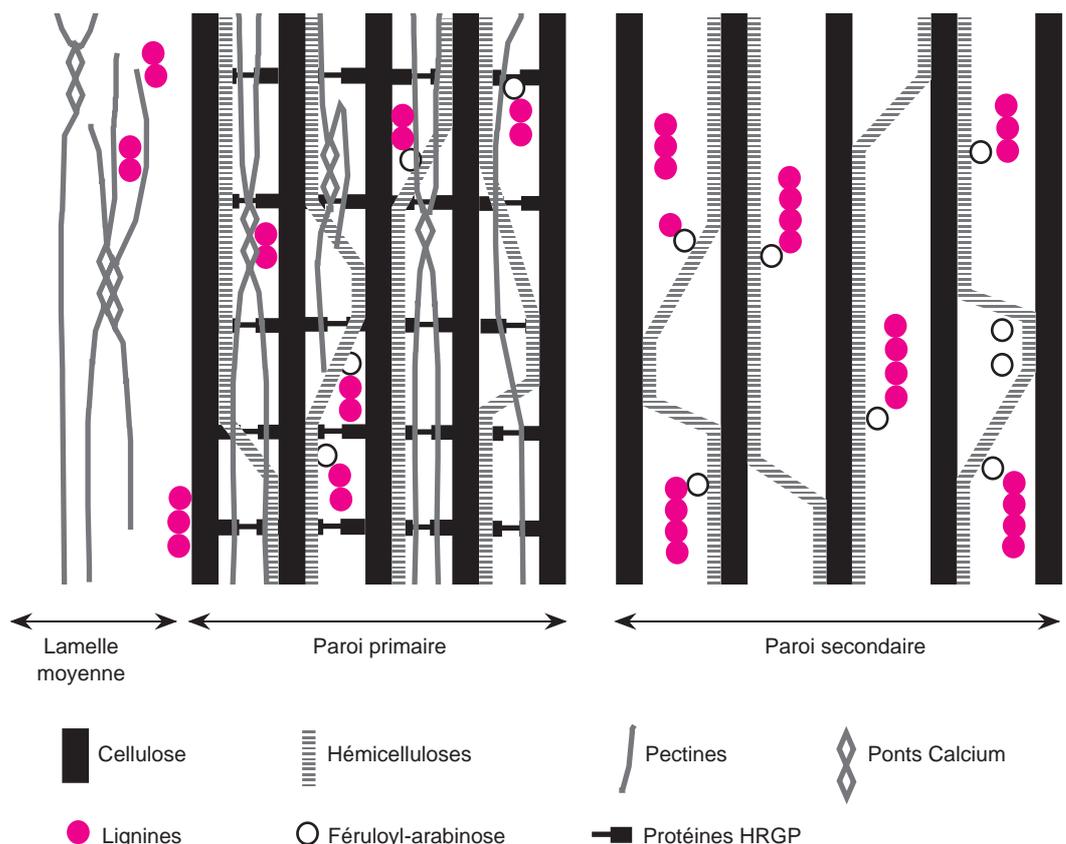


Figure 2. Sclérenchyme de tige de maïs. On distingue, de haut en bas, l'épiderme, le sclérenchyme, dont les parois sont très épaisses, puis le parenchyme à parois minces.

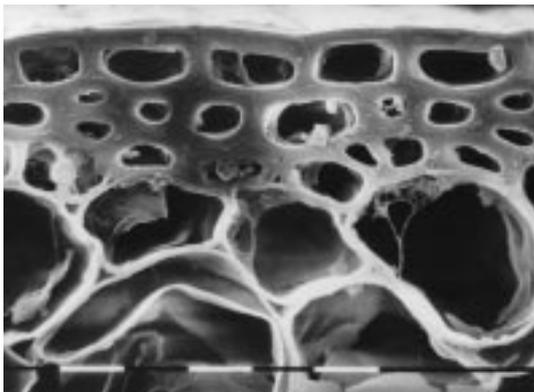
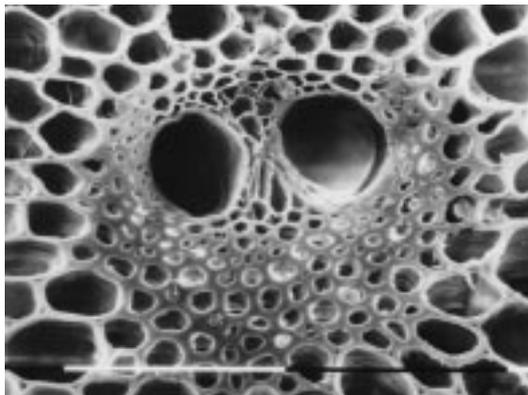


Figure 3. Fibres entourant un faisceau libéro-ligneux dans la tige de maïs. Ce sont de petites cellules avec une paroi très épaisse qui entourent le xylème. Ce dernier est remarquable par ses deux gros vaisseaux situés au centre de l'image.

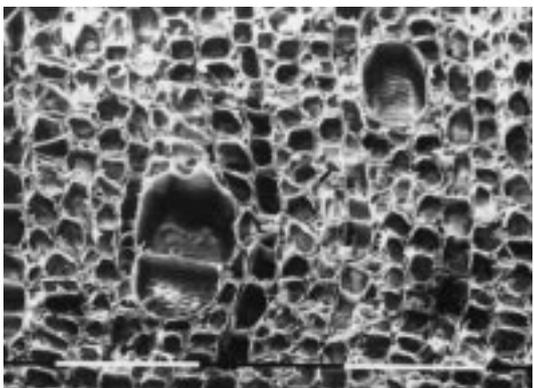


13 / Les tissus conducteurs

Le xylème conduit la sève brute. Il est composé d'éléments lignifiés dont la composition varie : chez les Dicotylédones il peut contenir des fibres, des vaisseaux et des cellules de parenchyme (figure 4). Les vaisseaux sont constitués, quand leur protoplasme a disparu, par des unités cellulaires distinctes, perforées, articulées, plus larges que les autres cellules voisines, allongées et placées verticalement les unes au bout des autres. Ces cellules communiquent entre elles par leurs parois terminales perforées.

Le phloème conduit la sève élaborée. C'est un tissu hétérogène formé de cellules très différenciées, les cellules et les tubes criblés, à paroi non lignifiée, en liaison étroite entre elles et disposées en rangées verticales. Le phloème est en évolution constante : ses cellules naissent, se différencient, puis meurent en se résorbant. Les cellules conductrices communiquent entre elles par des pores regroupés en plages qui ressemblent à des cribles.

Figure 4. Xylème de tige de luzerne. Il est formé de rangées de cellules alignées, de diamètre variable, ayant toutes un rôle dans la conduction de la sève brute.



14 / L'épiderme

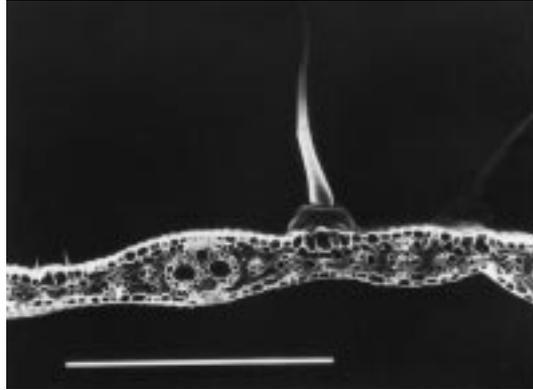
C'est un tissu de revêtement. L'épaisseur des cellules de l'épiderme est très variable, la paroi externe étant la plus épaisse (cf. Jarrige *et al* 1995). La caractéristique essentielle des épidermes est la présence de cutine, substance lipidique, qui imprègne les parois (cutinisation) et forme une couche séparée, la cuticule (cuticularisation) à la surface externe des cellules. Cette cuticule recouvre la totalité de la plante. Elle rend l'épiderme imperméable et permet à la plante de conserver son eau.

15 / Plantes à photosynthèse de type C3 (graminées tempérées) et de type C4 (graminées tropicales)

Les graminées des régions chaudes sont, dans leur très grande majorité, des plantes dites en C4 car elles fixent le CO₂ dans des acides organiques à 4 atomes de carbone, d'où leur productivité souvent élevée.

Le trait distinctif des feuilles des plantes en C4 est la disposition radiale du mésophylle autour des faisceaux vasculaires (figure 5 ; cf. Jarrige *et al* 1995)). Les parois cellulaires de la gaine périvasculaire de nombreuses graminées en C4 possèdent une couche subérisée (O'Brien et Carr 1970). Au total, les proportions des différents tissus dans le limbe de la plante en C4 sont différentes de celles trouvées dans la plante en C3 (Wilson et Hattersley 1989) : cette dernière renferme plus de mésophylle (53 à 67 % contre 28 à 47 % pour la plante en C4), moins de gaine périvasculaire (5 à 20 % contre 12 à 33 %) et moins de tissu vasculaire (3 à 9 % contre 6 à 12 %). La plante en C3 contient donc plus de tissus facilement et rapidement dégradés et moins de tissus difficilement et lentement dégradés que la plante en C4.

Figure 5. Limbe de maïs en coupe transversale. Sur l'épiderme supérieur on peut noter la présence d'un poil. Au niveau des nervures, on distingue les faisceaux libéro-ligneux, reconnaissables à la présence des deux gros vaisseaux du xylème.



2 / Les aspects microscopiques de l'érosion microbienne

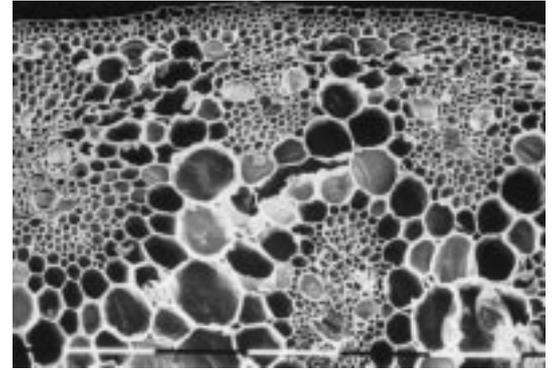
2.1 / La tige de maïs normal et brown midrib

L'observation au microscope électronique à balayage d'une coupe transversale de tige de maïs montre la disposition des différents tissus (figure 6) : l'épiderme, le sclérenchyme, le parenchyme, le xylème et le phloème. Elle montre de plus l'épaisseur relative des parois du sclérenchyme et des fibres périvasculaires par rapport à celles du parenchyme. L'étude de la tige du maïs brown midrib (moins riche en lignines et dont les lignines ont une structure différente du maïs normal) montre que les parois du sclérenchyme sont plus fines que celles du maïs normal. L'observation au microscope photonique après coloration spécifique de la lignine (la phloroglucine acide colore les tissus lignifiés riches en groupements cinnamaldéhyde comme le xylème et la réaction de Mäule colore les parois riches en groupements syringyle comme le sclérenchyme) complète ces informations.

L'étude au microscope électronique à balayage de la dégradation progressive des tiges de maïs (récoltées au stade ensilage) incubées dans le rumen sous forme de fragments de 0,5 cm de long à l'intérieur de sachets de nylon pendant des durées de 8, 24, 48 et 72 heures (Grenet et Barry 1991), montre que le phloème disparaît le premier, suivi par le parenchyme interne de la tige puis par le parenchyme externe. Les fibres périvasculaires, le xylème et le sclérenchyme résistent à la dégradation (figure 7). Suite à la dégradation du parenchyme qui les entoure, les faisceaux libéro-ligneux, qui ne sont pas dégradés, font saillie à la surface de l'échantillon. Le parenchyme du maïs brown midrib est dégradé plus rapidement que celui du maïs normal. De plus les parois secondaires du sclérenchyme du brown midrib sont en partie dégradées.

La dégradation ruminale de la tige de maïs commence par la disparition du phloème, puis du parenchyme. Le sclérenchyme est attaqué beaucoup plus lentement.

Figure 6. Tige de maïs montrant les différents tissus. De haut en bas : épiderme, sclérenchyme, faisceaux libéro-ligneux, parenchyme.



2.2 / Les limbes des feuilles de Graminées

Dans les limbes (parties libres des feuilles) de graminées, le mésophylle et le phloème disparaissent les premiers, suivis par l'épiderme (Grenet et Demarquilly 1987, Jamot et Grenet 1991). Ensuite, une érosion partielle intervient au niveau de la gaine périvasculaire parenchymateuse et du sclérenchyme : seule la partie superficielle des parois est dégradée par les micro-organismes qui s'y sont fixés, comme on peut le voir au microscope électronique à transmission (figure 8). En revanche le xylème lignifié reste intact.

Les limbes des graminées tropicales sont moins dégradables que ceux des plantes de pays tempéré car ils contiennent une proportion plus élevée de tissus tels que l'épiderme et la gaine parenchymateuse périvasculaire, qui sont dégradés plus lentement que le phloème et le mésophylle (Akin *et al* 1983a).

2.3 / La tige et la feuille de luzerne

Les tiges de luzerne comprennent, sous l'épiderme, le parenchyme cortical, le collenchyme sous forme d'un anneau discontinu, le phloème, le cambium, le xylème et le paren-

Figure 7. Tige de maïs dégradée dans le rumen (vue de profil). Par suite de la dégradation du parenchyme les faisceaux libéro-ligneux font saillie à la surface.



Figure 8. Bactéries dégradant la paroi secondaire du sclérenchyme de la tige de blé, qui prend un aspect festonné.

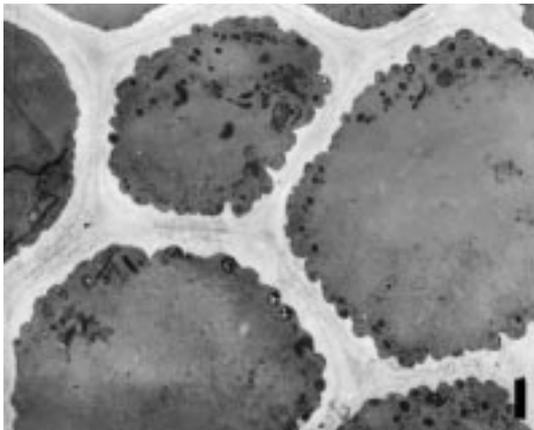
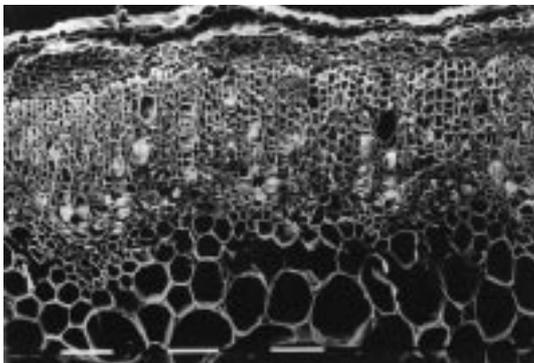


Figure 9. Tige de luzerne. De haut en bas : l'épiderme, le collenchyme, le xylème et le parenchyme.



chyme médullaire (figure 9). Le xylème est coloré par la phloroglucine acide (Jamot et Grenet 1991).

La dégradation des tiges de luzerne est beaucoup plus rapide que celle des tiges de graminées. Le phloème disparaît également le premier suivi par l'épiderme, le parenchyme et le collenchyme (figure 10). Le xylème résiste à la dégradation (Jamot et Grenet 1991).

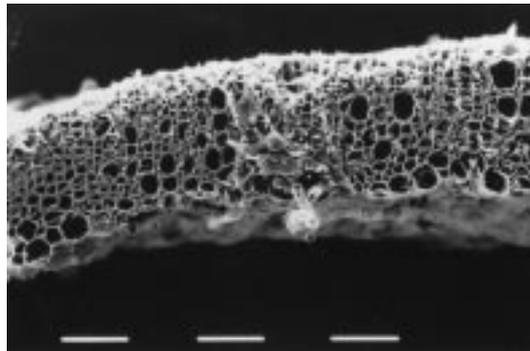
Les folioles de légumineuse sont dégradés extrêmement rapidement et presque en totalité dans le rumen (Grenet et Demarquilly 1987). Seul le xylème des nervures n'est pas dégradé.

2.4 / Influence de la maturité de la plante

L'étude microscopique permet aussi de suivre les modifications de dégradation des différents organes selon le stade de maturité de la plante.

Dans l'entre-nœud apical du maïs récolté au stade « 5 jours après l'anthèse » on observe, sur une coupe effectuée à la base, la présence de cellules méristématiques qui donnent naissance à des cellules qui se différencient et dont certaines se lignifient au fur et à mesure

Figure 10. Tige de luzerne dégradée : seul le xylème a résisté.



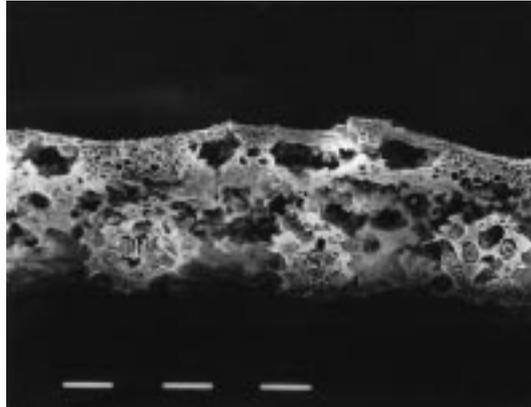
que l'on se rapproche du haut de l'entre-nœud. La proportion de tissus lignifiés passe de 5 % de la surface de la coupe à la base de l'entre-nœud à 17 % au sommet dans l'échantillon considéré (Migné *et al* 1996). La dégradation, dans le rumen, de la base de l'entre-nœud est très rapide et seul le xylème résiste à l'action des micro-organismes. Au sommet, cet entre-nœud possède un sclérenchyme développé et lignifié qui, comme le xylème, n'est pas dégradé.

La dégradation des tiges diminue plus rapidement que celle des feuilles. Cette réduction résulte, chez les graminées, de modifications dans les parois du parenchyme qui sont non lignifiées dans les jeunes plantes et très rapidement dégradées, mais dans lesquelles la lignine se dépose progressivement de telle sorte qu'elles deviennent de moins en moins dégradables. Par exemple, dans la tige de blé, la proportion de tissus lignifiés dans une coupe transversale est de 20 % au stade début montaison, constitués uniquement par du xylème, elle est de 38 % au début épiaison, dont 16 % de xylème et 22 % de sclérenchyme, et atteint 72 % à la maturité du grain, composés pour 12 % de xylème, 20 % de sclérenchyme et 40 % de parenchyme (P. Barry et E. Grenet, résultats non publiés). La coloration des composés phénoliques par le permanganate de potassium pour l'observation au microscope électronique à transmission montre que la lignification de la paroi progresse depuis la lamelle moyenne vers les couches internes de la paroi secondaire (c'est-à-dire vers la lumière cellulaire), sans toutefois atteindre la couche la plus externe des parois du sclérenchyme.

Au stade épiaison (figure 11), les parois des différents tissus d'une tige de graminée sont dégradées à l'exception du xylème (Jamot et Grenet 1991). Au stade floraison, les parois sont devenues plus épaisses et le sclérenchyme reste intact, même après 72 heures d'incubation dans le rumen. Les parois du parenchyme se lignifient progressivement en allant de l'extérieur vers l'intérieur de la tige et, à la maturité du grain, seule la bande de parenchyme qui entoure la lacune médullaire est dégradée. L'observation au microscope électronique à transmission fait apparaître une dégradation partielle des parois lignifiées

Les limbes de graminées sont dégradés plus lentement que les tiges et les feuilles de luzerne.

Figure 11. Tige dégradée de blé au stade épiaison : seuls le sclérenchyme et les parties lignifiées des faisceaux libéro-ligneux ont résisté.



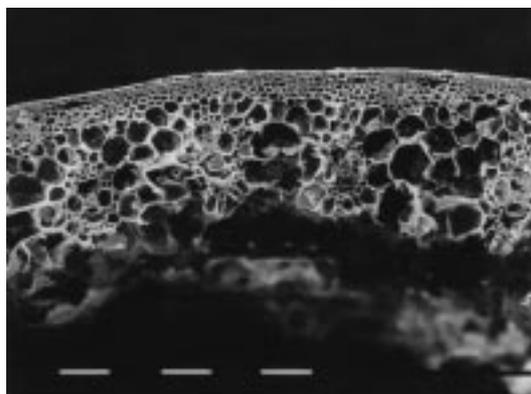
La vitesse de dégradation varie avec la maturité de la plante, en liaison avec le degré de lignification des tissus.

du sclérenchyme et des fibres de la tige de blé par des bactéries fixées (P. Barry et E. Grenet, résultats non publiés). Celles-ci dégradent en partie la paroi secondaire de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (figure 12). Cette attaque microbienne de la paroi secondaire intervient non seulement au début de la lignification, mais également au stade de maturité plus avancé : elle est alors très limitée.

2.5 / Le traitement des pailles aux alcalis

Le traitement de la paille aux alcalis augmente la dégradation des parois, vraisemblablement par suite de la rupture des liaisons entre les polysides pariétaux et la lignine. L'observation au microscope électronique à balayage montre que les parois de *Cynodon dactylon* sont déformées après traitement à la soude, que les tissus se fragmentent et que les cellules se séparent (Spencer et Akin 1980). L'étude au microscope électronique à transmission confirme ces observations et montre, de plus, que les bactéries sont fixées en plus grand nombre sur les tissus des plantes traitées, y compris sur le xylème. Les tissus des échantillons non traités sont dégradés beau-

Figure 12. Tige dégradée de blé au stade floraison. Par suite de l'extension de la lignification, seuls une partie du parenchyme et le phloème sont dégradés.



coup plus lentement que ceux des échantillons traités. De plus le traitement aux alcalis sépare les cellules du xylème et facilite la dégradation de la lamelle moyenne du sclérenchyme par les bactéries. Avec la paille de blé traitée à l'ammoniac (Grenet et Barry 1990a) une incubation de 72 heures dans le rumen est cependant nécessaire pour que la désorganisation des cellules du sclérenchyme ait lieu et que leur dégradation commence.

3 / Les micro-organismes responsables de la dégradation des parois et leurs interactions

3.1 / Les bactéries

L'observation des fragments de plantes mis à incuber *in vitro* dans du jus de rumen ou dans des cultures pures de micro-organismes, ou bien après passage dans le rumen, montre la présence de bactéries fixées. L'observation, par exemple, de pulpe de betteraves introduite dans le rumen à l'intérieur d'un sachet de nylon pendant 8 heures (Grenet et Barry 1990b), montre qu'elle est recouverte d'un film blanchâtre dû à la présence de nombreuses bactéries fixées sur les parois cellulaires. Certaines sont des coques, d'autres des bâtonnets. On peut les observer également sur de la paille de blé incubée pendant 8 heures dans le rumen.

En général les bactéries sont attachées plus étroitement aux parois qui sont lentement et difficilement dégradables qu'aux parois facilement dégradables telles que les parois primaires du mésophylle, de l'épiderme ou du phloème (Akin et Barton 1983).

Les bactéries cellulolytiques adhèrent très étroitement au substrat cellulosique au moyen de leur glycocalyx (qui enveloppe les bactéries) et le dégradent en produisant des vésicules qui contiennent des enzymes (cellulases, hémicellulases...) qui continuent d'être actives même après autolyse de la bactérie (Chesson *et al* 1986).

3.2 / Les protozoaires

Les protozoaires sont nombreux sur les substrats végétaux. Dans les cellules du parenchyme de betterave introduite dans le rumen à l'intérieur d'un sachet de nylon, on trouve, après 2 heures de séjour, des Holotriches venus utiliser les sucres contenus dans le cytoplasme. Sur la pulpe de betterave ayant séjourné 4 heures dans le rumen, les Entodiniomorphes sont nombreux, de même que dans le mésophylle des feuilles de maïs (figure 13). Ces micro-organismes peuvent dégrader de grandes quantités de mésophylle, de gaine parenchymateuse périvasculaire et d'épiderme de feuilles de graminées (Amos et Akin 1978) ainsi que des fragments de tige de luzerne (Bauchop 1979, Sénaud *et al* 1986).

Figure 13. Protozoaires du rumen : à gauche un *Entodiniomorphe*, à droite un *Holotriche*.



Ils agissent de deux manières, en ingérant des cellules et des tissus végétaux et par l'intermédiaire d'enzymes extracellulaires (Amos et Akin 1978, Grain et Sénaud 1984).

3.3 / Les champignons

Les sporanges (ou fructifications) des champignons anaérobies du rumen apparaissent en grand nombre sur les échantillons introduits dans le rumen à l'intérieur de sachets de nylon (figure 14). Ils sont plus abondants sur les tiges que sur les feuilles, excepté quand les feuilles ne sont pas très digestibles (paille par exemple). Les spores se fixent sur les fractures des tiges ou encore au niveau des stomates. On les trouve généralement sur les tissus à parois épaisses et/ou lignifiées (Akin *et al* 1983b, Akin 1987, Grenet et Barry 1988). En revanche certains produits végétaux comme la pulpe de betterave ou les téguments des graines de colza (pellicules de colza) sont rarement colonisés. La fixation des spores intervient très rapidement (15 min) après l'introduction des substrats dans le rumen (Bau chop 1984). Les spores germent et donnent naissance à un mycélium que l'on peut observer trois heures après la fixation de la spore. Les rhizoïdes de ce mycélium pénètrent à l'intérieur des tissus jusqu'à une profondeur qui peut atteindre 0,5 mm. Selon l'aliment que reçoit le ruminant, la population fongique est plus ou moins abondante (Grenet *et al* 1989) :

Figure 14. Champignon du rumen entourant un vaisseau. Au premier plan on voit le rhizoïde du champignon et, à l'arrière du vaisseau, le sporange.



son développement est favorisé par des régimes riches en fourrages et inhibé par des régimes riches en amidon ou en glucides solubles.

Le rôle des champignons anaérobies du rumen a été mis en évidence au cours de la décennie 80 (Fonty *et al* 1988, Fonty et Joblin 1991). La dégradation des tissus végétaux mis à incuber dans le rumen d'agneaux gnotoxéniques n'abritant que des champignons comme micro-organismes cellulolytiques (Grenet *et al* 1989) a été comparée à celle qui existe dans le rumen d'un animal conventionnel : la dégradation est la même au bout de 48 heures, mais elle est un peu plus lente dans le rumen des agneaux gnotoxéniques. Ce sont les tissus non lignifiés qui sont dégradés.

4 / Perspectives

L'étude microscopique de la dégradation microbienne des tissus végétaux a permis d'approfondir les connaissances sur la digestion des plantes fourragères. Son principal intérêt a été de mettre en évidence qu'une plante est composée de tissus différents dont les parois ne sont pas identiques. Soit ces parois sont totalement ou partiellement dégradées dans le rumen, mais avec des vitesses différentes, soit elles ne sont pas dégradées du tout. Ceci est variable suivant la plante, son stade de maturité et l'organe considéré.

Les différentes méthodes utilisées jusqu'à ces dernières années ont été très utiles, mais un certain nombre de points reste à éclaircir dans l'étude des mécanismes de la dégradation microbienne. Les nouvelles méthodes qui commencent à se développer semblent à cet égard très prometteuses. C'est tout d'abord la séparation de fractions cellulaires bien déterminées sur lesquelles les études de composition chimique et les mesures de dégradabilité peuvent être réalisées. La comparaison des résultats obtenus entre les différents tissus est parfois surprenante. Wilson *et al* (1993) ont mis en évidence, sur des fractions de tige de sorgho, que la proportion de parois digérées après 96 heures dans du jus de rumen était plus élevée pour le sclérenchyme et la zone de faisceaux vasculaires que pour la moelle, alors que la teneur en lignine des deux premiers tissus est 3 à 5 fois supérieure à celle de la moelle.

La microspectrophotométrie va aussi permettre de grands progrès dans la connaissance des parois végétales en déterminant la nature et les quantités de composés aromatiques associés avec les différents types de parois. Ces résultats peuvent être mis en relation avec les réactions histochimiques des parois et leur biodégradabilité (Akin *et al* 1990, Hartley *et al* 1990, Goto *et al* 1993). Morrison III *et al* (1993) ont récemment associé cette technique à l'analyse chimique et à la spectroscopie RMN du C13 sur des fractions cellulaires isolées de millet normal et brown midrib et ont obtenu des résultats promet-

teurs quant à la connaissance des facteurs qui influencent la biodégradabilité.

Le développement des méthodes immunocytochimiques ouvre également des possibilités nouvelles pour l'étude des parois au niveau moléculaire. Des résultats ont déjà été obtenus concernant la localisation des xyloglucanes et d'un rhamnogalacturonane (Moore *et al* 1986, Moore et Staehelin 1988) ainsi que des xylanes et un arabinogalactane (Northcote *et al* 1989). En utilisant une technique qui met en œuvre un complexe enzyme-or colloïdal spécifique, les xylanes ont été localisées également par Vian *et al* (1983) et Ruel et Joseleau (1984). L'immunomarquage des arabinoxylynes dans la tige de maïs normal et

brown midrib a été entrepris également par Barry *et al* (1991), Migné *et al* (1994), ainsi que dans la tige de blé (P. Barry *et al*, résultats non publiés). D'autres constituants de la paroi, tels que les composés phénoliques, peuvent aussi être localisés de cette façon.

Ces méthodes nouvelles vont permettre de mieux comprendre quels sont les mécanismes qui interviennent dans la dégradation microbienne des parois. Dans le même temps, les efforts des sélectionneurs de plantes fourragères pour produire, par génie génétique, des plantes moins lignifiées ou à lignines modifiées laissent espérer une amélioration de la digestibilité des fourrages dans un avenir assez proche.

Références bibliographiques

- Akin D.E., 1987. Association of rumen fungi with various forage grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 16, 273-285.
- Akin D.E., Barton II F.E., 1983. Rumen microbial attachment and degradation of plant cell walls. *Federation proceedings*, 42, 114-121.
- Akin D.E., Barton II F.E., Coleman S.W., 1983a. Structural factors affecting leaf degradation of old world bluestem and weeping love grass. *J. Anim. Sci.*, 56, 1434-1446.
- Akin D.E., Gordon G.L.R., Hogan J.P., 1983b. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with and without sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 738-748.
- Akin D.E., Ames-Gottfred N., Hartley R.D., Fulcher R.D., Rigsby L.L., 1990. Microspectrophotometry of phenolic compounds in bermudagrass cell walls in relation to rumen microbial digestion. *Crop Sci.*, 30, 396-401.
- Amos H.E., Akin D.E., 1978. Rumen protozoal degradation of structurally intact forage tissues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 513-522.
- Barry P., Prensier G., Grenet E., 1991. Immunogold labelling of arabinoxylynes in the plant cell walls of normal and bm3 mutant maize. *Biol. Cell*, 71, 307-311.
- Bauchop T., 1979. The rumen ciliate *Epidinium* in primary degradation of plant tissues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 1217-1223.
- Bauchop T., 1984. Rumen anaerobic fungi and the utilisation of fibrous feeds. In : R.A. Leng, J.S.F. Barker, D.B. Adam and K.L. Hutchinson K.L. (eds), *Biotechnology and Recombinant DNA Technology in the Animal Production Industries, Reviews in Rural Science* (6) 118-123. Symp. Univ. New Engl. Armidale, Australia.
- Chesson A., Stewart C.S., Dalgarno K., King T.P., 1986. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell walls in the rumen and by cellulolytic bacteria in axenic culture. *J. Appl. Bacteriol.*, 60, 327-336.
- Demarquilly C., Chenost M., 1969. Etude de la digestion des fourrages dans le rumen par la méthode des sachets de nylon ; liaisons avec la valeur alimentaire. *Ann. Zootech.*, 18, 419-436.
- Drapala W.J., Raymond L.C., Crampton E.W., 1947. Pasture studies. XXVII. The effects 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.
- Esau K., 1962. *Plant anatomy*. Wiley, New York, London, 735 p.
- Fonty G., Joblin K.N., 1991. Rumen anaerobic fungi : their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In : T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima (eds), *Physiological aspects of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology*, 655-680. Academic Press, San Diego.
- Fonty G., Grenet E., Fèvre M., Breton A., Gouet Ph., 1988. Ecologie et fonctions des champignons anaérobies du rumen. *Reprod. Nutr. Dev.*, 28, Suppl. n° 1, 1-18.
- Goto M., Sato T., Morita O., Takabe K., Inoue N., 1993. Variations in anatomy and ultraviolet microspectrometry between normal and midrib mutant maizes possessing different rumen degradabilities. *J. Sci. Food Agric.*, 63, 427-434.
- Grain J., Sénaud J., 1984. New data on the degradation of fresh lucern fragments by the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* : attachment, ingestion and digestion. *Can. J. Anim. Sci.*, 64, 26.
- Grenet E., 1970. Taille et structure des particules végétales au niveau du feuillet et des fèces chez les bovins. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 10, 643-657.
- Grenet E., 1989. Electron microscopy as a method to evaluate structure and degradation of plant cell walls. In : A. Chesson and E.R. Orskov (eds), *Physico-chemical Characterization of Plant residues for Industrial and feed use*, 65-79. Elsevier Applied Science, London/New York.
- Grenet E., Barry P., 1988. Colonization of thick-walled plant tissues by anaerobic fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 19, 25-31.
- Grenet E., Barry P., 1990a. Microbial degradation in the rumen of wheat straw and anhydrous ammonia treated wheat straw observed by electron microscopy. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30, 533-540.
- Grenet E., Barry P., 1990b. *In vivo* and *in sacco* digestibility and rumen microbial degradation of cell walls of soyabean and rape integuments and of dehy-

- drated beet pulp in sheep, observed by scanning electron microscopy. *J. Agric. Sci.*, 115, 429-435.
- Grenet E., Barry P., 1991. Microbial degradation of normal maize and bm3 maize in the rumen observed by scanning electron microscopy. *J. Sci. Food Agric.*, 54, 199-210.
- Grenet E., Demarquilly C., 1987. Digestion des fourrages dans le rumen. In : C. Demarquilly (ed), Les fourrages secs : récolte, traitement, utilisation, 141-162. INRA, Paris.
- Grenet E., Fonty G., Jamot J., Bonnemoy F., 1989. Influence of diet and monensin on development of anaerobic fungi in the rumen, duodenum, caecum and feces of cows. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2360-2364.
- Hartley R.D., Akin D.E., Himmelsbach D.S., 1990. Microspectrophotometry of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) cell walls in relation to lignification and wall biodegradability. *J. Sci. Food Agric.*, 50, 179-189.
- Jamot J., Grenet E., 1991. Microscopic investigation of changes in histology and digestibility in the rumen of a forage grass and a forage legume during the first growth stage. *Reprod. Nutr. Dev.*, 31, 441-450.
- Jarrige R., Grenet E., Demarquilly C., Besle J.M., 1995. Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. In : R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M-H. Farce et M. Journet (eds), Nutrition des ruminants domestiques - Ingestion et digestion, 25-82. INRA, Paris.
- Migné C., Prensier G., Grenet E., 1994. Immunogold labelling of xylans and arabinoxylans in the plant cell walls of maize stem. *Biol. Cell*, 81, 267-275.
- Migné C., Grenet E., Jamot J., 1996. Microbial degradation of the apical internode of Co125 and W401 maize in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 58, 165-185.
- Moore P.J., Staehelin L.A., 1988. Immunogold localization of the cell wall matrix polysaccharides rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L ; implication for secretory pathways. *Planta*, 174, 433-445.
- Moore P.J., Darvill A.G., Albersheim P., Staehelin L.A., 1986. Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalactan in the cell walls of suspension-cultured Sycamore cells. *Plant Physiol.*, 82, 787-794.
- Morrison III W.H., Akin D.E., Himmelsbach D.S., Gamble G.R., 1993. Investigation of the ester - and ether-linked phenolic constituents of cell wall types of normal and brown midrib pearl millet using chemical isolation. Microspectrophotometry and ¹³C NMR spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.*, 63, 329-337.
- Northcote D.H., Davey R., Lay J., 1989. Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells. *Planta*, 178, 353-366.
- O'Brien T.P., Carr D.J., 1970. A suberized layer in the cell walls of the bundle sheath of grasses. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23, 275-287.
- Regal V., 1960. The evaluation of the quality of pasture grasses by the microscopic method. *Proc. 8th Internation. Grassl. Congr.*, 1960, England, 522-524.
- Ruel K., Joseleau J.P., 1984. Use of enzyme-gold complexes for the ultrastructural localization of hemicelluloses in the plant cell wall. *Histochem.*, 81, 573-580.
- Sénaud J., Bohatier J., Grain J., 1986. Comparaison du comportement alimentaire de 2 Protozoaires Ciliés du rumen, *Epidinium caudatum*, *Polyplastron multivesiculatum* : mécanismes d'ingestion et de digestion. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26, 287-289.
- Spencer R.R., Akin D.E., 1980. Rumen microbial degradation of potassium hydroxide-treated coastal bermudagrass leaf blades examined by electron microscopy. *J. Anim. Sci.*, 51, 1189-1196.
- Steppler H.A., 1951. Pasture studies XXXI. Lignification studies with various grass species. *Sci. Agric.*, 31, 1-14.
- Vian B., Brillouet J.M., Satiat-Jeunemaitre B., 1983. Ultrastructural visualization of xylans in cell walls of hardwood by means of xylanase-gold complex. *Biol. Cell.*, 49, 179-182.
- Wilson J.R., Hattersley P.W., 1989. Anatomical characteristics and digestibility of leaves of *Panicum* and other grass genera with C3 and different types of C4 photosynthetic pathway. *Aust. J. Agric. Res.*, 40, 125-136.
- Wilson J.R., Mertens D.R., Hatfield R.D., 1993. Isolates of cell types from sorghum stems : digestion, cell wall and anatomical characteristics. *J. Sci. Food Agric.*, 63, 407-417.

Abstract

Microscopical aspects of rumen microbial colonization and degradation of forage tissues.

Observation by microscopy of the different tissues of forage plants shows they are made of cells whose cell walls differ from one tissue to another in thickness, lignification, etc. The disappearance of the different tissues in the rumen occurs in a particular order : the phloem and the parenchyma disappear first while the xylem vessels remain extensively undegraded. Degradation of leaf tissues is more rapid than that of the stem.

A comparative study of normal and bm3 maize has shown that the lignified walls of the mutant line, which is more digestible, are partially degraded in the rumen.

The degradation of the tissues during plant maturation is reduced by lignification of the cell walls.

Alkali treatment of cereal straws allows the degradation of some cell walls that are undegradable in untreated plants.

The micro-organisms involved in plant cell wall degradation can be observed by microscopy. The adhesion of bacteria to cell walls, the swallowing of plant fragments by protozoa and the particular process by which anaerobic fungi colonize lignified tissues are described.

Grenet E., 1997. Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen. *INRA Prod. Anim.*, 10 (3), 241-249.