



**HAL**  
open science

## Dosage de la cellulose et des composés phénoliques du bois de robinier. Projet Carbonex

Céline Sorbier

► **To cite this version:**

Céline Sorbier. Dosage de la cellulose et des composés phénoliques du bois de robinier. Projet Carbonex. 2015, 24 p. hal-01269081

**HAL Id: hal-01269081**

**<https://hal.science/hal-01269081>**

Submitted on 5 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.



## SORBIER Céline

# Dosage de la cellulose et des composés phénoliques du bois de robinier. Projet Carbonex



Rapport de stage du 5 Janvier au 27 Février 2015  
INRA Val de Loire, Centre d'Orléans  
Unité d'Amélioration Génétique et Physiologie Forestières  
Plateforme régionale GENOBOIS

Maître de stage : Jean-Paul CHARPENTIER, ingénieur de recherche

Tuteur : Kévin ADER, technicien de laboratoire

Professeur référent : Marie-Laure HUGUET



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier M. Gilles PILATE, directeur de l'unité d'Amélioration Génétique et Physiologie Forestière au sein de l'INRA Val de Loire d'Orléans pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire afin d'effectuer mon stage.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à mon maître de stage, M. Jean-Paul CHARPENTIER, ingénieur de recherche responsable de la plateforme régionale Génobois, pour sa disponibilité et les aides qu'il m'a apportées au cours de mon stage.

Je souhaite également remercier Mme Nathalie BOIZOT, assistante ingénieur de recherche pour sa gentillesse, ainsi que M. Kévin ADER, technicien de laboratoire pour m'avoir encadrée et transmis ses savoirs tout au long de mon stage.

Pour finir, ma reconnaissance va également aux membres de l'INRA pour leur accueil et leur gentillesse.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique

**INSERM** : Institut National de la Santé et de la Recherche Médical

**CIRAD** : Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

**UAGPF** : Unité de l'Amélioration Génétique et Physiologie Forestière

**URZF** : Unité de recherche de Zoologie Forestière

**URSS** : Unité de recherche Science du Sol

**GBFOR** : Génétique et Biomasse Forestière d'Orléans

**CGAF** : Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers

**SDAR**: Services d'Appui à la Recherche

**ARCHE** : Arbre et Réponses aux Contraintes Hybrides et Environnementales

**ONF**: Office National des Forêts

**CNOC** : Commission Nationale des Outils Communs

**BioGeCo** : Biodiversité des gènes et communautés

**EPRC** : Etude Pluridisciplinaire du Robinier et de ses Coproduits

**ROB** : robinétine

**DHR** : Dihydrorobinétine

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography (Chomatographie Liquide Haute Performance)

**MeOH** : Méthanol

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Solution de Carbonate de sodium

**NaClO<sub>2</sub>** : Solution de Chlorite de sodium

**NaOH** : Solution d'Hydroxyde de sodium (=soude)

**mL** : millilitre

**µL** : microlitre

**L** : Litre

**mg** : milligramme

**g** : gramme

**µg** : microgramme

**°C** : degrés Celsius

**%** : pour cent

**h** : heure

**min** : minutes

**nm** : nanomètre

**MS** : matière sèche

**rpm** : rotations par minute

**pH** : potentiel Hydrogène



# **SOMMAIRE**

## **I. INTRODUCTION**

### **1. Introduction générale**

- 1.1 L'Institut National de la Recherche Agronomique
- 1.2 L'INRA Val de Loire
  - 1.2.1 L'unité d'Amélioration Génétique et Physiologie Forestière
  - 1.2.2 La plateforme régionale GénoBois : Analyse des propriétés du bois

### **2. Introduction scientifique**

- 2.1 Le projet EPRC Carbonex
- 2.2 Le projet ValRob
- 2.3 Le robinier (Photo 1)
- 2.4 Les constituants chimiques de la paroi végétale du bois
  - 2.4.1 La lignocellulose
  - 2.4.2 Les lignines (Figure 3)
  - 2.4.3 La cellulose (Figure 4)
  - 2.4.4 L'hémicellulose (Figure 6)
- 2.5 Les composés phénoliques
- 2.6 Les objectifs du stage

## **II. MATERIELS ET METHODES**

### **1. Matériel d'étude : le bois de robinier**

### **2. Hygiène et sécurité**

### **3. Extractions des composés phénoliques**

- 3.1 Matériels et produits utilisés
- 3.2 Mode opératoire
  - 3.2.1 Préparation du solvant d'extraction
  - 3.2.2 Extraction des composés phénoliques

### **4. Dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu**

- 4.1 Matériels et produits utilisés
- 4.2 Mode opératoire du dosage des phénols totaux par le réactif de Folin
  - 4.2.1 Préparation de la gamme étalon
  - 4.2.2 Le mélange réactionnel
  - 4.2.3 Préparation et lecture des plaques

## **5. Analyse des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

5.1 Mode opératoire des analyses des composés phénoliques par HPLC

## **6. Dosage de la cellulose de la poudre de bois extraite**

6.1 Matériels et produits utilisés

6.2 Mode opératoire des dosages de la cellulose

6.2.1 Préparation de la poudre de bois

6.2.2 Obtention de la fraction d'holocellulose

6.2.3 Obtention de la fraction  $\alpha$ -cellulose

## **III. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **1. Variation des teneurs en cellulose dans le bois de robinier**

1.1 L'holocellulose

1.2 L' $\alpha$ -cellulose

1.3 L'hémicellulose

### **2. Variation des teneurs en phénols totaux dans le bois de robinier**

2.1 Teneur en phénols totaux exprimés en mg équivalent de dihydrorobinétine par g de matière sèche

2.2 Teneur en phénols totaux exprimés en mg équivalent de robinétine par g de matière sèche.

### **3. Teneurs en dihydrorobinétine et robinétine mesurées par méthode chromatographique (HPLC)**

3.1 La dihydrorobinétine

3.2 La robinétine

## **IV. CONCLUSIONS**

1. Conclusion scientifique

2. Conclusion personnelle

## **LEXIQUE**

## **BIBLIOGRAPHIE ET SITOGRAFIE**

## **ANNEXES**

# **I. INTRODUCTION**

## **1. Introduction générale**

### 1.1 L'Institut National de la Recherche Agronomique

L'Institut National de la Recherche Agronomique est un organisme français fondé en 1946. C'est un établissement public à caractère scientifique et technologique. Depuis 1984 cet établissement est placé sous la tutelle du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche ainsi que du ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt.

En effet, au niveau mondial, il s'agit de l'organisme majoritaire dans la recherche agronomique, il est classé second pour ses nombreuses publications en sciences agricoles.

Et enfin au niveau européen, il figure comme le premier institut scientifique.

L'INRA travaille sur des recherches visant à maintenir un développement durable. Ses recherches se fondent sur les domaines de l'alimentation, de l'agriculture et de l'environnement. L'INRA est composé de 17 centres répartis sur l'ensemble du territoire français et engagé dans 13 départements scientifiques et 8 métaprogrammes. Ceci représente 48 unités expérimentales et 199 unités de recherche propres ou associant d'autres organismes de recherche, des universités, des écoles ou des instituts techniques.

De plus, l'INRA a de bons rapports scientifiques avec de grands laboratoires français tels que l'Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (INSERM) mais aussi le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). Cela lui permet d'entretenir son réseau auprès de ses partenaires.

### 1.2 L'INRA Val de Loire

En 2012, le Centre d'Orléans a fusionné avec celui de Tours pour devenir le centre-Val de Loire. L'INRA d'Orléans fut créé en 1972. Ce centre compte environ 200 personnes titulaires et accueille un bon nombre d'étudiants (de BTS à Master). Le site de l'INRA s'étend sur 63 hectares dont 35 hectares de pépinières.

Le centre-Val de Loire est placé sous la direction d'une présidente responsable de la vie collective et de l'animation scientifique du centre. Elle est assistée par le directeur des services d'appui à la recherche. Il est responsable de la gestion du personnel, de la gestion financière, des services techniques et collectifs.

Les recherches développées sur le site concernent les domaines de la forêt, les insectes, les sols avec une orientation marquée en matière d'environnement et de développement durable. L'INRA d'Orléans est composé de 7 unités :



- 3 unités de recherche :
  - Unité de Recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (UAGPF)
  - Unité de Recherche de Zoologie Forestière (URZF)
  - Unité de Recherche Science du Sol (URSS)
  
- 1 unité de service :
  - Unité de Service Infosol
  
- 2 unités expérimentales :
  - Unité Expérimentale Génétique et Biomasse Forestière d'Orléans (GBFOr)
  - Unité Expérimentale de Bourges
  
- 1 unité d'appui à la recherche :
  - Les Services d'Appui à la Recherche (SDAR)

### 1.2.1 L'unité d'Amélioration Génétique et Physiologie Forestière

L'unité d'Amélioration Génétique et Physiologie Forestières (UAGPF) dirigée par M. Gilles PILATE, est composée d'environ quarante personnes. Cette unité interagit avec trois autres branches locales : l'unité expérimentale Génétique et biomasse Forestières d'Orléans (GBFOr), le Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers (CGAF) de l'Office National des Forêts (ONF) et l'unité Arbre et Réponses aux Contraintes Hybrides et Environnementales (ARCHE) de l'université d'Orléans. L'unité rassemble des compétences en génétique, génomique et physiologie appliquées à l'étude des arbres forestiers, plus précisément sur six espèces qui sont : le frêne, le merisier, le sapin de Douglas, le pin sylvestre, le mélèze et le peuplier.

L'UAGPF possède une expertise reconnue en génétique, en biotechnologie et en génomique chez les arbres forestiers, qui lui assure un partenariat solide et une implication dans les projets de recherche régionaux tel que le projet *Carbonex* et *Valrob*, mais aussi nationaux tel que *Futurol* ou *SysBioPop*, et européens comme *Procogen*, *Tree for Joules* et *Trees4Future*.

Les recherches menées visent à valoriser les ressources génétiques forestières en vue d'une production durable de bois d'œuvre et de biomasse tout en prenant en compte l'impact écologique des populations domestiquées sur l'écosystème et un contexte climatique changeant. L'UAGPF s'investit dans des stratégies innovantes en sélectionnant et en diffusant les progrès génétique. Elle est impliquée dans l'évaluation et la gestion de la diversité génétique ainsi que dans l'étude des interactions entre les variétés améliorées et les populations sauvages correspondantes, aidant ainsi à la définition des stratégies de gestion et de conservation des ressources génétiques forestières.

Pour mener à bien ces recherches, l'unité s'appuie principalement sur une espèce, le peuplier, et utilise des méthodes de biologie pour mieux comprendre les caractères complexes participant au développement de l'arbre (croissance, propriétés du bois), à son adaptation aux contraintes environnementales (résistance aux agents pathogènes, utilisation de peu d'eau), concourant ainsi à la construction du meilleur phénotype pour les arbres. Elle s'organise autour de plusieurs laboratoires : Histologie, Biologie Moléculaire, Biologie Cellulaire, Biochimie Analytique.

### 1.2.2 La plateforme régionale GénoBois : Analyse des propriétés du bois

Le bois est aujourd'hui devenu l'un des sujets de recherche majoritaires dans les programmes d'amélioration des arbres forestiers et son étude fait l'objet de plusieurs projets développés à l'INRA d'Orléans dans l'unité AGPF. Le plateau technique GénoBois a vu le jour en 2008 et a été labellisé par la Commission Nationale des Outils Communs (CNOC) de l'INRA. Celle-ci rentra en activité en 2009 et sera à nouveau labellisé en plateforme technologique régionale en 2013.

GénoBois est dirigé par M. Jean-Paul CHARPENTIER et comprend douze personnes réparties dans différents ateliers et laboratoires.

Celle-ci a pour principal objectif de répondre aux besoins expérimentaux de phénotypage en masse des propriétés physico-chimiques du bois. Elle regroupe les compétences sur l'étude du bois réparties sur deux unités. Une à l'INRA d'Orléans : AGPF, et une unité de l'INRA de Bordeaux : Biodiversité des gènes et Communautés (BioGeCo). Cela permet de progresser sur l'analyse, la productivité et la qualité du bois des arbres forestiers, l'influence de l'amélioration génétique, l'influence des changements globaux, sur le fonctionnement et les caractéristiques des arbres. Ces objectifs scientifiques font appel à des travaux de biochimie, de biologie cellulaire, d'histologie, de préparation et de traitement du bois en général.

Elle est équipée de broyeurs, de tamiseurs afin de préparer les échantillons, les bois sont analysés par immuno-marquages, microscopie optique, spectrométrie proche infrarouge. Depuis 2011, la plateforme GénoBois est équipée d'un laboratoire de chimie du bois capable d'analyser les constituants chimiques structuraux du bois comme les lignines et la cellulose par dosage biochimique.

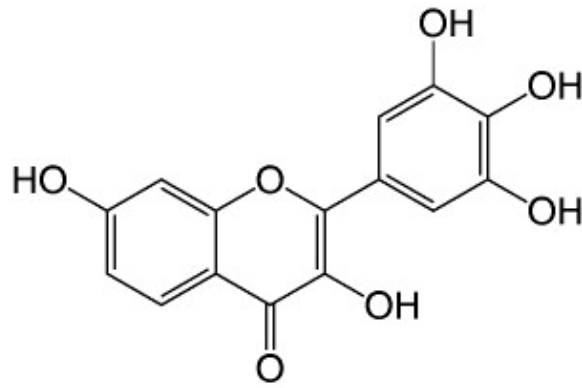
## **2. Introduction scientifique**

### 2.1 Le projet EPRC Carbonex

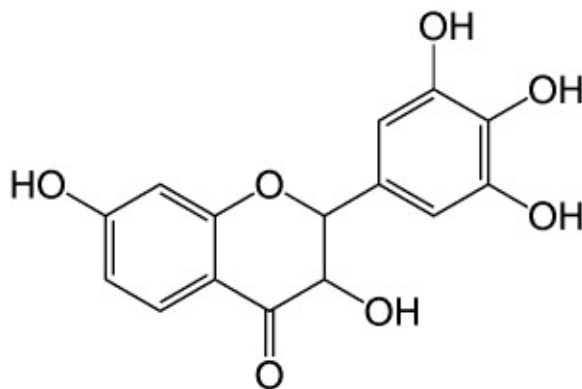
La société Carbonex est installée à Gyé sur Seine depuis 1993. C'est une entreprise d'ensachage de charbon de bois et de fabrication de briquettes de charbon de bois à usage domestique (barbecue).

La chambre d'agriculture de l'Aube et la société Carbonex de Gyé-sur-Seine, collaborent sur un projet de culture de robinier. Afin d'assurer un encadrement scientifique pour ce projet, la société Carbonex a sollicité et obtenu un financement européen et régional de la région Champagne-Ardenne pour un programme de recherche collaboratif sur le robinier. Le programme se définit autour de plusieurs axes :

- L'évaluation de la qualité du bois de robinier ainsi que la multiplication clonale en pépinière d'arbres sélectionnés et le test de ces clones sur le terrain.
- Le test des techniques de production en comparant différentes modalités de densité, de durée de rotation et différences provenances d'arbres.
- L'étude de l'impact de l'implantation des robiniers sur les caractéristiques chimiques et physiques du sol.



**Figure 1** : Formule chimique de la robinétine (famille des flavonoïdes)



**Figure 2** : Formule chimique de la dihydrorobinétine (famille des flavonoïdes)



**Photo 1** : Coupe transversale d'un tronc de robinier

## 2.2 Le projet ValRob

Le projet *ValRob* est un projet de valorisation des molécules que l'on peut extraire du bois de robinier. C'est un projet subventionné par la région Centre Val de Loire initié et coordonné par l'unité AGFP et qui regroupe des équipes de recherches académiques des Universités d'Orléans et de Tours, de l'INRA Centre-Val de Loire et des entreprises du secteur de la cosmétique ou de la phytopharmacie.

Un des objectifs principaux de ce projet est d'évaluer la quantité des composés phénoliques en particulier la robinétine (**Figure 1**) et la dihydrorobinétine (**Figure 2**) présentes dans le bois de robinier. La robinétine est une molécule naturellement fluorescente, et la dihydrorobinétine présente des propriétés anti-oxydantes et antimicrobiennes. L'action de ces propriétés, très efficace, ont été testées et prouvées sur des parasites de plantes comme les plantes maraichères, ainsi que sur des plantes de plus grande culture comme la vigne par exemple qui est un domaine qui utilise une grande quantité de pesticides. La recherche essaie donc de trouver un moyen plus naturel pour protéger leur culture.

Le second objectif est d'évaluer la variation de la robinétine et de la dihydrorobinétine présentes dans différents échantillonnages provenant de plusieurs spécimens d'arbres sélectionnés.

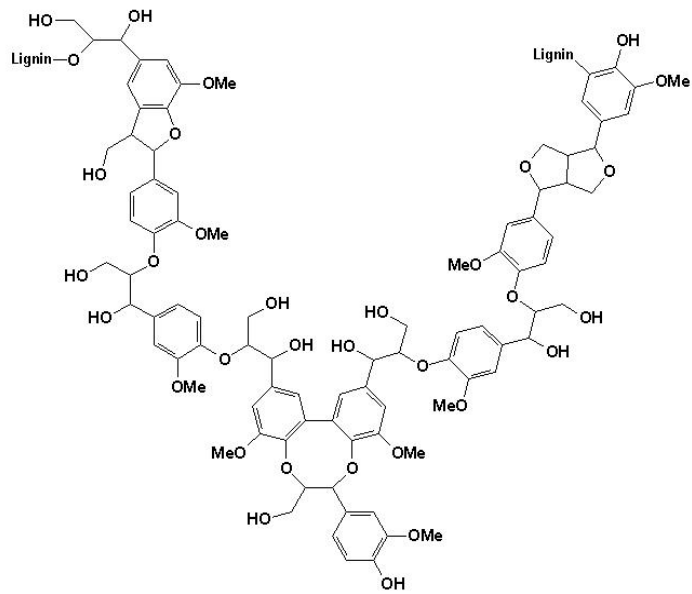
## 2.3 Le robinier (Photo 1)

Le robinier (*Robinia pseudoacacia*) est une espèce de la famille des Fabacées venant d'Amérique du Nord. C'est un arbre de croissance rapide et d'une grande longévité. Résistant au froid, il peut se multiplier rapidement dans les sols et sous les climats les plus variés préférant toutefois un terrain bien approvisionné en eau. Cependant il est très envahissant en milieu forestier dû à ses rejets de souche et au drageonnement. Le robinier est une légumineuse, il a la capacité de fixer l'azote atmosphérique au niveau de ses racines et ainsi d'enrichir le sol : son utilisation permettrait alors d'éviter l'apport d'engrais azotés pour les cultures de biomasse. Le robinier est cultivé pour la qualité de son bois, très dur et dense. Il pourrait remplacer les essences exotiques tropicales car son bois est très durable et peut être utilisé sans traitement chimique, il détient la troisième place des essences feuillues de plantation dans le monde (après le peuplier et l'eucalyptus).

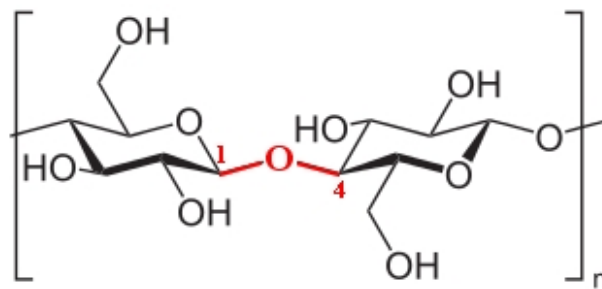
L'unité AGFP dans le cadre des projets Carbonex et ValRob, travaille sur les extractibles du bois de robinier et plus particulièrement sur les composés phénoliques.

## 2.4 Les constituants chimiques de la paroi végétale du bois

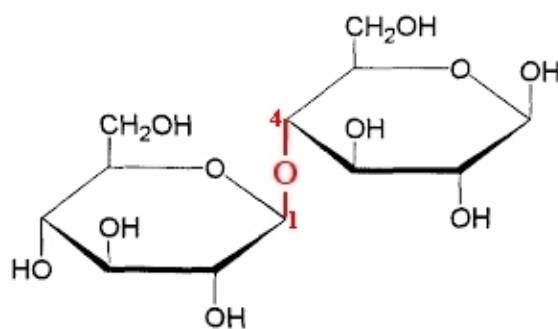
Le bois est constitué de trois principaux composants : la lignine, la cellulose et l'hémicellulose. La cellulose constitue les fibres de bois orientées dans l'axe de l'arbre. La lignine est une substance complexe qui s'incruste dans les parois des fibres. L'hémicellulose permet de fortifier les parois cellulaires et les fibres de cellulose. Dans le bois, on retrouve 15 à 35% de lignine, 35 à 50% de cellulose et 25 à 30% d'hémicellulose.



**Figure 3** : Représentation d'une configuration possible de la structure chimique de la lignine



**Figure 4** : Formule chimique de la cellulose



**Figure 5** : Formule chimique du cellobiose

### 2.4.1 . La lignocellulose

La matière lignocellulosique est le constituant principal de la paroi cellulaire des plantes. Elle est la source de carbone renouvelable la plus abondante. À l'intérieur de la biomasse lignocellulosique, ces trois macromolécules s'entremêlent et forment une structure tridimensionnelle complexe et très résistante, maintenue par des liaisons hydrogènes et des liaisons covalentes qui confèrent de la rigidité aux plantes.

De nos jours, elle est utilisée dans différentes industries du bois, papeterie ou menuiserie. Cette source de carbone abondante est la principale alternative pour la production de biomasse à des fins énergétiques comme la production de biocarburant.

### 2.4.2 Les lignines (Figure 3)

Principalement situées dans la paroi secondaire de la cellule, les lignines confèrent une meilleure rigidité et un bon maintien aux cellules de bois. De plus, les lignines étant hydrophobes, elles permettent l'imperméabilité des cellules. Elle est représentée sous forme tridimensionnel composée de monomères qui sont l'alcool coumarylique, l'alcool coniférique et l'alcool sinapyllique.

Ces composés sont issus de la biotransformation de la phénylalanine, un acide aminé synthétisé par les plantes à partir de la cellulose. Les lignines possèdent un pouvoir calorifique, c'est pour cela qu'elles sont très recherchées dans le bois de chauffage.

Elles sont jusqu'à maintenant considérées comme un résidu dans l'industrie et ne sont en général que brûlées pour fournir de l'énergie de chauffage mais plusieurs études s'orientent vers une valorisation plus importante, innovante et d'intérêt des lignines soit par transformation chimique ou soit par incorporation dans des matériaux composites.

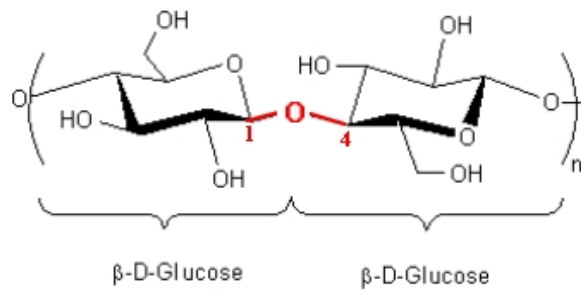
Cependant, je n'ai pas pratiqué l'expérience, mais je la traite ci-dessus car il s'agit d'une étape importante au projet *Carbonex*.

### 2.4.3 La cellulose (Figure 4)

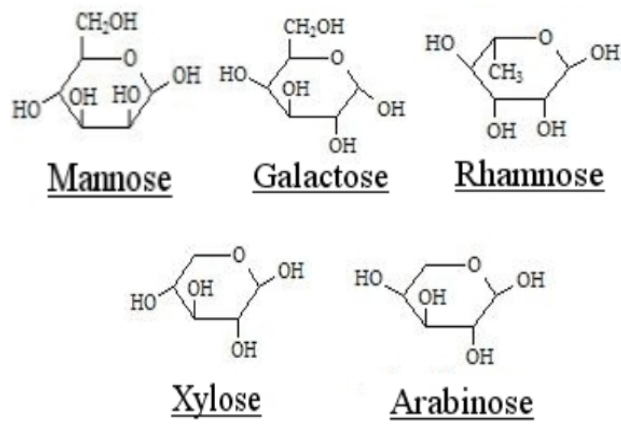
La cellulose est un polysaccharide constitué d'une chaîne linéaire de molécules de D-glucose. Cette longue chaîne glucidique est constituée de liaisons glycosidique de type  $\beta 1 \rightarrow 4$  et est uniquement constituée de cellobiose (**Figure 5**) qui est un dimère du glucose. C'est le principal constituant du bois, elle a un rôle structural dans la grande majorité des parois végétales. Elle procure au bois des propriétés d'élasticité et de solidité. La cellulose est la base de la fabrication du papier.

### 2.4.4 L'hémicellulose (Figure 6)

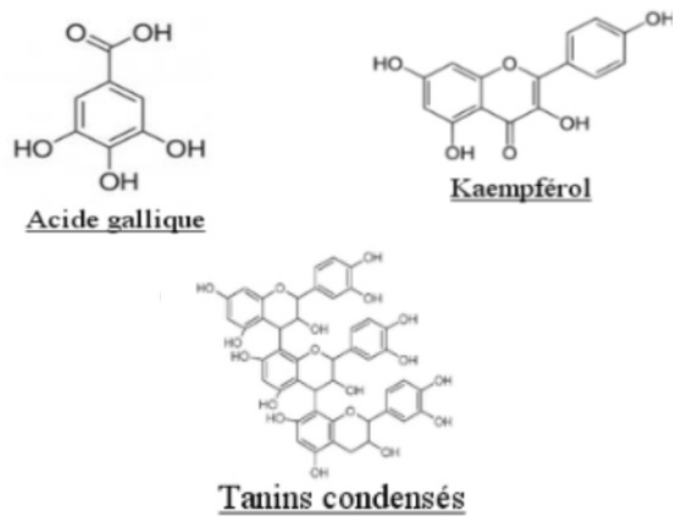
L'hémicellulose est un polymère branché avec différents types de sucres, en plus du glucose. Les monomères de l'hémicellulose peuvent être du xylose, du mannose, du galactose, du rhamnose ou de l'arabinose. (**Figure 7**) Ils sont constitués par des sucres à six carbones (hexoses) ou des sucres à 5 carbones (pentoses). Par rapport à la cellulose, l'hémicellulose est assez hydrolysable par les acides. Elle constitue en quelque sorte le ciment de la paroi végétale qui englobe les autres éléments de la paroi.



**Figure 6** : Formule chimique de l'hémicellulose



**Figure 7** : Exemple de monomère de l'hémicellulose



**Figure 8** : Exemple de composés phénoliques

## 2.5 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines ou la maturation des fruits. Il existe plusieurs familles des composés phénoliques : les flavonoïdes, les tannins et les acides phénoliques. (**Figure 8**).

Dans le bois, ils constituent la plus grande partie des extractibles et participent à la couleur des bois et confèrent au bois ses qualités de durabilité naturelle c'est-à-dire la résistance aux attaques d'éléments extérieurs (champignons, insectes).

## 2.6 Les objectifs du stage

Sur un échantillonnage de bois de robinier prélevé sur des arbres répartis en France dont j'ai pris en charge une partie, j'ai dû mener plusieurs types d'analyses sur différents constituants du bois. Mon premier objectif a été la mise en œuvre des dosages de la cellulose afin d'évaluer le pourcentage contenu dans le bois de robinier et sa variation au sein d'une population. Mon second objectif a été la mise en œuvre des dosages des composés phénoliques dans le bois de robinier et en évaluer leur répartition au sein de la population analysée. Seront analysés, les composés phénoliques totaux par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu ainsi que les deux principales molécules du bois de robinier, c'est-à-dire la robinétine et la dihydrorobinétine par Chromatographie Liquide Haute Performance. (HPLC)





**Photo 2** : Carotte de bois de robinier



**Photo 3** : Système d'évaporation sous vide « *Speed-Vac* »

## **II. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **1. Matériel d'étude : le bois de robinier**

Lors de ce stage, j'ai pu analyser une centaine d'échantillons provenant de différentes régions de France : l'Aquitaine, l'Auvergne, la Picardie, Midi-Pyrénées, la Champagne-Ardenne, etc... Ces échantillons ont été prélevés sous forme de carotte (**Photo 2**) entre le 18 Avril 2011 et le 28 Mai 2013. L'âge des arbres sélectionnés varie entre 25 et 60 ans et la densité des peuplements va de 20 à 1120 arbres/ha (**Annexe I et II**)

### **2. Hygiène et sécurité**

Pour manipuler au sein d'un laboratoire, il faut porter les Équipements de Protection Individuelle (EPI) c'est-à-dire une blouse fermée obligatoirement ainsi que des gants lors de la manipulation de produits dangereux et des lunettes en cas de projection. Le matériel ayant contenu un produit chimique doit être jeté dans une poubelle spéciale avec un couvercle rouge. Pour la préparation des solvants, il faut les manipuler sous une hotte.

### **3. Extractions des composés phénoliques**

Environ 50 mg de poudre de bois est mise à macérer dans un solvant organique : l'acétone à 80% supplémenté avec de la 6-méthoxyflavone (témoin interne pour les analyses HPLC). Elle est soumise à l'action des ultra-sons qui permettent la libération des composés phénoliques dans le solvant. On l'agite pendant 1h puis on centrifuge. Après centrifugation, le surnageant contenant les polyphénols est récupéré puis le culot subit une deuxième extraction. Les surnageants sont regroupés puis un aliquote (500 µL) est séché au *Speed-Vac*. Le résidu sec ainsi obtenu est repris dans du méthanol (MeOH). On obtient un extrait végétal qui peut servir à plusieurs types d'analyses comme les dosages des polyphénols totaux par le réactif de Folin ou encore les analyses HPLC.

#### 3.1 Matériels et produits utilisés

- 6 Méthoxyflavone à  $10^{-4}$  mol/L
- Acétone 80%
- Bain à ultra-sons
- Agitateur rotatif
- Centrifugeuse réfrigérée à 4°C
- Balance Ohaus
- Tubes à hémolyses de 5 mL
- Tubes à Eppendorf de 2 mL
- Pipette automatique P1000
- *Speed-Vac* (**Photo3**)
- Portoir flottant

## 3.2 Mode opératoire

### 3.2.1 Préparation du solvant d'extraction

Dans une éprouvette graduée de 500 mL, ajouter la masse de 6-méthoxyflavone pesée (=12,6 mg) la dissoudre dans 400 mL d'acétone et compléter avec 100 mL d'eau. Le contenu de l'éprouvette est transvasé dans un flacon de 1L équipé d'une dispensette et stocké à 4°C.

### 3.2.2 Extraction des composés phénoliques

Pour éviter la dégradation des composés phénoliques, nous travaillons dans une chambre froide à 4°C. Peser environ exactement 50 mg de poudre de bois en tube *Eppendorf* de 2 mL. Ajouter 1,8 mL de solvant d'extraction et mélanger.

Insérer les tubes sur un portoir flottant, le placer dans un bain à ultra-sons rempli au  $\frac{3}{4}$  avec de l'eau et laisser agir 1h en agitant régulièrement pour faciliter l'éclatement des cellules. Transférer les tubes sur l'agitateur rotatif et laisser macérer 1h à 4°C. Centrifuger les tubes à 14000 rpm entre 15 et 20 min. On transverse le surnageant dans un tube de 5 mL.

Une deuxième extraction est refaite à partir du culot afin de récupérer un volume final entre 3 et 3,5 mL pour avoir un maximum de composés phénoliques. Sous la hotte, prélever 500  $\mu$ L de surnageant à l'aide d'une pipette automatique P1000 et les transférer en tubes *Eppendorf* de 2 mL, évaporer à sec pendant environ 3h au *Speed-Vac*. Les résidus secs sont ensuite solubilisés dans 250  $\mu$ L de MeOH 100%. Les tubes sont stockés à 4°C.

## 4. Dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu

Le réactif de Folin est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

### 4.1 Matériels et produits utilisés

- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10
- Solution de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$  à 75g/L)
- Solutions étalons de robinétine (ROB) et de dihydrorobinétine (DHR) à 0,2 mg/mL
- Plaque de 96 puits
- Pipette automatique

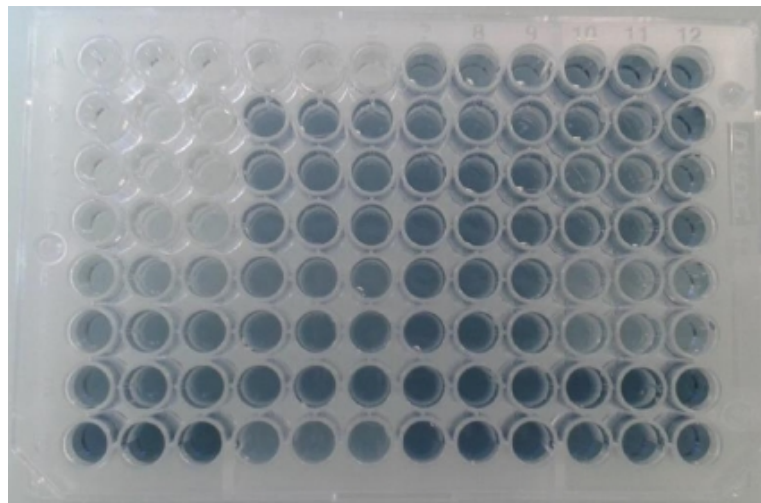
Les solutions sont conservées à 4°C

Tubes	0	1	2	3	4	5	6	7
[Solution étalon] ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	1	2	4	8	12	15	20
$V_{\text{solution étalon à } 0,2 \text{ mg/mL}}$ ( $\mu\text{L}$ )	0	5	10	20	40	60	75	100
$V_{\text{eau MilliQ}}$ (qsp 100 $\mu\text{L}$ )	100	95	90	80	60	40	25	0

**Tableau 1** : Préparation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux avec le réactif de Folin-Ciocalteu

0	0	0	B	B	B	E8	E8	E8	E16	E16	E16
1	1	1	E1	E1	E1	E9	E9	E9	E17	E17	E17
2	2	2	E2	E2	E2	E10	E10	E10	E18	E18	E18
4	4	4	E3	E3	E3	E11	E11	E11	E19	E19	E19
8	8	8	E4	E4	E4	E12	E12	E12	E20	E20	E20
12	12	12	E5	E5	E5	E13	E13	E13	E21	E21	E21
15	15	15	E6	E6	E6	E14	E14	E14	E22	E22	E22
20	20	20	E7	E7	E7	E15	E15	E15	E23	E23	E23

**Tableau 2** : Plan de dépôt des échantillons et des points de gamme sur la plaque de 96 puits. (B : le blanc. Les chiffres en vert : gamme d'étalonnage. Les chiffres en violet : échantillons à doser)



**Photo 4** : Exemple de résultat avec une gamme de dihydrorobinétine après réaction au réactif de Folin-Ciocalteu.

## 4.2 Mode opératoire du dosage des phénols totaux par le réactif de Folin

### 4.2.1 Préparation de la gamme étalon

Pour chaque solution étalon, une gamme est réalisée en milieu aqueux de concentrations 0 à 20 µg/mL selon le tableau ci-contre (**Tableau 1**)

Les échantillons sont dilués au 1/10 avec de l'eau milliQ pour un volume final de 100 µL. Le blanc ne contenant pas de polyphénols est réalisé comme le point 0µg/mL de la gamme c'est-à-dire avec 100µL d'eau milliQ.

### 4.2.2 Le mélange réactionnel

Une fois la gamme et les échantillons préparés, 500 µL de réactif de Folin dilué au 1/10 dans de l'eau ultra pure, sont ajoutés à 100 µL d'extrait dilué. On ajoute ensuite 400 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 75g/L permettant de révéler et amplifier la couleur de la réaction. Les mélanges réactionnels sont agités et incubés 5 min à 40°C.

### 4.2.3 Préparation et lecture des plaques

250 µL du mélange réactionnel sont distribués en triple sur une microplaque de 96 puits selon le plan de plaque présenté dans le tableau ci-contre (**Tableau 2**).

La plaque (**Photo 4**) se lie au spectrophotomètre à microplaque à 735 nm. Le logiciel par le biais de la gamme étalon, calcule la concentration moyenne des polyphénols présents dans les extraits végétaux en µg équivalent de ROB ou de DHR par mL.

## **5. Analyse des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

La chromatographie liquide à haute performance est une technique analytique basée sur la séparation des composés d'un mélange liquide. La séparation se fait en fonction de l'affinité des composés ciblés pour la phase stationnaire. En effet, plus un composé va interagir avec la phase stationnaire et plus il sera retenu par cette dernière et donc sera détecté plus tard que les composés ayant une plus faible affinité avec la phase stationnaire qui eux seront élués plus rapidement.

La séparation des différents échantillons se fait à l'aide d'une colonne thermostatée à 40°C. La phase stationnaire est composée de billes de silice greffée C18 et le débit de la phase mobile est de 1mL/min. Un gradient d'éluion est réalisé à l'aide de deux mélanges de solvants : une solution méthanol/acétonitrile (50/50) et une solution d'eau/acide acétique 1%. A la sortie de la colonne, les composés sont détectés grâce à une mesure de leur absorbance à 280 et à 340 nm.

Temps (min)	Composition solvant A eau/acide acétique 1% (en %)	Composition solvant B MeOH/ACN (en %)
0	85	15
0-10	75	25
10-22	0	100
27-32	85	15

**Tableau 3** : Composition du gradient d'élution utilisé pour l'analyse par HPLC.

Quantité de ROB et DHR (en µg) dans 15 µL	Vol. solution mère ROB à 1 µg/µL (µL)	Vol. solution mère DHR à 1 µg/µL (µL)	Vol. de MeOH ajouté (µL)
0.5	10	10	280
1	20	20	260
2	40	40	220
4	80	80	140
6	120	120	60
	Vol. solution mère ROB à 2 µg/µL (µL)	Vol. solution mère DHR à 2 µg/µL (µL)	Vol. de MeOH ajouté (µL)
8	80	80	140
10	100	100	100
12	120	120	60
14	140	140	20

**Tableau 4** : Composition de la gamme de calibration de la robinétine et de la dihydrorobinétine utilisée pour l'analyse HPLC

### 5.1 Mode opératoire des analyses des composés phénoliques par HPLC

La séparation se fait en mode gradient d'éluion permettant ainsi l'éluion des composés. La composition du gradient d'éluion utilisé pour l'analyse des composés phénoliques est indiquée dans le **tableau 3**. Les échantillons sont agités au vortex puis centrifugés 5 min à 14000 rpm. Ensuite, on place 100 µL des échantillons dans des inserts qui sont déposés dans un portoir réfrigéré à 4°C avant analyse chromatographique. Le volume injecté dans la colonne est de 15 µL. Avant le passage des échantillons en chromatographie liquide haute performance, une gamme de calibration est préalablement préparée et analysée par cette méthode analytique (**Tableau 4**), d'où on en tire les courbes de calibrations qui nous servent pour les calculs. Par la suite, nous obtenons un chromatogramme des molécules sorties. (**Annexe III, IV et V**)

## 6. Dosage de la cellulose de la poudre de bois extraite

Le dosage de la cellulose est représenté par deux sous-formes analysées : l'holocellulose (principalement cellulose et hémicellulose) et l' $\alpha$ -cellulose.

Pour enlever toute les matières extractibles, la poudre de bois précédemment extraite subit une délignification à chaud dans une solution de chlorite de sodium et dans du tampon acétate pour obtenir le résidu d'holocellulose. La fraction  $\alpha$ -cellulose est obtenue après une attaque alcaline avec une solution NaOH sur le résidu holocellulose.

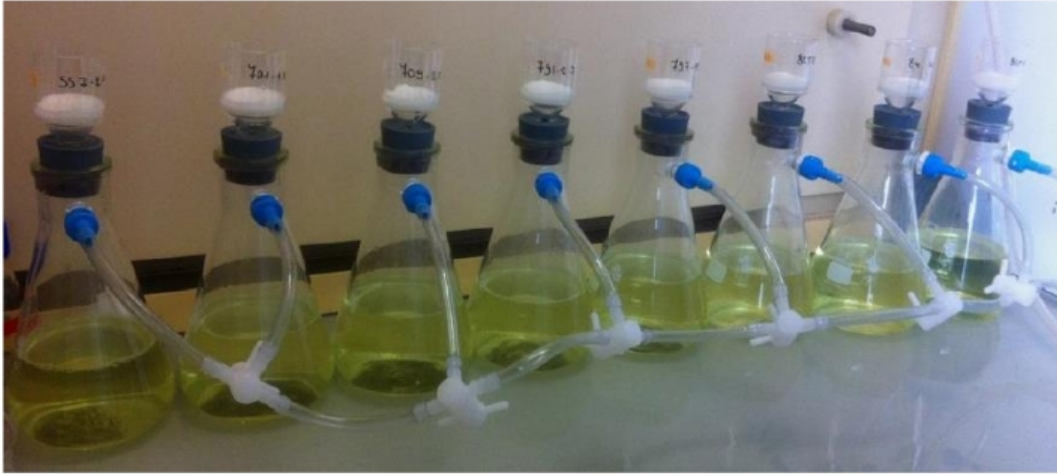
### 6.1 Matériels et produits utilisés

- Solution de chlorite de sodium ( $\text{NaClO}_2$ )
- Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH)
- Acide acétique
- Acétone
- Eau osmosée
- Balance *Mettler* PG503-SBR
- Balance *Sartorius*
- Bouteilles *Shoot* de 250 mL
- Barreaux aimantés
- Agitateur chauffant jusqu'à 450°C
- Creusets-filtres
- Dessiccateur

### 6.2 Mode opératoire des dosages de la cellulose

#### 6.2.1 Préparation de la poudre de bois

Dans les bouteilles correctement référencées avec le nom de l'échantillon, peser environ exactement 1g de poudre extraite. Noter sa masse.



**Photo 5** : Rampe de filtration utilisée pour les dosages de cellulose



**Photo 6** : Agitateur orbital



### 6.2.2 Obtention de la fraction d'holocellulose

Mettre les bouteilles dans un bain marie, chauffer, puis surveiller l'obtention de la température avec la sonde de la plaque chauffante. Dans les bouteilles, ajouter 80 mL de solution tampon acétate + 2 mL de solution de chlorite de sodium ( $\text{NaClO}_2$ ), à renouveler toutes les heures pendant 4h. Chauffer à  $76^\circ\text{C}$  avec agitation. On obtient une décoloration de la poudre qui correspond à la dégradation de la lignine.

Pendant la délignification, préparer la rampe de filtration et peser les creusets-filtres. **(Photo 5)** Noter la masse puis les conserver dans un dessiccateur. Placer les creusets-filtres sur les fioles de la rampe de filtration puis verser la solution pâteuse. Laver la pâte d'holocellulose et les bouteilles pour récupérer toute la matière avec 500 mL d'eau osmosée. Remuer la pâte de temps en temps pour faciliter le lavage en totalité. Ensuite, laver 2 fois avec 15 mL d'acétone pour obtenir une décoloration totale de la pâte. Mettre les creusets-filtres contenant l'holocellulose à sécher pendant une nuit à  $105^\circ\text{C}$ .

Après le séchage, mettre les creusets dans un dessiccateur pendant au moins 30 min pour un refroidissement complet. Peser les creusets et noter les masses. Conserver les creusets dans un dessiccateur pour pouvoir par la suite doser l' $\alpha$ -cellulose.

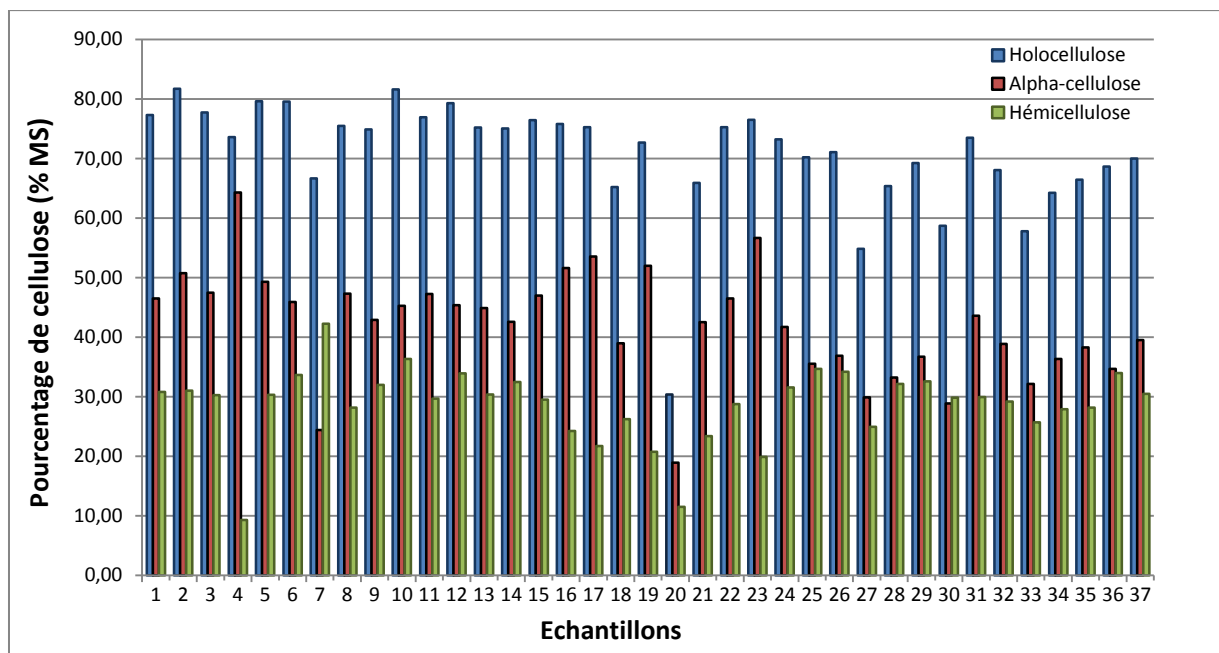
### 6.2.3 Obtention de la fraction $\alpha$ -cellulose

Peser à sec environ 600 mg d'holocellulose dans des petites bouteilles de 100 mL. Noter la masse. Placer les bouteilles à  $20^\circ\text{C}$  sur un agitateur orbital **(Photo 6)** avec des billes en verre. Ajouter 5 mL de solution NaOH à 17,5%, laisser mélanger pendant 5 min. Répéter l'opération deux fois encore toute les 5 min avec 2,5 mL de solution de NaOH à 17,5%. Ajouter une dernière fois 2,5 mL de NaOH à 17,5%, laisser mélanger pendant 30 min.

Pendant l'alcalinisation, peser les creusets-filtres à vide. Noter leur masse et préparer les rampes de filtration. Ajouter 16,5 mL d'eau ultra pure dans les bouteilles et bien mélanger. Transférer doucement et régulièrement le mélange dans chaque creuset puis verser en plusieurs fois 50 mL de NaOH à 8,3%.

Ensuite, laver 2 fois l' $\alpha$ -cellulose à l'eau puis ajouter 7,5 mL d'acide acétique à 10%, laisser en contact 1min minimum pour bien neutraliser le reste de la solution de NaOH. Laver l'excès à l'eau jusqu'à obtenir un pH entre 5 et 7 environ. Le dépôt d' $\alpha$ -cellulose doit être blanc, s'il est un peu jaune repasser de l'eau après avoir gratter la pâte et bien mélanger.

Enfin, récupérer les creusets, rincer les bords avec la pissette d'eau et faire sécher la poudre une nuit à  $105^\circ\text{C}$ . Après le séchage, mettre les creusets au dessiccateur pendant 15 min pour un refroidissement complet. Peser le résidu et noter sa masse.



**Figure 9** : Pourcentages de cellulose et d'hémicellulose obtenus sur le bois de robinier. Les barres horizontales permettent de visualiser les moyennes des différents taux de cellulose présent dans les échantillons.

### **III. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

#### **1. Variation des teneurs en cellulose dans le bois de robinier**

##### 1.1 L'holocellulose

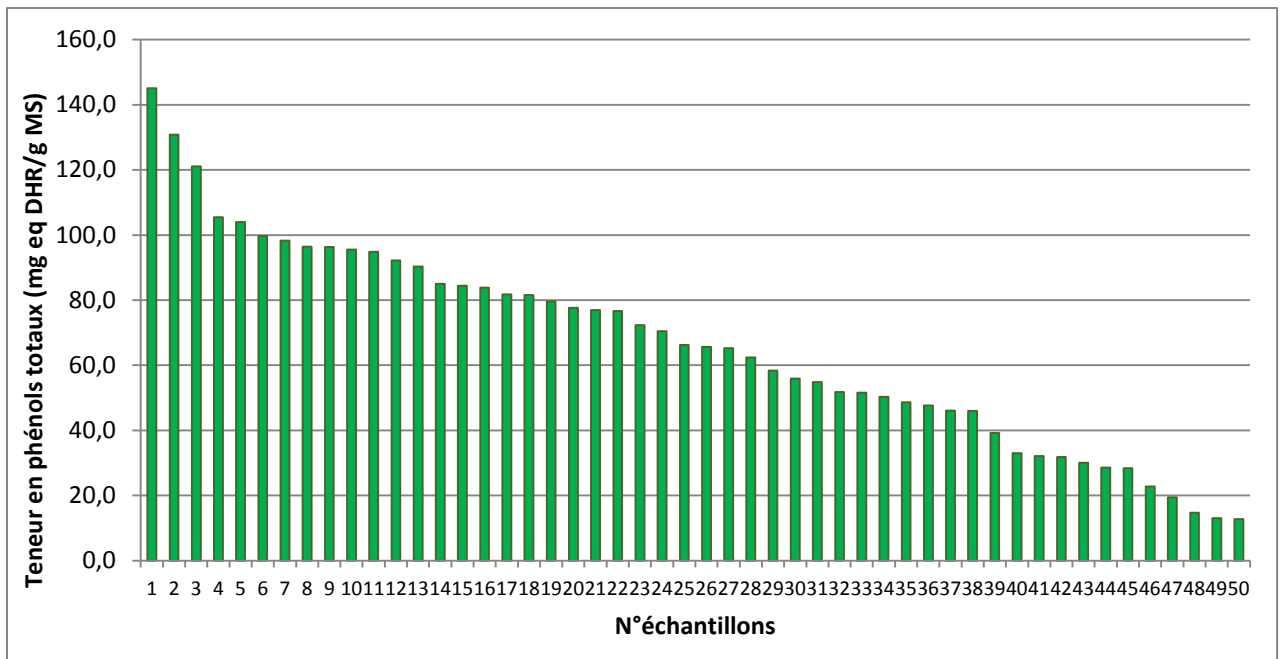
L'holocellulose correspond à l'addition de l' $\alpha$ -cellulose et de l'hémicellulose. Cela permet de considérer l'ensemble de la cellulose contenue dans la matière sèche du bois de robinier. Nous obtenons une variation entre les 37 échantillons analysés. **(Figure 9)** La moyenne contenue dans la matière sèche des échantillons est de 71 %. Nous obtenons une valeur minimum de 30 % pour le n°20 correspondant à l'échantillon 2 RIG 14-3 et une valeur maximum de 82 % pour le n°2 correspondant à l'échantillon 0 ILL 12-2. Le coefficient de variation est de 13%, ce qui est relativement faible. La répartition en holocellulose est plutôt stable quel que soit la provenance de l'individu.

##### 1.2 L' $\alpha$ -cellulose

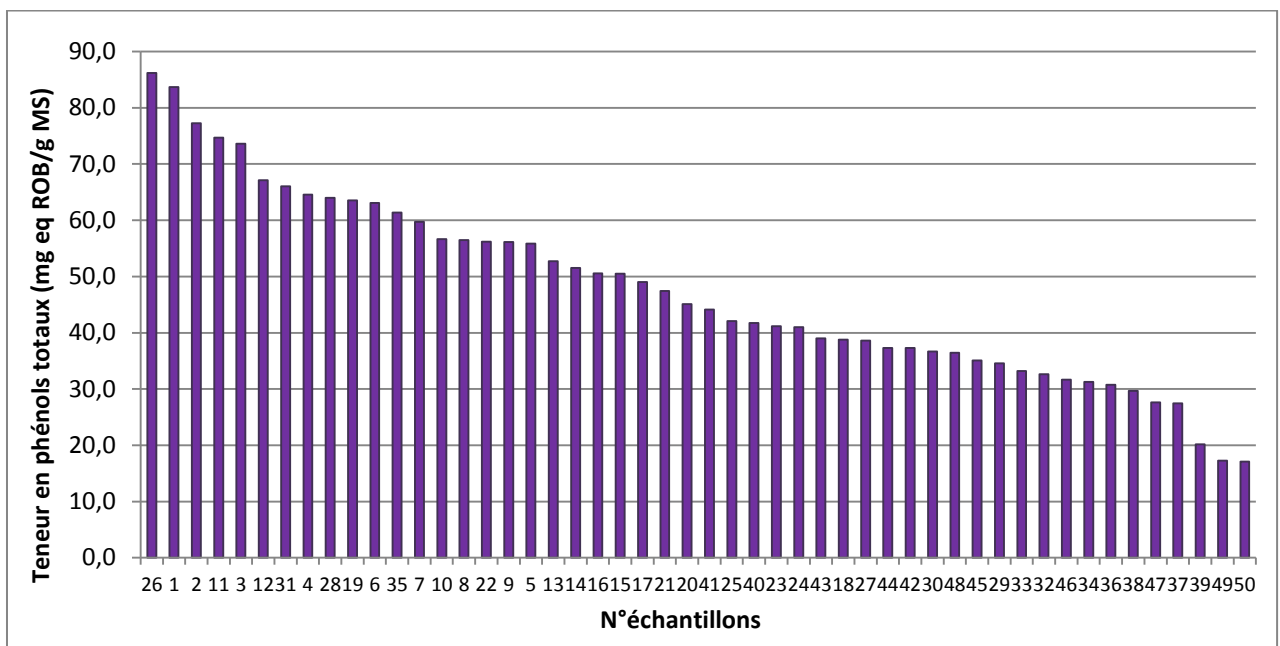
Pour les 37 échantillons analysés, nous obtenons une moyenne en  $\alpha$ -cellulose de 42%. Les résultats vont de 19% pour le n°20 correspondant à l'échantillon 2 RIG 14-3 et 64% pour le n°4 correspondant à l'échantillon 4 ART 24-1. **(Figure 9)** Le coefficient de variation en  $\alpha$ -cellulose contenus dans le bois de robinier est de 21%, ce qui est relativement important. Ce paramètre est donc important dans le choix des arbres pour la réalisation des différents programmes de sélection.

##### 1.3 L'hémicellulose

La moyenne en hémicellulose obtenue pour les 37 échantillons est de 29%. Nous obtenons une valeur minimum de 9% pour le n°4 qui correspond à l'échantillon 4 ART 24-1, et une valeur maximum de 42% pour le n°7 qui correspond à l'échantillon 4 ART 24-3. **(Figure 9)** Le coefficient de variation en hémicellulose contenues dans le bois de robinier est relativement important, il est de l'ordre de 22%. Il faut donc tenir compte de ce paramètre lors de la sélection d'individu pour une utilisation ciblée de la biomasse.



**Figure 10** : Teneur en phénols totaux contenus dans 50 échantillons du bois de robinier exprimée en mg équivalent de DHR par g de matière sèche.



**Figure 11** : Teneur en phénols totaux contenus dans 50 échantillons du bois de robinier exprimée en mg équivalent de ROB par g de matière sèche.

## **2. Variation des teneurs en phénols totaux dans le bois de robinier**

### **2.1 Teneur en phénols totaux exprimés en mg équivalent de dihydrorobinétine par g de matière sèche**

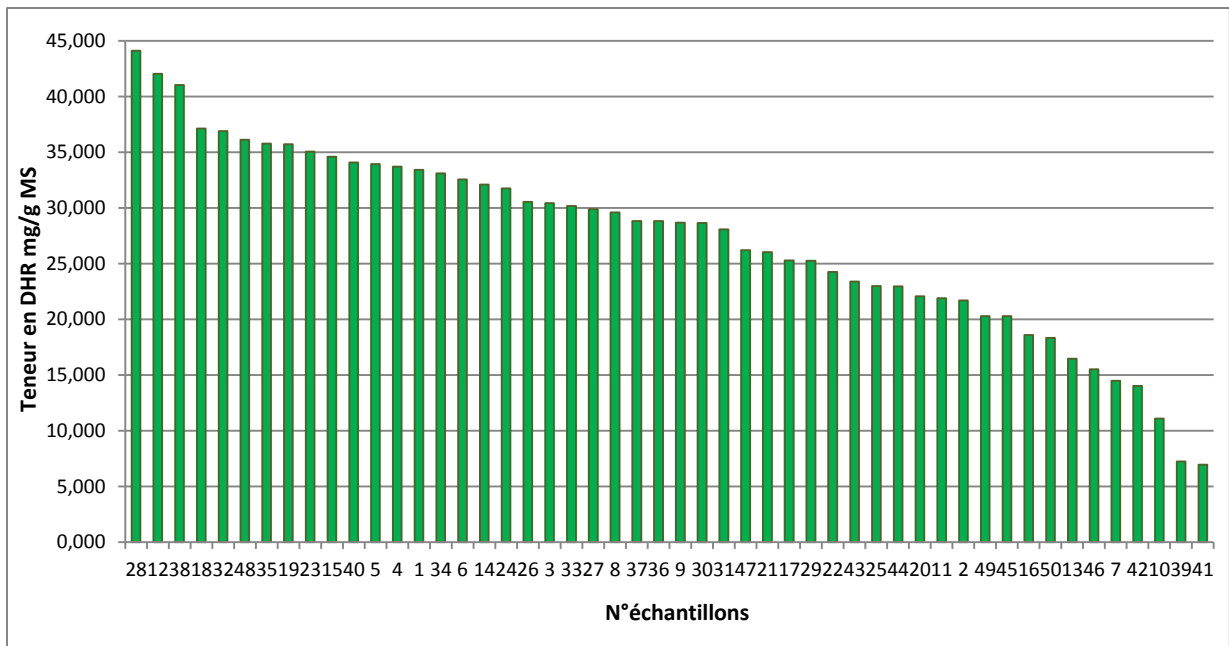
La variation des polyphénols totaux contenus dans la matière sèche entre les 100 échantillons que nous avons analysés est très importante. (**Figure 10**). La moyenne est de 78 mg équivalent de dihydrorobinétine par g de matière sèche.

Nous obtenons une valeur maximum de 168 mg équivalent DHR/g de matière sèche et une valeur minimum de 24 mg équivalent DHR/g de matière sèche. Le coefficient de variation obtenue est de l'ordre de 37%. Cela signifie que la teneur en phénols contenus dans le bois de robinier est très variée d'un individu à l'autre. Ce paramètre est donc à prendre en considération lors de l'élaboration de projets de sélection du bois de robinier.

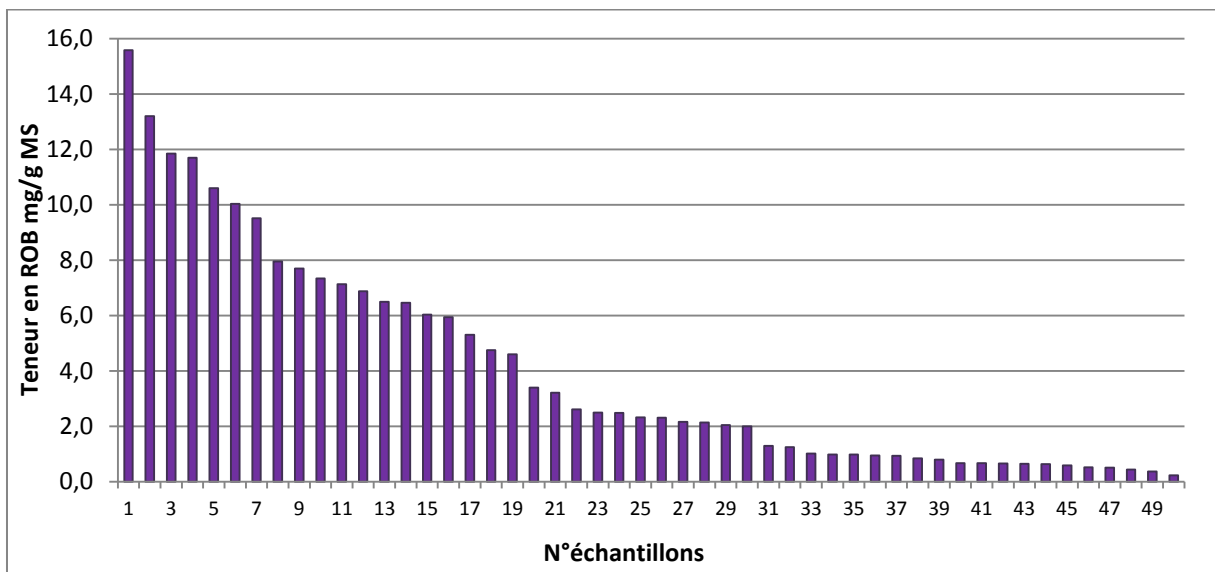
### **2.2 Teneur en phénols totaux exprimés en mg équivalent de robinétine par g de matière sèche.**

La variation des polyphénols totaux contenus dans la matière sèche entre les 100 échantillons que nous avons analysés est conséquente. (**Figure 11**) La moyenne est de 48 mg équivalent en robinétine par g de matière sèche.

Nous obtenons une valeur maximum de 95 mg équivalent ROB/g de matière sèche et une valeur minimum de 16 mg équivalent ROB/ g de matière sèche. Le coefficient de variation obtenue est de 36%, ce qui montre que la teneur en phénols totaux contenus dans le bois de robinier est très variée d'un individu à l'autre. Nous pouvons dire que ce paramètre est très important lors de la sélection d'un individu à multiplier pour la constitution de biomasse favorable à la production de composés phénoliques.



**Figure 12** : Teneur en dihydrorobinétine (DHR) dans le bois de robinier sur 50 arbres. Résultats exprimés en mg par g de matière sèche.



**Figure 13** : Teneur en robinétine (ROB) dans le bois de robinier sur 50 arbres. Résultats exprimés en mg par g de matière sèche.

### **3. Teneurs en dihydrorobinétine et robinétine mesurées par méthode chromatographique (HPLC)**

#### **3.1 La dihydrorobinétine**

La variation en dihydrorobinétine contenue dans la matière sèche des 50 échantillons que nous avons analysés est très importante. (**Figure 12**) La moyenne de la teneur en dihydrorobinétine est de 27 mg par g de matière sèche.

Les résultats varient entre 44 mg/g de matière sèche pour le n°28 correspondant à l'échantillon 2 SAU 27-1 et 7 mg/g de matière sèche pour le n°41 correspondant à l'échantillon 1 CHA 31-1. Le coefficient de variation de la teneur en dihydrorobinétine est de l'ordre de 32%. Cela suggère que cette teneur contenue dans le bois de robinier est aléatoire d'un individu à l'autre. Ce paramètre est donc essentiel lors de l'élaboration des différents projets d'amélioration génétique pour cette espèce.

#### **3.2 La robinétine**

La variation en robinétine contenue dans la matière sèche des 50 échantillons que nous avons analysés est considérable. (**Figure 13**) La moyenne de la teneur en robinétine est de 4 mg par g de matière sèche.

Nous obtenons une valeur maximum de 16 mg/g de matière sèche pour le n°1 correspondant à l'échantillon 2 BOS 31-1, et une valeur minimum de 0 mg/g de matière sèche pour le n°50 qui correspond à l'échantillon 2 LOU 7-1. Le coefficient de variation est très important et de l'ordre de 99%. Cela signifie que la teneur en robinétine contenue dans le bois de robinier est très aléatoire d'un échantillon à l'autre dû à la provenance de l'individu et des conditions environnementales. Comme la dihydrorobinétine, ce paramètre est primordial lors de l'élaboration des différents projets d'amélioration génétique pour cette espèce.

## **IV. CONCLUSIONS**

### **1. Conclusion scientifique**

Le but de mon stage était d'analyser des échantillons de bois de robinier. Déterminer leur composition chimique était un facteur à prendre en compte dans le cadre des deux projets régionaux qui ont pour objectif de valoriser le bois de robinier et de lancer sa production en France en développant d'autres débouchés industriels.

Au cours de ce stage, j'ai dû prendre la suite des analyses sur un échantillonnage et mener à bien les analyses chimiques des constituants structuraux (la cellulose) et les analyses biochimiques des extraits phénoliques du bois de robinier, particulièrement les molécules importantes de ces extraits qui sont la robinétine et la dihydrorobinétine. Nous avons pu constater que la provenance des échantillons avait une importance capitale dans la structuration chimique du bois de robinier et donc dans le déterminisme de son utilisation ultérieure. En effet, les compositions en cellulose, en phénols totaux, en robinétine et en dihydrorobinétine sont plutôt variables selon la provenance des échantillons.

En ce qui concerne le projet *Carbonex*, le critère le plus important est la teneur en lignines et en cellulose chez les individus testés. Les individus possédant les meilleurs taux seront sélectionnés pour être multipliés et testés en plantation pour la production de charbon de bois. Pour le projet *ValRob*, le caractère recherché est la teneur en phénols totaux plus particulièrement de la robinétine et la dihydrorobinétine. Les échantillons ayant une teneur élevée présentent un intérêt dans le domaine de l'industrie cosmétique et de la phytopharmacie.

Durant mon stage, nous avons rencontré quelques problèmes pour ce qui concerne le dosage de la cellulose. Pour l'échantillon n°20 (2 RIG 14-3) nous obtenons un pourcentage en cellulose et hémicellulose faible, il aurait été donc envisageable de refaire le dosage. L'utilisation de l'HPLC n'a pas été facile à mettre en marche car nous avons acheté une nouvelle HPLC dont la programmation a été longue à faire.



## **2. Conclusion personnelle**

Le stage que j'ai réalisé au sein de l'INRA d'Orléans a été très instructif car il m'a permis de découvrir le domaine de la recherche, d'acquérir de nouvelles connaissances et techniques de laboratoire comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ainsi que les dosages de la cellulose.

J'ai été très bien accueillie au sein de l'unité AGPF où règne une ambiance conviviale. Dans cette unité, j'ai pu accéder à des appareils de haute technologie comme l'HPLC et acquérir des techniques de laboratoire appliquées au matériel végétal. J'ai également pu mettre en application des techniques vues en classe et ainsi consolider mes acquis.

Cette expérience m'a permis de découvrir un domaine différent de mon stage effectué en première année. Cette expérience dans le domaine de la recherche, m'a permis de suivre l'organisation et la mise en place d'un projet de recherche et d'acquérir un peu plus d'autonomie dans la réalisation des manipulations qui m'ont été confiées.

J'ai pu retirer un enrichissement personnel et professionnel de ce stage. En effet, j'ai eu le privilège d'être encadrée durant mes expérimentations tout en me laissant assez d'autonomie pour que je puisse faire des erreurs et apprendre de moi-même.

## LEXIQUE

**Phénotype** : Le phénotype est l'ensemble des caractères observables chez un individu.

**Robinier** : Le robinier (*Robinia pseudoacacia*) est une espèce de la famille des Fabacées venant d'Amérique du Nord

**Drageon** : C'est un rejet naissant sur racine.

**Robinétine et Dihydrorobinétine** : Ce sont des molécules présentes dans le bois de robinier.

**Lignine** : Les lignines sont situées dans la paroi cellulaire de la cellule. Elle confère une meilleure rigidité et un bon maintien aux cellules de bois. De plus, les lignines étant hydrophobes, elles permettent l'imperméabilité des cellules.

**Matière lignocellulosique** La lignocellulose est composée de lignines d'hémicellulose et de cellulose. La matière lignocellulosique est le constituant principal de la paroi cellulaire des plantes.

**Les composés phénoliques** : Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide.

**Surnagent** : Après avoir effectué une centrifugation, nous obtenons un surnagent qui correspond au liquide de la suspension.

**Aliquote** : Repartir un volume dans plusieurs tubes différents.

**Tungstène et Molybdène** : Le tungstène est un élément chimique de symbole W et le molybdène de symbole Mo. Ce sont des métaux de transition, reconnus pour leurs propriétés physiques.

**Alcalinisation** : Une alcalinisation c'est quand on ajoute une solution alcaline, c'est-à-dire basique au milieu.

**Matière sèche** : La matière sèche correspond à la poudre de bois préalablement pesée et séchée.

## **BIBLIOGRAPHIES ET SITOGRAPHIES :**

### **Bibliographies :**

- [1] Bernard Monties, A.M, J.C Roland, F. Barnoud, J.P Joseleau, M.T Tollier, C.Mercier, J.F Thibaut, M. Metche, G. de Lestang-Bremond et G.Janin. *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*. Gauthier-villars, Paris, 1980
- [2] F. Barnoud, *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés : la cellulose*. Gauthier-villars, Paris, 1980. p66
- [3] J.P Joseleau, *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés : les hémicelluloses*. Gauthier-villars, Paris, 1980. p87
- [4] B.Monties, *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés : les lignines*. Gauthier-villars, Paris, 1980. p122
- [5] J. J Macheix, Annie Fleuriet et Christian Jay-Allemand. *Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Collection Biologique. 2005. p135
- [6] Jean Collardet et Jean Besset. *Bois commerciaux, feuillus des zones tempérés. Tome II. Chapitre IV : Familles des légumineuses, Le Robinier*. H.Vial n°833 Octobre 1992

### **Sitographies :**

- Houllier François (dir) INRA-Centre du Val de Loire. En ligne < <http://www.val-de-loire.inra.fr/>>
- Pilate Gilles (dir) INRA Val de Loire- UR *Amélioration Génétique et Physiologie Forestières*. En ligne < <http://www6.val-de-loire.inra.fr/uragpf> >
- Roger Prat. « La cellulose » Biologie et multimédia. Juin 2002. En ligne <<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/cellulose.htm>>
- Arterrien « Les lignines-Produit du jour » *Société chimique de France*. En ligne <<http://www.societechimiquedefrance.fr/produit-du-jour/lignine.html>>

## **ANNEXES**

**Annexe I** : Listing des échantillons récoltés de 2011 et 2012.

**Annexe II** : Listing des échantillons récoltés de 2012 et 2013.

**Annexe III** : Courbe de calibration de la robinétine et dihydrorobinétine.

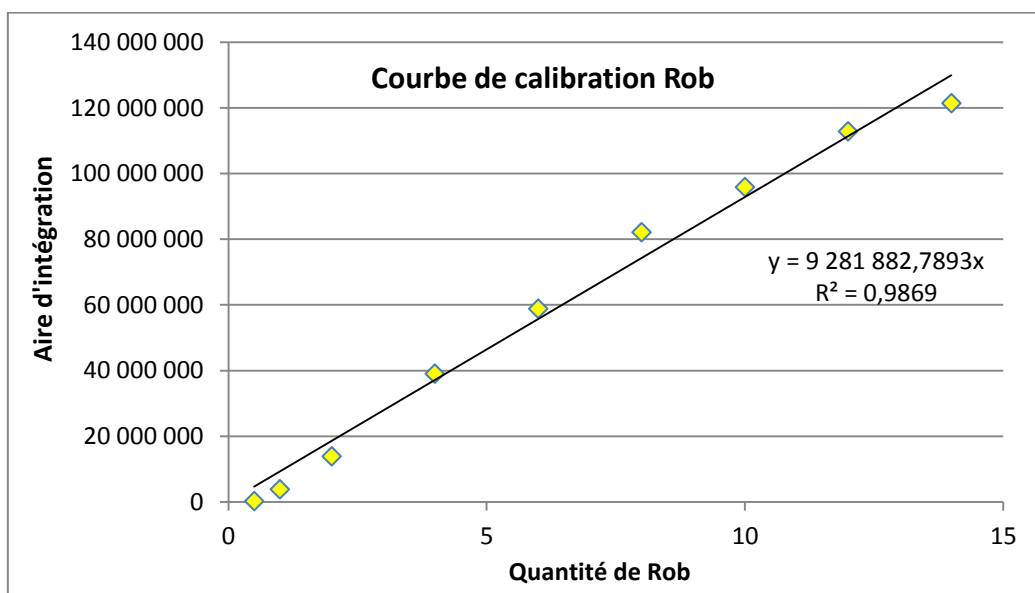
**Annexe IV** : Chromatogramme HPLC témoin des points de gamme de calibration 8 $\mu$ g et 12 $\mu$ g en robinétine et dihydrorobinétine dans 15 $\mu$ L.

Echantillons 2011-2012	Date de récolte	Région	Age	Densité (arbre/ha)
0 BAY 1-4	18/04/2011	Champagne-Ardenne		200
0 MUL 3-3	18/04/2011	Champagne-Ardenne		120
0 MUL 3-4	18/04/2011	Champagne-Ardenne		20
0 AUX 6-2	19/04/2011	Champagne-Ardenne		200
0 CRE 4-4	19/04/2011	Champagne-Ardenne		260
0 REN 8-1	20/04/2011	Bourgogne		200
0 TAL 9-1	20/04/2011	Bourgogne		480
0 MAX 11-1	21/04/2011	Bourgogne		520
1 DOR 4-2	17/02/2012			220
1 ROU 9-1	21/02/2012	Picardie	> = 50	280
2 MEL 10-1	21/02/2012	Franche-Comté	15	260
1 ROU 9-2	21/02/2012	Picardie		280
2 AUT 13-5	22/02/2012	Franche-Comté	60	180
1 CLE 17-2	27/02/2012			380
2 LEY 15-3	27/02/2012	Rhones-Alpes	20	480
2 JUJ 16-2	28/02/2012	Rhones-Alpes	40	240
1 COU 20-1	29/02/2012			240
2 BEL 19-2	29/02/2012	Rhones-Alpes	30	60
1 MON16-1	01/03/2012			340
1 VEI 18-1	01/03/2012			360
1 MON 16-1	01/03/2012			340
2 AUT 21-1	02/03/2012	Bourgogne	35-40	100
2 AUT 22-1	02/03/2012	Bourgogne	25-30	80
1 PLE 22-2	05/03/2012			280
2 HDC 24-1	05/03/2012	Lorraine-Alsace	30	400
2 HDC 24-2	05/03/2012	Lorraine-Alsace	40-45	220
1 SAI 25-1	06/03/2012			180
2 DIE 29-1	07/03/2012	Lorraine-Alsace	20	240
2 DIE 29-2	07/03/2012	Lorraine-Alsace	20	320
2 SAU 27-1	07/03/2012	Lorraine-Alsace	45-50	100
2 SAU 27-2	07/03/2012	Lorraine-Alsace	20	300
1 MAL 26-1	07/03/2012			440
1 CHA 31-1	08/03/2012	Normandie		280
1 VAU 33-1	08/03/2012	Normandie		360
2 BOS 31-1	08/03/2012	Lorraine-Alsace	40	360
2 ROU 34-1	09/03/2012	Lorraine-Alsace	35-40	280
2 VOE 35-2	09/03/2012	Lorraine-Alsace	35-40	400
2 TOR 37-4	12/03/2012	Franche-Comté	30	80
1 SER 35-2	13/03/2012	Poitou-Charente		380
1 SAI 40-2	15/03/2012	Poitou-Charente		480
1 SAI 41-1	15/03/2012	Poitou-Charente		520
2 BON 4-1	27/03/2012	Bourgogne	35	480
2 OUE 3-1	27/03/2012	Bourgogne	30	540
2 LOU 7-1	28/03/2012	Bourgogne	25	380
2 AUX 1-3	10/04/2012	Champagne-Ardenne	inconnu	340
2 AUX 1-5	10/04/2012	Champagne-Ardenne	inconnu	400
2 MON 2-2	10/04/2012	Champagne-Ardenne	inconnu	80
2 FRE 3-4	11/04/2012	Champagne-Ardenne	30	460
0 AUX 6-1	19/04/2012	Champagne-Ardenne		140

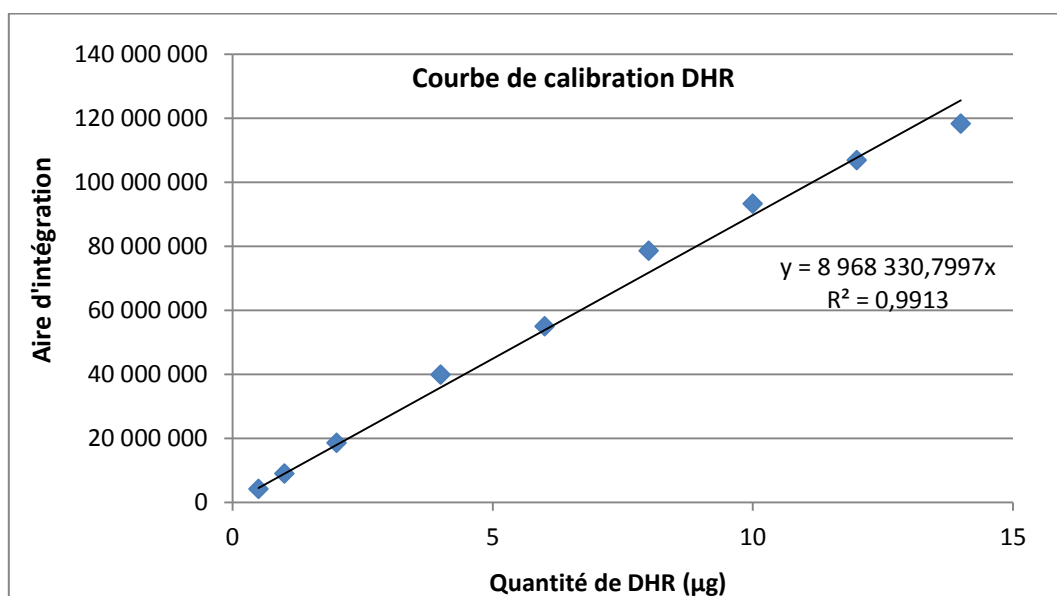
**Annexe I**: Liste des échantillons récoltés de 2011 et 2012

Echantillons 2012-2013	Date de récolte	Région	Age	Densité (arbre/ha)
2 AUT 13-3	22/02/2012	Franche-Comté	60	180
2 LIE 12-2	22/02/2012	Franche-Comté	45	180
2 LIE 12-4	22/02/2012	Franche-Comté	45	220
2 RIG 14-3	22/02/2012	Franche-Comté	40	300
2 RIG 14-4	22/02/2012	Franche-Comté	40	40
2 RIG 14-5	22/02/2012	Franche-Comté	40	260
2 BEL 18-2	29/02/2012	Rhone-Alpes	40	80
2 WES 32-1	08/03/2012	Lorraine-Alsace	40	240
4 VIL 4-2	22/02/2013	Aquitaine	30-35	620
4 TAR 18-1	27/03/2013	Aquitaine	25-30	500
4 FRA 23-1	04/04/2013	Midi-Pyrénées	20	740
4 ART 24-1	05/04/2013	Midi-Pyrénées	25-30	520
4 ART 24-3	05/04/2013	Midi-Pyrénées	25-30	420
4 SAI 25-1	08/04/2013	Midi-Pyrénées	35-40	680
4 SOU 26-1	09/04/2013	Midi-Pyrénées	35-40	640
4 TAR 27-1	10/04/2013	Aquitaine	20-25	420
4 LUC 29-1	11/04/2013	Aquitaine	25-30	320
4 LUC 28-2	11/04/2013	Aquitaine	45-50	240
4 SAI 30-2	15/04/2013	Midi-Pyrénées	30-35	900
3 PUY 11-1	17/04/2013	Auvergne	pourri au cœur	880
3 GER 10-1	17/04/2013	Auvergne	30	1120
3 MON 12-2	18/04/2013	Auvergne	45-50	520
3 MON 12-1	18/04/2013	Auvergne	40-45	440
3 MON 13-1	18/04/2013	Auvergne	30-35	560
3 DOR 15-1	19/04/2013	Auvergne	20-25	1100
3 YZE 17-2	22/04/2013	Auvergne	20	880
3 DOM 21-1	24/04/2013	Auvergne	30-35	660
3 ESP 25-1	26/04/2013	Auvergne	30-35	520
4 SAI 11-1	29/04/2013	Aquitaine	25-30	720
4 LIS 14-1	29/04/2013	Aquitaine	20-25	440
4 CUZ 32-1	15/05/2013	Aquitaine	pourri au cœur	540
4 VIL 8-1	21/05/2013	Aquitaine	inconnu	340
4 PRE 7-1	21/05/2013	Aquitaine	40-45	500
4 CAS 6-1	22/05/2013	Aquitaine	25-30	560
4 VIL 4-1	22/05/2013	Aquitaine	30-35	800
0 ILL 12-2	24/05/2013	Aquitaine	20-25	760
0 ILL 13-1	24/05/2013	Aquitaine	20-25	520
0 BUD 14-4	28/05/2013	Aquitaine	30-35	560

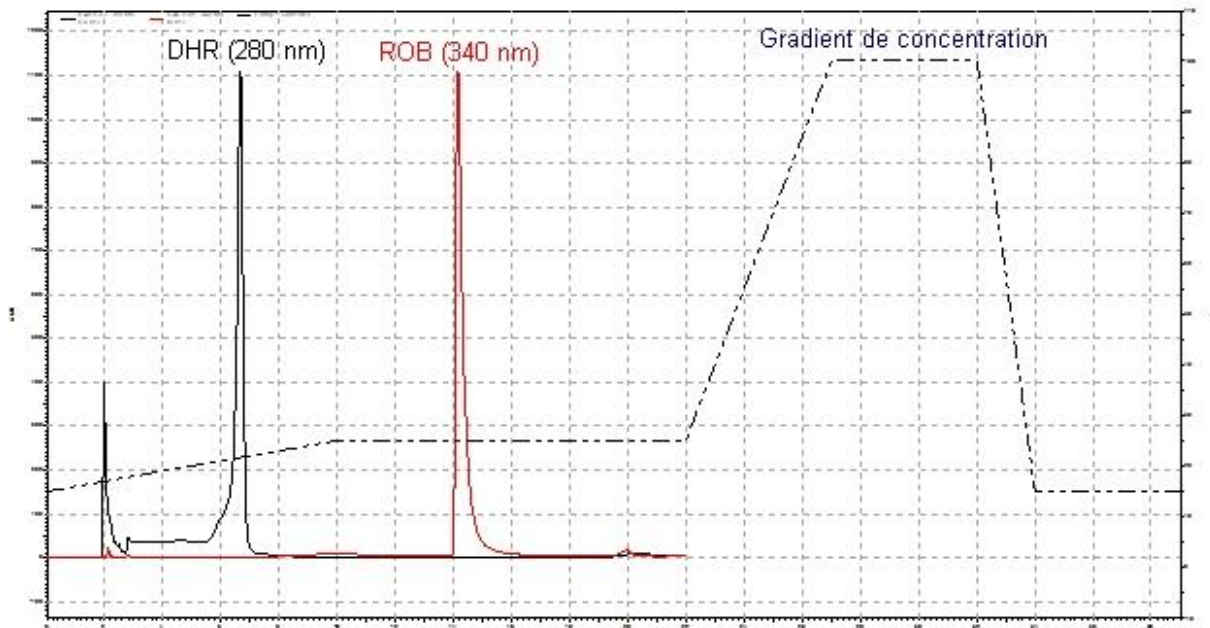
**Annexe II** : Liste des échantillons de 2012 et 2013



Annexe III : Courbe de calibration de la robinétine.



Annexe III : Courbe de calibration de la dihydrorobinétine



**Annexe IV** : Chromatogramme HPLC témoin des points de gamme de calibration 8 $\mu$ g et 12 $\mu$ g en robinétine et dihydrorobinétine dans 15 $\mu$ L.



## **Lay Audience Summary**

I carried out my training session at INRA (National Institute for Agronomic Research) in AGPF department (Improvement, Genetics and Physiology Forest) and GenoBois platform. My tutor was Jean-Paul CHARPENTIER, research engineer in charge of the GénoBois platform.

The AGPF unit is an INRA laboratory which aims to obtain a better understanding of the development of the phenotype of the tree. It also aims to promote forest genetic resources in maintaining the competitiveness of production systems while sustainably managing forest.

My work during my training session was to analyze the various components of wood using different methods. I first had to determine the amount of different chemical constituents that make the cell wall of wood: cellulose and hemicelluloses. I also had to conduct assays of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method. Finally, I performed the HPLC method (High Performance Liquid Chromatography) analysis of the two major molecules present in Robinia wood: robinetin and dihydrorobinetin. Cellulose and hemicellulose analyses used for the production of wood and analyses of robinetin and dihydrorobinetin molecules are for cosmetic purposes.

During my internship, I learnt a lot about life in a research laboratory. In fact working in a laboratory involves autonomy, responsibility, attention, seriousness that are important for studies and for life in general. This allowed me to practice different methods. I had studied before and learn new