

**VICTOR-PREVOT Marine**

Département Génie Biologique

Licence Professionnelle Santé mention

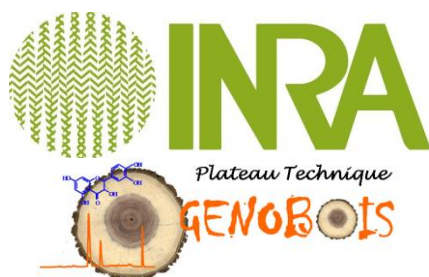
« Biologie Analytique et Expérimentale »

Du 05 Septembre 2011 au 31 Août 2012

Maître de stage : M. Jean-Paul CHARPENTIER



# Identification et caractérisation de marqueurs biochimiques (sucres solubles) et moléculaires (gène PopFla8) du bois de peuplier hybride



Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestières  
Centre INRA d'Orléans - 2163 avenue de la Pomme de Pin  
CS 40001 - Ardon - 45075 ORLEANS CEDEX 2

CFAIURC – 29 Rue du pont volant  
37082 TOURS CEDEX 2



**VICTOR-PREVOT Marine**

Département Génie Biologique

Licence Professionnelle Santé mention

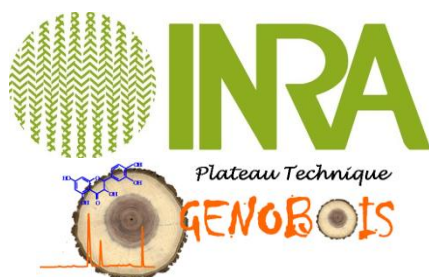
« Biologie Analytique et Expérimentale »

Du 05 Septembre 2011 au 31 Août 2012

Maître de stage : M. Jean-Paul CHARPENTIER



# Identification et caractérisation de marqueurs biochimiques (sucres solubles) et moléculaires (gène PopFla8) du bois de peuplier hybride



Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestières  
Centre INRA d'Orléans - 2163 avenue de la Pomme de Pin  
CS 40001 - Ardon - 45075 ORLEANS CEDEX 2

CFAIURC – 29 Rue du pont volant  
37082 TOURS CEDEX 2



# SOMMAIRE

<b>1. INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
1.1 L’Institut National de la Recherche Agronomique.....	1
1.1.1 Le centre INRA d’Orléans.....	1
1.2 L’Unité de Recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF) .....	2
1.3 Le plateau technique GénoBois.....	2
<b>2. INTRODUCTION SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>3</b>
2.1 Le projet PLANT-KBBE: TREE FOR JOULES .....	3
2.2 Le peuplier : une espèce idéale pour la production de bioénergie.....	3
2.2.1 Description générale.....	3
2.2.2 Les hybrides de peuplier et types de populiculture .....	4
2.2.3 Structure du bois de peuplier .....	5
2.2.4 Les couches de la paroi cellulaire.....	6
2.2.5 Bois de tension et bois opposé.....	7
2.2.6 Production de bioéthanol à partir du bois.....	8
2.3 Présentation du sujet d’étude et objectifs .....	9
<b>3. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>10</b>
3.1 Analyses biochimiques.....	10
3.1.1 Matériel végétal.....	10
3.1.2 Extraction des sucres solubles à partir du bois de peuplier .....	10
3.1.3 Dosage des sucres solubles.....	10
3.1.4 Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR).....	12
3.2 Analyses moléculaires.....	13
3.2.1 Matériel végétal.....	13
3.2.2 Extraction d’ARNs .....	14
3.2.3 RT-PCR semi-quantitative .....	15
3.2.4 PCR quantitative.....	16



<b>4. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>17</b>
4.1 Variation des sucres solubles dans le bois de peuplier hybride.....	17
4.2 Corrélation des données chimiques avec les spectres infrarouges .....	18
4.3 Comparaison de l'expression du gène PopFla8 entre le bois de tension et le bois opposé ..	19
4.3.1 Caractérisation de l'expression du gène par RT-PCR semi quantitative.....	19
4.3.2 Analyse quantitative du gène par qPCR.....	21
<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>23</b>
5.1 Conclusion scientifique .....	23
5.2 Conclusion personnelle .....	23
<b>6. ANNEXES.....</b>	<b>25</b>
6.1 Composition des réactifs utilisés pour le dosage des sucres solubles .....	25
6.2 Détermination de la concentration en sucres solubles.....	26
6.3 Composition du tampon d'extraction des ARNs.....	26
6.4 Composition du mix RT-PCR .....	27
6.5 Composition du mix qPCR.....	27





## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Gilles PILATE, Directeur d'unité, pour m'avoir accueillie au sein de son établissement.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Monsieur Jean-Paul CHARPENTIER, ingénieur de recherche et responsable de stage pour ses conseils pertinents et sa confiance mais aussi pour le temps qu'il m'a consacré tout au long de mon année de formation, sans oublier sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie également Madame Marie-Claude LESAGE-DESCAUSES, assistante ingénieur, et Madame Nathalie BOIZOT, technicienne de recherche, mais également tuteurs relais en biologie moléculaire et biochimie, d'avoir répondu à mes différentes interrogations et pour l'aide qu'elles m'ont apportée tout au long de mon apprentissage.

Enfin, je voudrais remercier l'ensemble de l'unité d'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières pour son accueil sympathique et sa coopération professionnelle durant cette année de formation et plus particulièrement Monsieur Kévin ADER, Technicien du laboratoire de biochimie.



## ABREVIATIONS

A : Absorbance

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AGPF : Amélioration Génétique et Physiologie Forestières

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

BET : Bromure d'éthidium

CTAB : *Cetyltrimethylammonium Bromide* → bromure de cetyltriméthylammonium

DTT : Dithiothréitol

EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid* → Acide éthylène diamine tétra acétique

G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

Ha : Hectare

HK : Hexokinase

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Pb : Paire de bases

PCR : *Polymerase Chain Reaction* → Réaction en chaîne par polymérase

PGI : Phosphoglucose isomérase

PLS : *Partial Least Square* → algorithme des « moindres carrés partiels »

qPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction* → PCR quantitative

RT-PCR : *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* → PCR sur ARNm

SPIR : Spectrométrie proche infrarouge

TBE : Tris, Borate, EDTA

Tm : *Melting temperature* → Température d'hybridation des amorces

UMR : Unité Mixte de Recherche

UR : Unité de Recherche



# 1. INTRODUCTION GENERALE

## 1.1 L'Institut National de la Recherche Agronomique

L'Institut national de la recherche agronomique, plus connu sous le sigle INRA, a été fondé en 1946 pour répondre à une demande sociale pressante : « nourrir la France ». Classé comme Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST), il est placé sous la double tutelle du ministère chargé de la Recherche et du ministère chargé de l'Agriculture.

Premier institut de recherche agronomique en Europe et deuxième dans le monde en nombre de publications en sciences agricoles et en sciences de la plante et de l'animal, l'INRA mène des recherches finalisées pour une alimentation saine et de qualité, pour une agriculture durable et compétitive, et pour un environnement préservé et valorisé.

L'INRA, en France, comporte 14 départements scientifiques qui s'inscrivent dans 21 centres et 381 unités dont 218 unités de recherche (UR), 52 unités expérimentales (UE), 75 unités d'appui à la recherche et 11 unités de service.

### 1.1.1 Le centre INRA d'Orléans

Le centre d'Orléans, créé en 1976, comprend trois unités de recherche, une unité de service, une unité expérimentale et une unité administrative implantées à Ardon et un domaine d'expérimentation animale près de Bourges. L'INRA d'Orléans regroupe sept unités sous l'égide de trois départements de recherche :

- ✚ Les unités de recherche **A**mélioration **G**énétique et **P**hysiologie **F**orestières (UR AGPF) et **Z**oologie **F**orestière (UR ZF) et l'unité expérimentale **G**énétique et **B**iomasse **F**orestières (UE GBFor) qui dépendent du département EFPA (**E**cologie des **F**orêts, **P**rairies et milieux **A**quatiques).
- ✚ L'unité de recherche Science du sol et l'unité de service Infosol qui dépendent du département EA (**E**nvironnement et **A**gronomie).
- ✚ L'unité expérimentale de Bourges qui dépend du département GA (**G**énétique **A**nimale).

Les effectifs du Centre d'Orléans sont de 200 personnes environ (agents titulaires). Il accueille en outre chaque année 50 non-titulaires parmi lesquels un nombre important d'étudiants. Le site de l'INRA est basé sur 63 ha (hectare) dont 35 ha de pépinières, et compte près de 8500 m<sup>2</sup> de bureaux et laboratoires.



## **1.2 L'Unité de Recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF)**

L'unité de recherche AGPF s'intègre dans le département de l'EFPA. Cette unité conduit des programmes d'amélioration génétique sur six espèces d'arbres forestiers : le frêne, le merisier, le sapin de douglas, le mélèze, le pin sylvestre et le peuplier.

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. Pour cela, elle s'appuie sur les techniques de génétique quantitative, de biochimie, de biologie cellulaire et moléculaire. 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.

Afin de remplir ces objectifs, une approche de biologie intégrative est développée principalement sur le modèle peuplier pour mieux comprendre le déterminisme génétique des caractères complexes d'intérêt participant au développement de l'arbre (phénologie, croissance, propriétés du bois), à son adaptation aux contraintes environnementales (résistance aux agents pathogènes, efficacité d'utilisation de l'eau), concourant ainsi à la construction du phénotype. Elle accueille et collabore avec le « Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers » qui est une unité sous contrat (USC) entre l'Office National des Forêts (ONF) et l'INRA. Elle participe à l'effort de recherche en génétique des populations des arbres forestiers et en biologie de la conservation.

## **1.3 Le plateau technique GénoBois**

Les analyses sur le bois sont menées par le plateau technique GénoBois. Ce plateau est composé de quatre entités de travail sur deux sites géographiques : le laboratoire d'analyses biochimiques (UR AGPF INRA Orléans), l'atelier bois (UE GBFor INRA Orléans), le laboratoire d'histologie (UR AGPF INRA Orléans) et l'atelier qualité du bois (UMR BIOGECO INRA Bordeaux) et est placé sous la responsabilité de Monsieur Jean-Paul CHARPENTIER.

GénoBois réalise en routine des mesures des propriétés physico-chimiques du bois, sur arbre en place ou sur échantillon, afin de réaliser le phénotypage en masse (haut-débit) des propriétés de base du bois pour l'étude de leur variation génétique.





## 2. INTRODUCTION SCIENTIFIQUE

### 2.1 Le projet PLANT-KBBE: TREE FOR JOULES

TREE FOR JOULES est un projet européen PLANT-KBBE qui a été sélectionné en 2010 par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) et est coordonné par Madame Jacqueline GRIMA PETTENATTI, directrice de recherche au CNRS de Toulouse (UMR 5546). L'objectif de TREE FOR JOULES est de chercher à améliorer les propriétés du bois d'eucalyptus et de peuplier pour la bioénergie, c'est-à-dire développer l'utilisation du bois de ces arbres forestiers comme source de matière lignocellulosique pour la production de biocarburant en développant des outils permettant de sélectionner des arbres offrant un rendement optimisé de conversion de biomasse en bioéthanol et biodiesel.

Ce projet est traité, entre autres, au Centre INRA d'Orléans et plus particulièrement au sein de l'unité de recherche AGPF et est coordonné, pour la partie peuplier, par Monsieur Jean-Charles LEPLÉ. Les études sont menées essentiellement sur le peuplier dans un but d'acquérir un grand nombre de données de phénotypages moléculaires et biochimiques pour une sélection ultérieure de génotypes de peupliers les plus intéressants. C'est dans ce contexte que se situent les travaux auxquels j'ai participé.

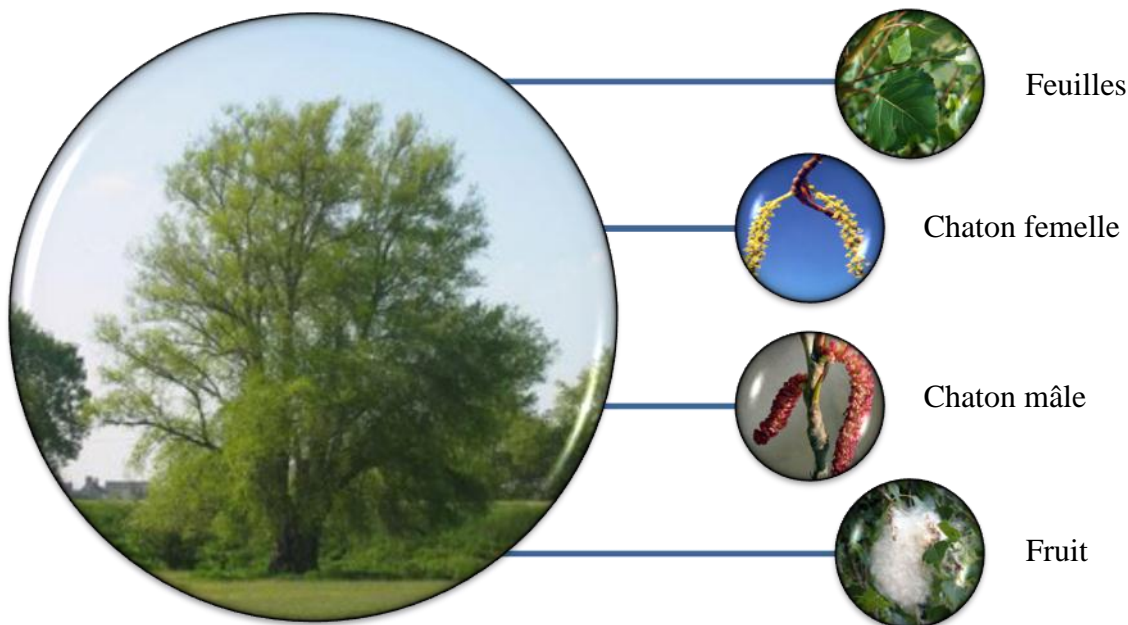
### 2.2 Le peuplier : une espèce idéale pour la production de bioénergie

#### 2.2.1 Description générale

Le peuplier, du latin *populus* (peuple) fait partie de la famille des Salicacées. Le genre est divisé en six sections (espèces ayant des caractéristiques morphologiques et écologiques proches) et en 35 espèces. Le peuplier est un arbre de grande dimension (de 25 à 30 mètres) à croissance très rapide, mais de longévité réduite (70 à 80 ans). Il a une nette préférence pour les sols frais, profonds et bien drainés. Les terrains humides voire temporairement inondés sont propices à sa croissance (Berthelot et *al.* 2004).

Caduques, alternes et simples, les feuilles des peupliers sont généralement grandes et à longs pétioles. Cette espèce est dioïque (les individus sont soit mâles, soit femelles). Les fleurs sont réunies en chatons pendants, qui apparaissent avant les feuilles. Les fleurs mâles présentent des chatons de couleur pourpre, de 8 à 10 cm de long à maturité. Quant aux fleurs femelles, les chatons sont de couleur vert-jaune, de 6 à 8 cm de long à maturité. Les fruits sont des capsules arrondies laissant échapper à maturité des petites graines couvertes de poils blancs à l'aspect cotonneux (**Figure 1**).





**Figure 1 :** Peuplier noir (*Populus nigra*), ses feuilles, les chatons mâles et femelles et ses fruits (peupliernoir.orleans.inra.fr).

### 2.2.2 Les hybrides de peuplier et types de popucultures

En génétique, l'hybridation est le croisement de deux individus de deux variétés : entre sous-espèces (croisement intraspécifique), entre espèces (croisement interspécifique) ou entre genres (croisement intergénérique) différents. L'hybride présente un mélange des caractéristiques génétiques des deux parents. L'hybridation est toutefois différente de la manipulation génétique dans la mesure où l'hybridation, même si elle est peut être provoquée par l'homme, peut aussi se produire naturellement. Les plantations de peupliers hybrides se distinguent des plantations traditionnelles par leur croissance très rapide et leur forte productivité sur de courtes rotations. Il existe des taillis à courte rotation (TCR) dont le bois est récolté tous les 6 à 8 ans ou des taillis à très courte rotation (TTCR) dont le bois est récolté sur des cycles de 2 à 3 ans (**Figure 2**). Ces types de culture sont particulièrement adaptés à la production de biomasse pour des fins énergétiques.



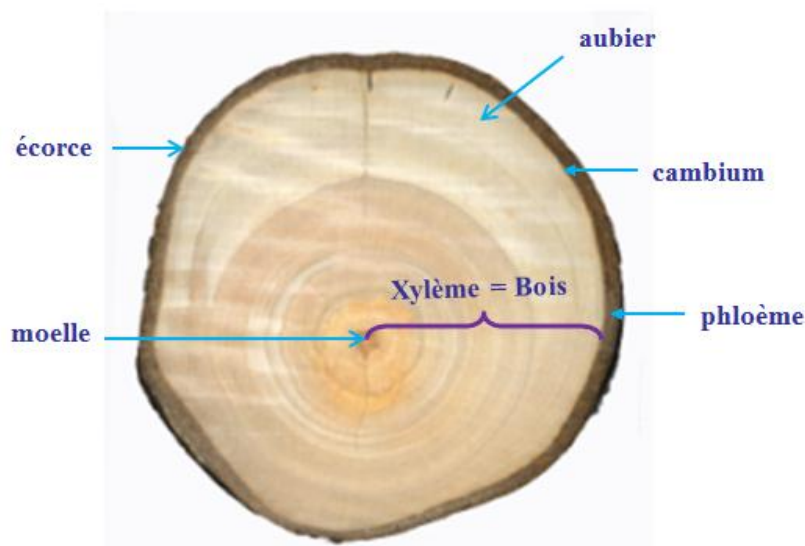
**Figure 2 :** Popuculture classique (A), taillis en courte rotation (B) et taillis en très courte rotation (C) (INRA Orléans)



### 2.2.3 Structure du bois de peuplier

La structure du bois, ou xylème est complexe (J-C.Lepilé et *al.* 2004). Sur une coupe transversale de bois (**Figure 3**), on distingue une partie centrale appelée moelle qui est formée d'un tissu léger et peu résistant, une partie périphérique plus claire, l'aubier qui assure la conduction de la sève brute, et enfin l'écorce. La coupe transversale fait également apparaître des rayons ligneux et des anneaux concentriques, les cernes.

La croissance du bois s'effectue au niveau d'une couche de cellules méristématiques appelée le cambium. En se divisant, ces cellules engendrent le bois vers l'intérieur et le liber (tissu secondaire du phloème) vers l'extérieur. Les vaisseaux du bois, ou xylème secondaire, conduisent la sève brute des racines vers les feuilles, ceux du liber assurent le transit de la sève élaborée.



**Figure 3** : Section transversale d'un tronc de peuplier (INRA Orléans)

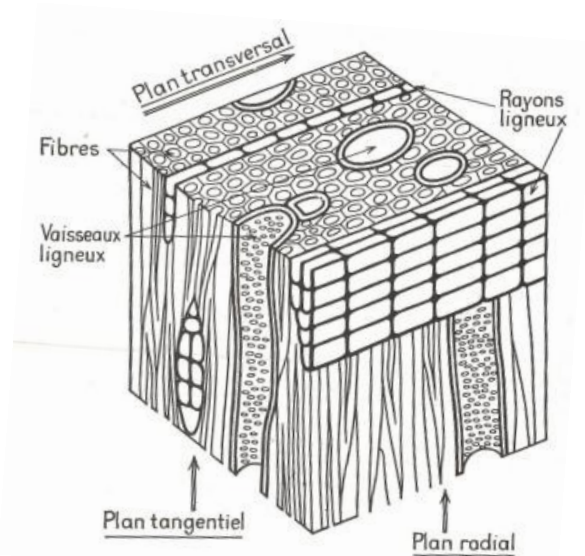
Le bois est composé de différents types de tissus: tissu vasculaire, fibres, parenchymes de réserve (**Figure 4**).

Les fibres sont des faisceaux de cellules résistantes, disposées dans le sens axial, qui assurent la rigidité et la résistance mécanique du bois. Il s'agit d'un bio-composite constitué de cellulose, d'hémicellulose et de lignine.

Les tissus vasculaires sont formés de vaisseaux ligneux, cellules creuses qui servent à conduire la sève brute depuis les racines jusqu'aux feuilles. Sur une coupe transversale, ils sont perpendiculaires à l'axe du tronc.



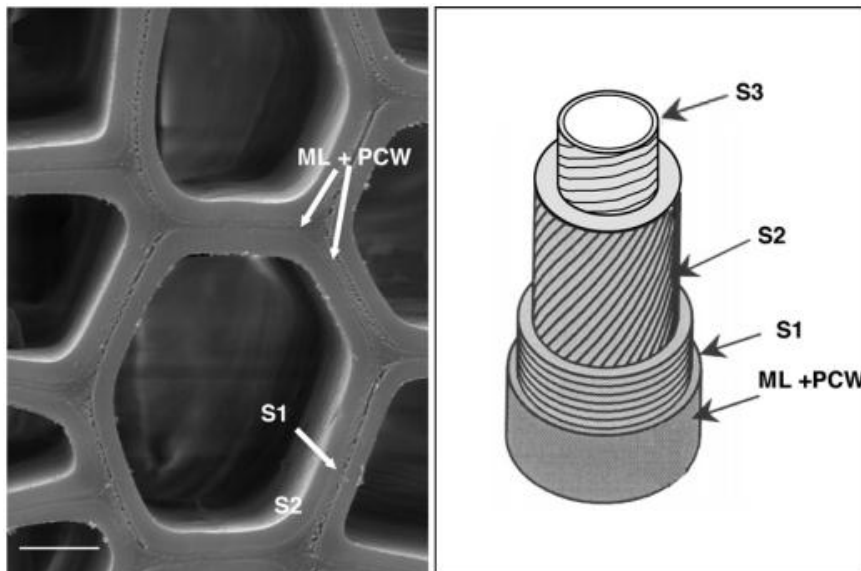
Les rayons ligneux sont des cellules de réserve (parenchymes) à parois épaissies et lignifiées, qui accompagnent le tissu vasculaire. Ces cellules participent en outre à la fonction de soutien.



**Figure 4 :** Bloc diagramme présentant la structure du bois (Camefort, 1984)

#### 2.2.4 Les couches de la paroi cellulaire

A l'intersection entre deux cellules ligneuses, on trouve la lamelle mitoyenne (LM), puis la paroi primaire et enfin la paroi secondaire. Généralement, la paroi cellulaire secondaire se compose de trois couches : S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> (**Figure 5**).



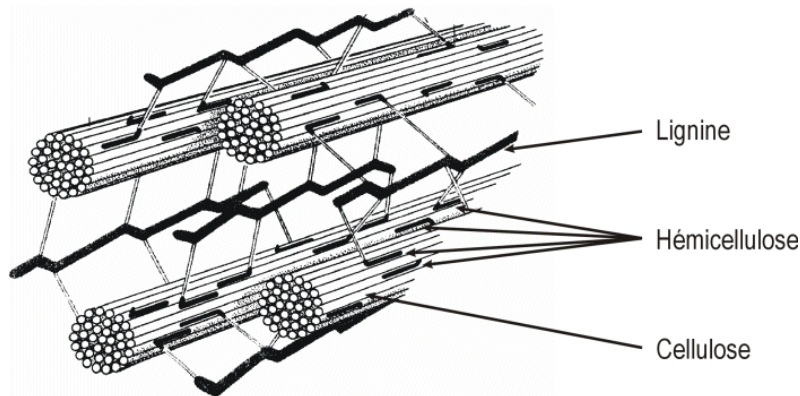
**Figure 5 :** Structure de la paroi cellulaire secondaire en microscopie électronique à balayage et structure schématique (d'après Déjardin et al. 2010)

ML: *Middle Lamella* → lamelle mitoyenne; PCW: *primary cell wall* → paroi primaire





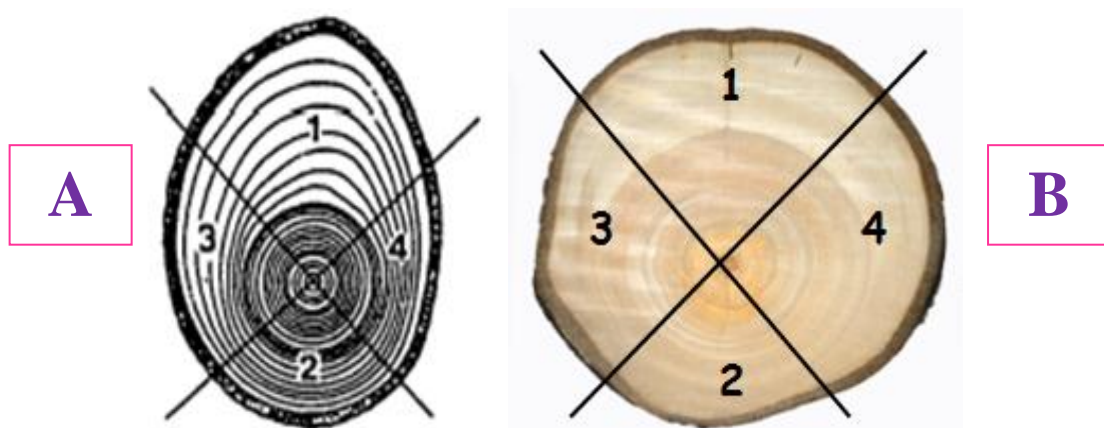
La paroi secondaire présente une structure en couches déposées successivement dans lesquelles les microfibrilles de cellulose s'orientent en structures parallèles. Entre ces microfibrilles, des hémicelluloses et des lignines se déposent à la manière de substances incrustantes (**Figure 6**). Ces trois polymères organiques forment la biomasse lignocellulosique.



**Figure 6 :** Représentation schématique de l'assemblage des composants de la paroi cellulaire dans le xylème secondaire (d'après Shleser, 1994)

### 2.2.5 Bois de tension et bois opposé

Dans les tiges ligneuses d'angiospermes répondant à des contraintes mécaniques imposées par exemple par l'inclinaison de la tige, du bois de tension avec une structure de la paroi végétale très particulière se forme au-dessus de la partie affectée tandis que du bois opposé se forme en dessous (**Figure 7**). La formation du bois de tension provoque une excentration de la moelle car le bois se développe majoritairement à l'opposé du stress mécanique (Plomion et *al.*, 2001).

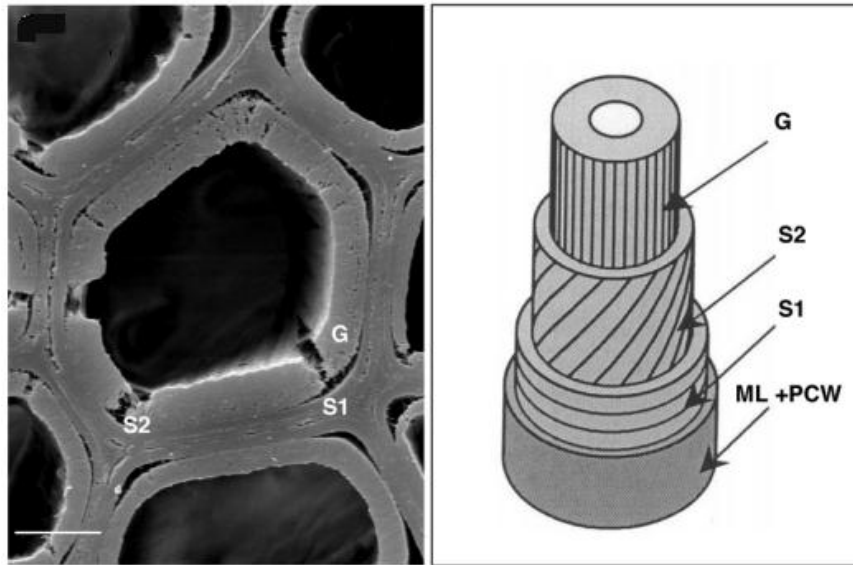


**Figure 7 :** (A) Distribution du bois de tension dans une section de tige inclinée (d'après Jourez, 1997)  
 (B) Coupe transversale bois de peuplier incliné (INRA Orléans)  
 (1) Bois de tension – (2) Bois opposé – (3 ; 4) Bois normal

Le bois de tension possède des caractéristiques particulières différentes du bois normal. En effet, dans les fibres de bois de tension, une couche gélatineuse ou couche G constituée



essentiellement de cellulose vient s'ajouter ou remplacer la couche S<sub>3</sub> et partiellement ou totalement la couche S<sub>2</sub> (**Figure 8**).



**Figure 8** : Mise en évidence de la couche G dans la paroi cellulaire secondaire en microscopie électronique à balayage et structure schématique (d'après Déjardin *et al.* 2010)  
ML: *Middle Lamella* → lamelle mitoyenne; PCW: *primary cell wall* → paroi primaire

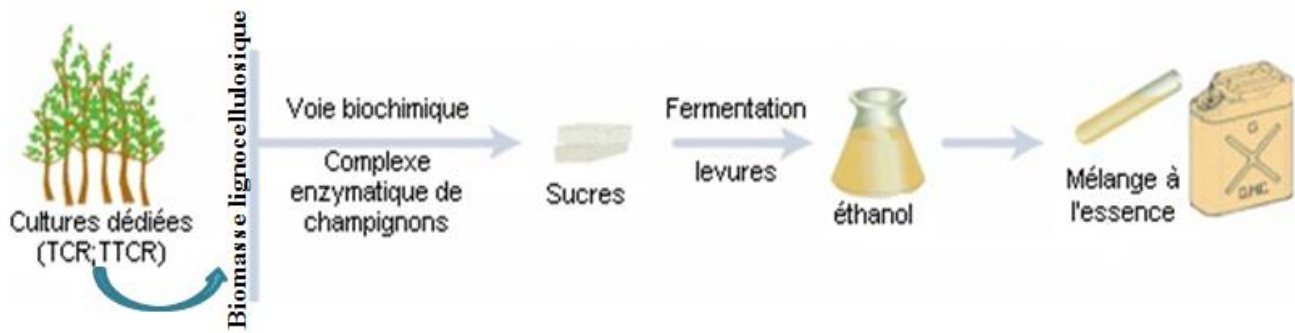
### 2.2.6 Production de bioéthanol à partir du bois

Les biocarburants de seconde génération issus de biomasses lignocellulosiques renouvelables telle que le bois offrent une alternative intéressante aux sources conventionnelles en énergie pour réduire la consommation de combustibles fossiles. L'utilisation de la biomasse des arbres pour produire des biocarburants nécessite peu d'énergie et d'intrants pour leur culture. Les arbres peuvent être plantés sur des terres trop pauvres pour l'agriculture, évitant ainsi une compétition pour l'espace agricole entre cultures alimentaires et cultures énergétiques. Le peuplier est particulièrement bien adapté pour ce type de production.

La production de bioéthanol se décompose en plusieurs étapes (**Figure 9**) : un prétraitement acide du bois ouvre les structures de la paroi lignocellulosique et casse les interactions entre lignines et polysaccharides (cellulose + hémicellulose) ; ce prétraitement facilite l'action des enzymes hydrolytiques qui découpent les polysaccharides de cellulose de la paroi en sucres simples ; enfin, ces sucres simples sont soumis à une fermentation qui mène à la production de bioéthanol.

Pour évaluer la capacité des arbres à produire du bioéthanol, on peut étudier leur profil polysaccharidique c'est-à-dire les teneurs en cellulose et sucres solubles présents dans le bois, sources de sucres fermentescibles.





**Figure 9 :** Procédé de fabrication du bioéthanol à partir de la matière lignocellulosique (d'après projet-futurol.com)

### 2.3 Présentation du sujet d'étude et objectifs

Je suis intervenue sur des actions menées dans le cadre du projet *Tree For Joules* qui vise notamment à identifier, dans une population de plusieurs centaines d'individus, des peupliers présentant un profil polysaccharidique intéressant pour la production de bioéthanol, c'est-à-dire à forte teneur en cellulose et sucres solubles.

Pour cela, j'ai réalisé des expérimentations à la fois dans les domaines de la biochimie et de la biologie moléculaire :

- J'ai mis au point un protocole de dosage enzymatique des sucres solubles et je l'ai appliqué sur un sous-échantillonnage de 48 individus. Pour cela, j'ai mis en œuvre l'extraction et la purification des sucres solubles, des réactions enzymatiques et des dosages spectrophotométriques. Ces dosages chimiques viennent en appui d'analyses SPIR déjà effectuées au laboratoire. Le but est d'établir un modèle de calibration permettant d'estimer, de façon indirecte grâce à la SPIR, la concentration en sucres solubles sur le reste de la population.
- Je me suis formée à la caractérisation moléculaire de peupliers produisant artificiellement du bois de tension. Des études d'expression réalisées par mon équipe d'accueil ont montré que dans ce bois particulier, des gènes sont surexprimés, notamment ceux codant pour des protéines de type arabinogalactane (Lafarguette et *al.*, 2004). J'ai réalisé des extractions d'ARN sur des échantillons de xylème et de phloème, une RT-PCR afin de mettre en évidence l'accumulation d'ARNm et enfin une PCR quantitative (qPCR) afin de quantifier l'expression du gène PopFla8 spécifique du bois de tension.



### 3. MATERIELS ET METHODES

#### 3.1 Analyses biochimiques

##### 3.1.1 Matériel végétal

J'ai analysé 48 échantillons de la Famille 54 choisis parmi 1460 selon leur teneur en cellulose (représentatifs de la gamme de variation). C'est une population de peupliers hybrides issus d'un croisement inter-spécifique entre un peuplier femelle de l'espèce *P. deltoides* et un peuplier mâle de l'espèce *P. trichocarpa*, originaires d'Amérique du nord. Ces échantillons sont des sections de tige qui ont ensuite été broyées à 200 µm à l'atelier Qualité du Bois de Bordeaux (appartenant à GénoBois). Avant l'extraction des sucres, ils ont été broyés plus finement à l'aide du *Mixer Mill MM300* (*Restch, Haan, Allemagne*) jusqu'à l'obtention d'une poudre de granulométrie inférieure à 50µm.

##### 3.1.2 Extraction des sucres solubles à partir du bois de peuplier

Chaque échantillon a subi trois extractions éthanoliques à chaud successives. Pour cela, 1 mL d'éthanol à 80% est ajouté à 100 mg de poudre de bois. Le tube est ensuite placé dans le Thermomixer® (*Eppendorf, Courtabœuf, France*) à 90°C sous agitation durant 30 minutes avant d'être centrifugé 10 minutes à 17 000 g. Le surnageant est récupéré et appliqué sur une colonne de Charbon actif/Polyvinylpyrrolidone pour éliminer les polyphénols extraits en même temps que les sucres. Deux extractions supplémentaires sont réalisées en incubant les échantillons 15 minutes au Thermomixer®.

L'ensemble des filtrats est évaporé pendant 16 heures grâce à un évaporateur sous vide (*Speed Vac Concentrator ; Savant, ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, Massachusetts, USA*) puis repris par 1 mL d'eau ultra pure pour le dosage des sucres solubles.

##### 3.1.3 Dosage des sucres solubles

Le dosage du glucose, du fructose et du saccharose (**Figure 10**) est réalisé par voie enzymatique et passe par leur conversion en glucose élémentaire. L'oxydation du glucose en gluconate est ensuite couplée à la réduction du  $\text{NADP}^+$  en NADPH.

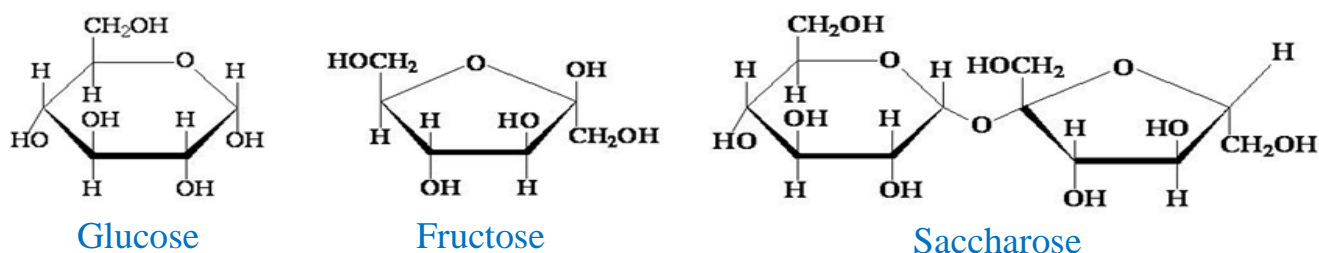
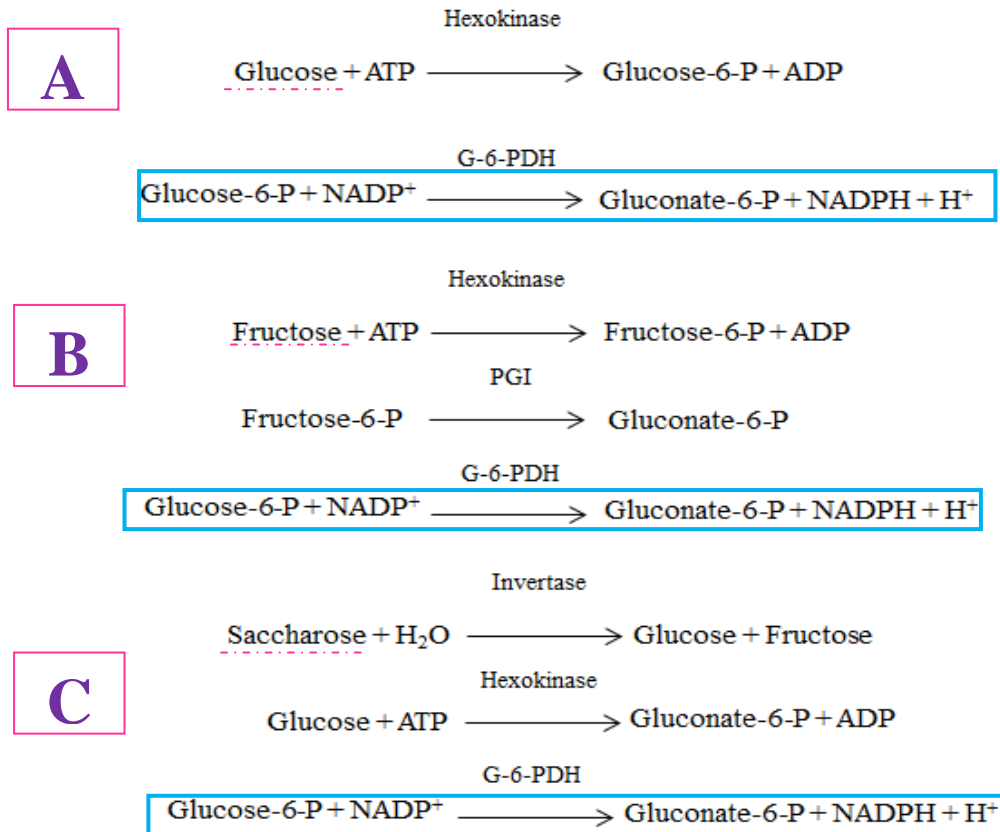


Figure 10 : Représentation spatiale des molécules de glucose, de fructose et de saccharose.





La quantité de NADPH formée est proportionnelle à la concentration du glucose de l'échantillon et peut être mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm. Le dosage est effectué en double pour chaque échantillon (extraits également en double) et des sucres témoins sont également dosés à des concentrations connues (0,1 et 0,4 g/L). L'absorbance est mesurée contre un blanc réactif contenant de l'eau ultra-pure. Les réactions enzymatiques sont présentées **figure 11**.



**Figure 11** : Equations de réaction de la conversion du glucose (A), du fructose (B) et du saccharose (C) en glucose élémentaire.

Pour doser le glucose et le fructose, 50 µL de chaque échantillon est distribué dans une cuve spectrométrique puis 770 µL de tampon réactionnel (**Annexe 6.1**) est ajouté.

L'absorbance est ensuite mesurée à 340 nm (A1). Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à 30°C avec 10 µL HK-G6PDH et l'absorbance est mesurée de nouveau (A2). Enfin, 10 µL de PGI sont ajoutés aux cuves et incubés 15 minutes à 30°C. L'absorbance est mesurée une dernière fois (A3). Pour doser le saccharose, une étape est nécessaire afin de le convertir en glucose élémentaire. Pour cela, 20 µL d'invertase sont ajoutés aux échantillons et incubés 30 minutes à 30°C avant l'ajout de 750 µL de tampon réactionnel. L'absorbance est mesurée à 340 nm (A1). Enfin, les échantillons sont incubés 15 minutes à 30°C avec 10 µL de HK-G6PDH et l'absorbance est mesurée de nouveau (A2).



Pour chaque sucre, on calcule une différence d'absorbance ( $\Delta A$ ) après l'action de chaque enzyme. On peut ainsi obtenir la concentration en mg/g de matière sèche (Annexe 6.2)

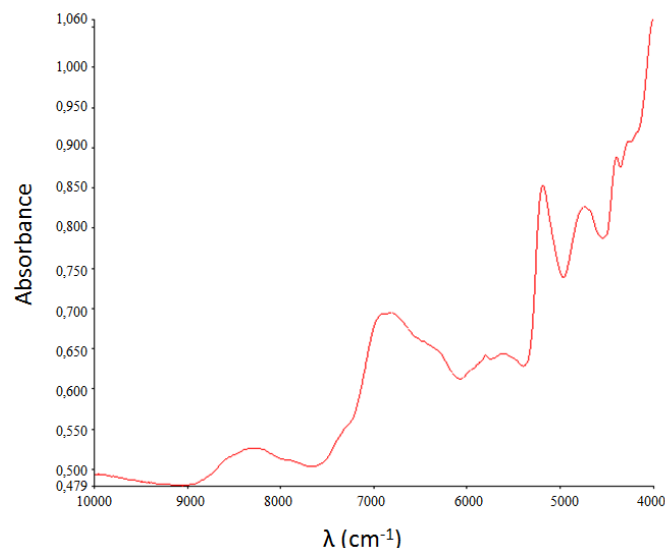
### 3.1.4 Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR)

La spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR) est une technique analytique basée sur le principe d'absorption des rayonnements (infrarouges) par la matière organique. Cette absorption étant liée à la composition chimique des échantillons, on peut estimer cette dernière par la simple mesure de l'absorption de lumière par l'échantillon.

On appelle « infrarouge » le rayonnement correspondant aux longueurs d'onde directement supérieures à celles du spectre de la lumière visible. Conventionnellement, les limites du proche infrarouge se situent entre les longueurs d'onde 800 et 2 500 nm soit 4 000 à 10 000  $\text{cm}^{-1}$  (nombres d'ondes).

L'absorption des rayonnements par les échantillons dépend de la composition de la matière organique. En effet, les liaisons chimiques sont capables d'absorber les rayonnements correspondant à certaines fréquences particulières et rentrent en vibration. C'est cette propriété vibratoire des liaisons chimiques de la matière organique que va utiliser la spectroscopie dans le proche infrarouge pour établir un lien entre l'absorption de la lumière et la composition de l'échantillon.

Pour faire cette analyse, l'échantillon va être éclairé à différentes fréquences (ou longueurs d'onde  $\lambda$ ). L'absorption de la lumière à chacune de ces longueurs d'onde constitue le «spectre» de l'échantillon (Figure 12). Ce spectre peut être constitué de plusieurs centaines de longueurs d'onde pour chacune desquelles on a mesuré l'absorption de la lumière par la matière. Une mesure est effectuée tous les 2  $\text{cm}^{-1}$  ( $1 \text{ cm}^{-1} = 1/10^7 \text{ nm}$ ).



**Figure 12** : Exemple d'un spectre obtenu en proche infrarouge sur de la poudre de bois de peuplier.  
Granulométrie : 200  $\mu\text{m}$



La spectrométrie proche infrarouge est une technique possédant de nombreux avantages, elle est :

- **Rapide** : il suffit de quelques secondes pour obtenir un spectre d'absorption, permettant ainsi de prédire la composition exacte du matériau.
- **Non destructif** : l'échantillon est récupéré intact après analyse. Cette propriété est particulièrement importante pour des échantillons que l'on possède en quantité restreinte ou que l'on souhaite réutiliser.
- **Peu onéreuse** : une fois l'appareil acquis, l'analyse des échantillons en SPIR ne représente aucun coût de fonctionnement

Lors de ma formation, j'ai fait l'acquisition des spectres pour les 48 échantillons de la Famille 54 à l'aide de l'appareil *Spectrum 400* (Perkin Elmer, Courtabœuf, France) (**Figure 13**) sur lesquels j'ai réalisé en parallèle le dosage des sucres solubles.



**Figure 13** : Spectrophotomètre infrarouge (*Spectrum 400*, INRA Orléans)

Les différents spectres ainsi obtenus mis en relation avec les dosages chimiques vont permettre d'établir un modèle de calibration à l'aide de la SPIR afin de prédire le taux de sucres solubles des échantillons de la Famille 54 (environ 1460 échantillons) et ainsi réduire le coût et le temps d'analyse par rapport aux dosages chimiques et enzymatiques.

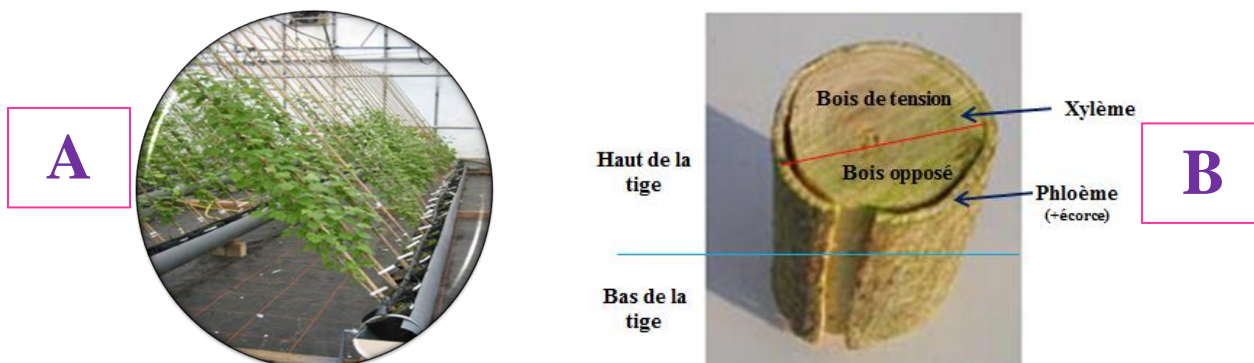
## 3.2 Analyses moléculaires

### 3.2.1 Matériel végétal

J'ai analysé 32 échantillons issus du clone 717-1B4 qui est un hybride inter-spécifique entre un peuplier de l'espèce *P. tremula* et un peuplier de l'espèce *P. alba*. Quatre pools de 6 arbres ont été inclinés (environ 45° d'inclinaison) pendant 2 semaines en serre afin qu'ils produisent du bois de tension et du bois opposé (**Figure 14A**). Des échantillons de xylème et de phloème ont ensuite été prélevés en haut ou en bas de la tige de chaque arbre constituant les pools. Chaque fragment de tige est coupé en deux pour distinguer le bois opposé du bois de tension puis écorcé, afin de séparer le phloème du xylème (**Figure 14B**). Les échantillons



d'un même pool sont broyés ensemble à l'aide du *Mixer Mill MM300* sous azote liquide et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  en attendant les extractions d'ARNs. Pour chaque pool numéroté de 1 à 4, on dispose de 8 échantillons : phloème haut et bas, opposé et tendu d'une part et xylème haut et bas, opposé et tendu d'autre part.



**Figure 14** : Clonage 717-1B4 incliné en serre (A) et prélèvement des échantillons sur la tige (B) (INRA Orléans)

### 3.2.2 Extraction d'ARNs

300 à 400 mg de poudre congelée ont été transférés dans un tube *Falcon* de 15 mL. Il a été ajouté 5 mL de tampon d'extraction (annexe 6.3) préchauffé au bain marie à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes. Deux extractions successives des ARNs sont réalisées avec du chloroforme/alcool isoamylique (24/1) par centrifugation (8 000 g, 5 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Les ARNs, présents dans la phase aqueuse, sont précipités par ajout de chlorure de lithium 10 M (1/4 du volume de la phase aqueuse) pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Le lendemain, les ARNs sont récupérés par une centrifugation de 20 minutes à 10 000 g à  $4^{\circ}\text{C}$  puis le culot est repris dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau RNase free. Les ARNs sont purifiés à l'aide du *RNeasy® MinElute Cleanup Kit* (Qiagen, Courtabœuf, France) : Il est ajouté 350  $\mu\text{L}$  de tampon RLT (contenant 30 à 50 % de Guanidine-isothiocyanate) et 250  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 96% afin de créer des conditions qui favorisent la liaison sélective de l'ARN à la membrane *MinElute RNeasy* de la colonne.

L'échantillon est ensuite appliqué à la colonne *RNeasy MinElute* et centrifugé 15 secondes à 8 000 g. Les contaminants restants sont éliminés au cours de deux étapes de lavage (500  $\mu\text{L}$  de tampon RTE et centrifugation 1 minute à 8 000 g). L'ARN purifié retenu sur la membrane de silice est élué dans de l'eau RNase free (deux fois 30  $\mu\text{L}$  d'eau et centrifugation 1 minute à 8000 g).

La concentration de l'ARN extrait est ensuite mesurée au *NanoDrop ND<sub>1000</sub>* (Labtech, Palaiseau, France), spectrophomètre permettant de doser des acides nucléiques, par dépôt de 2  $\mu\text{L}$  d'échantillon seulement. Le résultat est donné en ng/ $\mu\text{L}$ .





### 3.2.3 RT-PCR semi-quantitative

Afin de mettre en évidence l'accumulation d'ARNm correspondant à un gène d'intérêt spécifique dans le bois de peuplier, j'ai réalisé une RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). Cette technique consiste à copier grâce à une reverse transcriptase les ARNs messagers en ADNc simple brin pour s'en servir de matrice dans une réaction d'amplification PCR avec des amorces spécifiques d'un gène d'intérêt

Ici, le but de la manipulation est de détecter la présence du gène d'intérêt PopFla8 et de quantifier les transcrits correspondants : ce gène code pour une protéine de type arabinogalactane qui est exprimée plus fortement dans le bois de tension que dans le bois opposé, afin de confirmer la formation de bois de tension dans nos arbres inclinés. Le gène 18S, codant pour les ARNs ribosomaux présents dans tous types de tissus, a été utilisé comme gène de référence pour cette quantification relative.

Dans un premier temps, l'ARN a été extrait comme décrit précédemment. La reverse transcription s'effectue dans un tube de 0,5 mL, 1 µL d'oligo(DT) et 1 µL de dNTPs 10 mM ont été ajoutés à 2 µg d'ARN purifié. Le mélange est incubé 5 minutes à 65°C puis refroidi sur glace avant d'ajouter 4 µL de Tampon 1<sup>er</sup> brin 5X et 2 µL de DTT 0,1 M. Le tube est de nouveau incubé 2 minutes à 45°C, puis 1 µL d'enzyme Superscript à 200U/µL sont ajoutés au mélange. La réaction est incubée 50 minutes à 42°C et est terminée par 15 minutes à 70°C puis placée sur glace. Le mélange réactionnel est ensuite conservé à -20°C.

Les ADNc ainsi obtenus servent de matrice à la réaction PCR qui se déroule dans un volume réactionnel de 25 µL. Un mix RT-PCR (**annexe 6.4**) est ajouté à 2µL de matrice préalablement diluée au 1/4.

L'amplification PCR se déroule ainsi : dénaturation de 5 minutes à 94°C, 40 cycles sont effectués pour le gène PopFLA8 (45 sec à 94°C pour la dénaturation, 45 sec à 55°C pour l'hybridation et 45 sec à 72°C pour l'élongation) puis une élongation finale est réalisée 8 minutes à 72°C. Seulement 25 cycles sont effectués pour le gène 18S (qui est fortement exprimé).

Enfin, les produits PCR sont ensuite visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en TBE 1X (migration de 40 minutes à 100V) et révélation au bromure d'éthidium (BET). La taille des produits amplifiés est de 232 pb pour le gène 18S et 828 pb pour le gène PopFLA8. L'intensité des bandes spécifiques correspondant aux amplicons permet d'effectuer une analyse semi-quantitative de l'expression de ces gènes dans les différents échantillons.



### 3.2.4 PCR quantitative

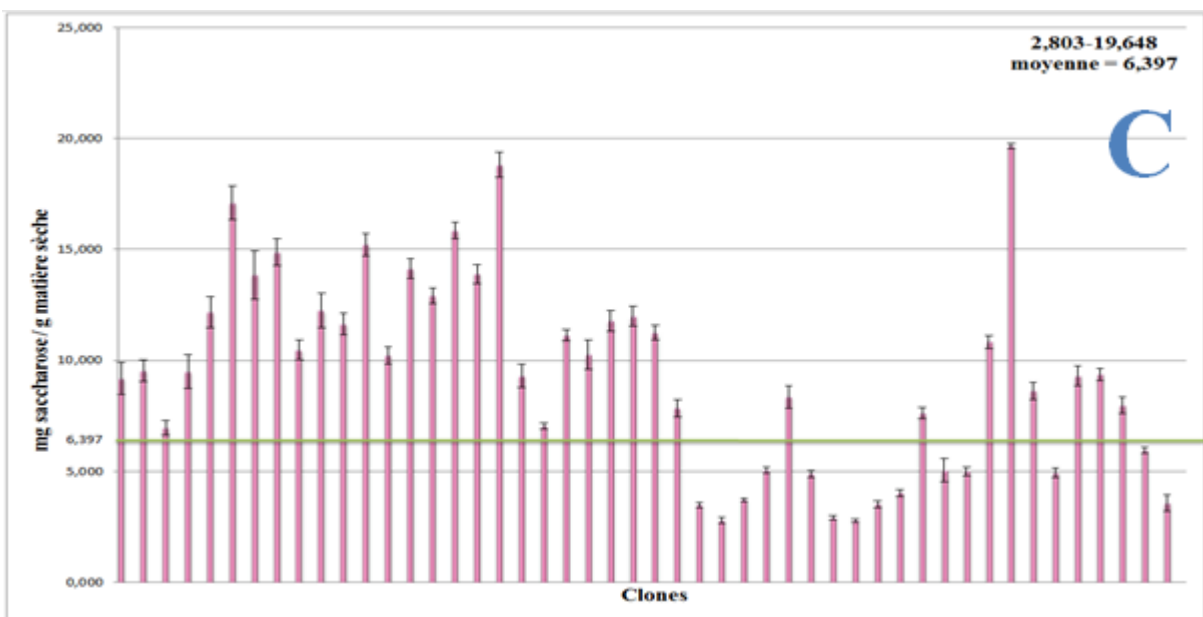
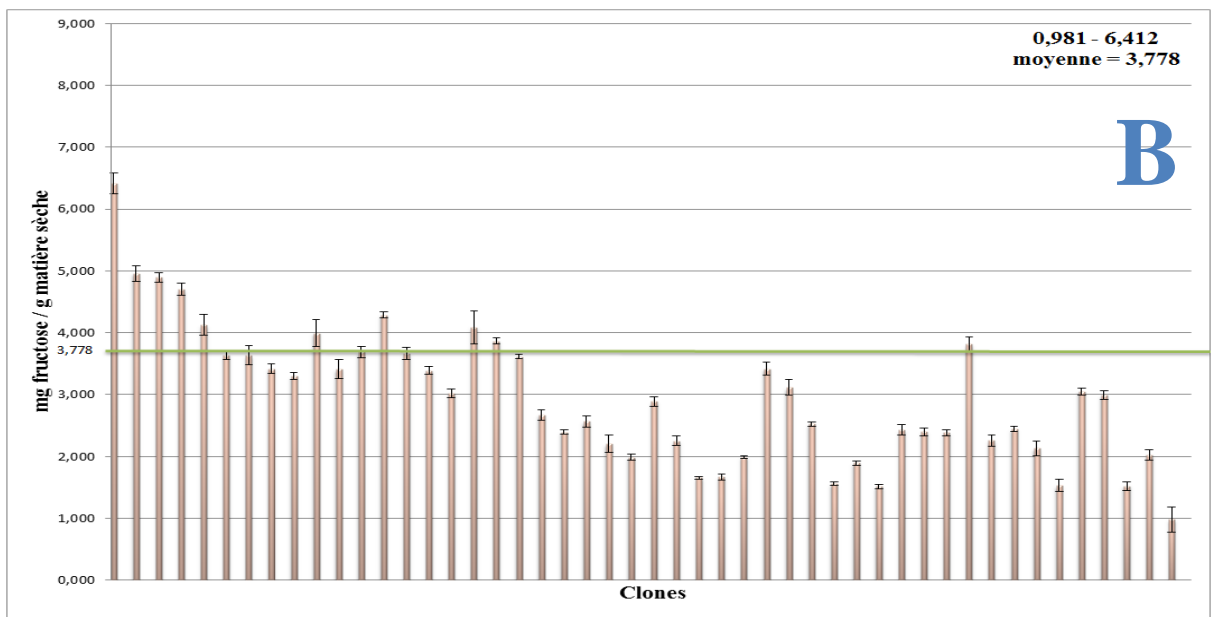
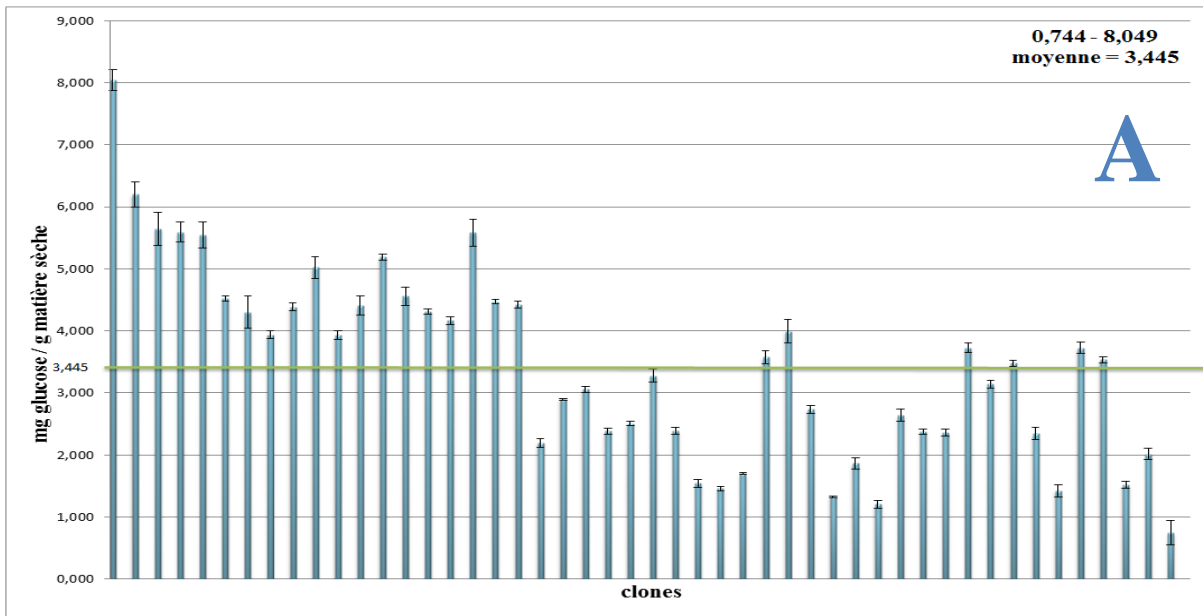
La PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel nous permet de quantifier l'expression d'un gène d'intérêt par une estimation des transcrits correspondants ; il s'agit ici de comparer le niveau d'expression du gène d'intérêt PopFla8. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'amplicon, mesurée grâce à un marqueur fluorescent s'intercalant entre les brins d'ADN, correspond au double de la quantité de matrice présente si l'efficacité de réaction est parfaite : pour n cycles d'amplification, on obtient  $2^n$  fois plus de matrice.

La quantification se fait donc par le suivi de la fluorescence en temps réel : elle s'exprime par le Ct (Cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse une valeur seuil déterminée par la machine (valeur seuil comprise généralement entre 10 et 20). Plus le Ct est bas, plus la quantité d'amplicons fluorescents est importante et donc plus le gène correspondant est exprimé.

Un contrôle de la spécificité de l'amplicon est effectué par une étape supplémentaire programmée en fin de réaction d'amplification qui permet d'obtenir une courbe de fusion : le pic unique de cette courbe représente la température de fusion ( $T_m$ ) du produit PCR. Si plusieurs pics sont observés, on est en présence d'un mélange d'amplicons.

Les ADNc obtenus lors de la reverse transcription servent de matrice à la qPCR qui se déroule dans un volume réactionnel de 12  $\mu$ L. Un mix qPCR (**annexe 6.5**) est ajouté à 2  $\mu$ L de matrice préalablement diluée au  $1/2$ .

L'amplification débute par une incubation de 2 minutes à 50°C puis une dénaturation de 2 minutes à 95°C et 40 cycles sont ensuite effectués (15 sec à 95°C et 30sec à 60°C avec mesure de la fluorescence). La courbe de fusion finale est obtenue par une acquisition en continu de la fluorescence sur les amplicons soumis à une température progressive de 60°C à 95°C par palier de 0.1 °C pendant 20 minutes. Les résultats obtenus sont ensuite analysés.



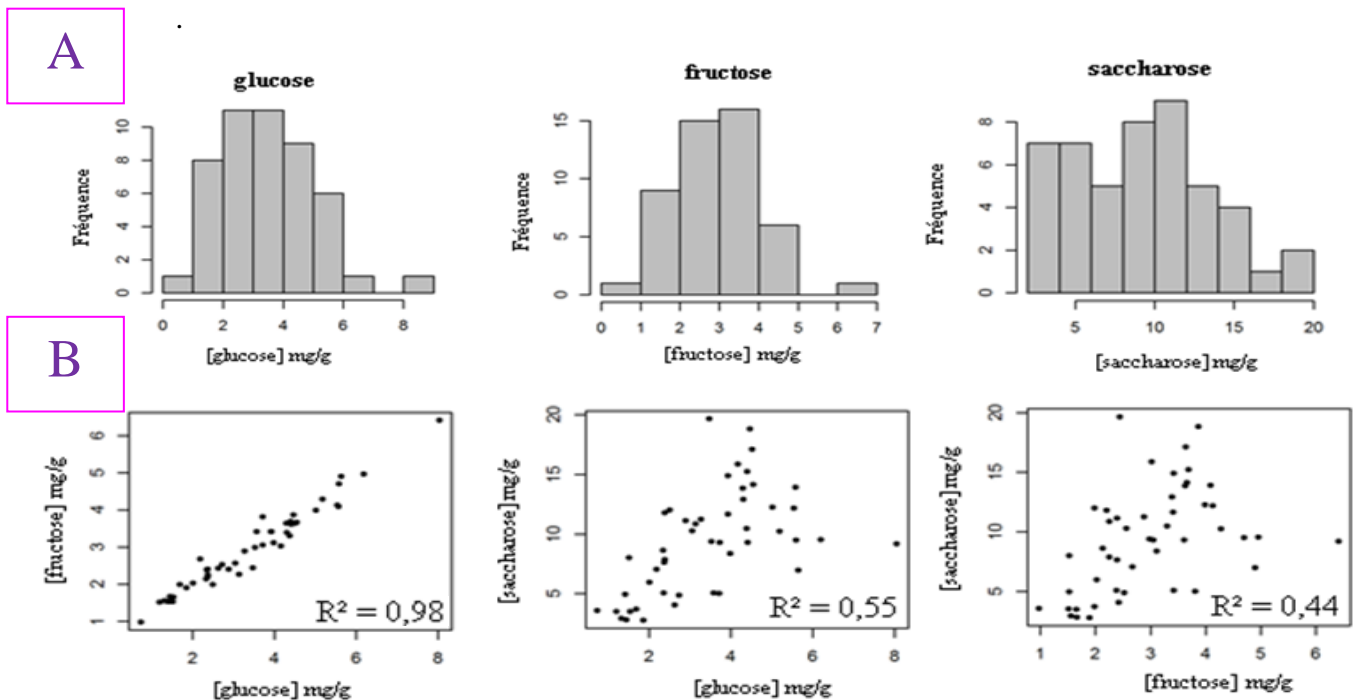
**Figure 15 :** Concentration en glucose (A), fructose (B) et saccharose (C) pour les 48 échantillons de la Famille 54. (la ligne horizontale représente la valeur moyenne ; la barre d'erreur représente l'écart type)

## 4. RESULTATS ET DISCUSSION

### 4.1 Variation des sucres solubles dans le bois de peuplier hybride

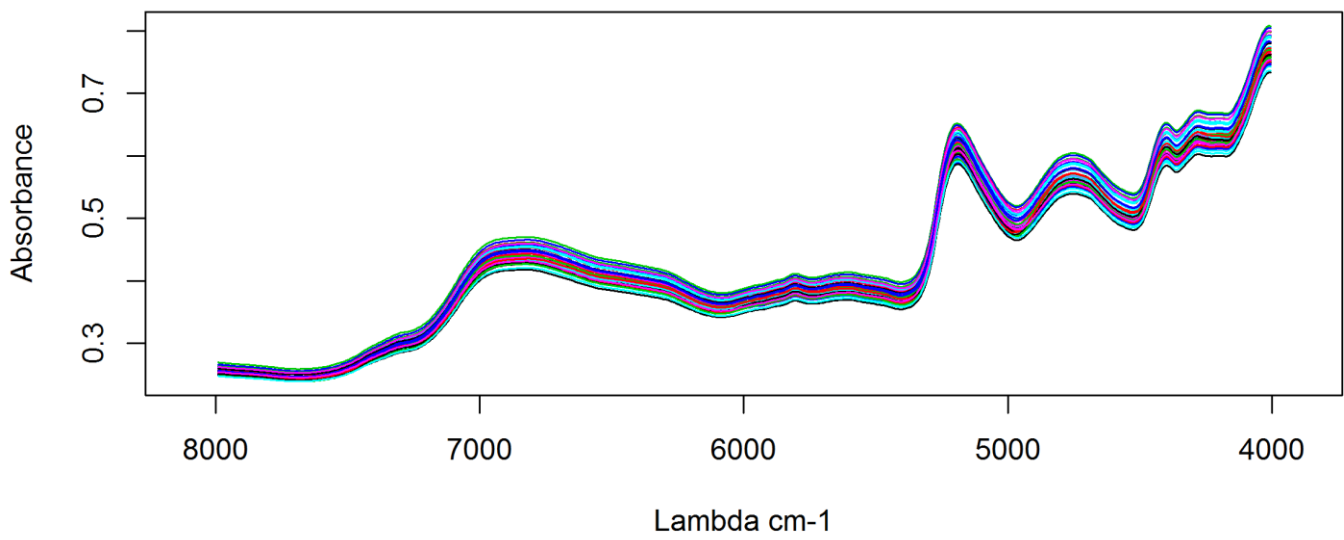
Les concentrations des trois sucres solubles ont été déterminées sur 48 échantillons de la Famille 54 et sont présentées sur la **figure 15**. Il est possible de constater que le saccharose est le sucre soluble prépondérant dans le bois de ce sous-échantillonnage de la famille 54 (moyenne = 6,397 mg/g de matière sèche). Les concentrations en glucose et fructose sont semblables (moyenne = 3,445 et 3,778 mg/g de matière sèche respectivement). Pour chaque échantillon, quatre dosages ont été réalisés. Les écarts types sont faibles ce qui indique une bonne répétabilité de ces dosages.

Les résultats que j'ai obtenus ont été analysés statistiquement grâce au logiciel R conjointement avec un des scientifiques impliqué dans le projet *Tree For Joules* (**Figure 16**).



**Figure 16** : Distributions de chaque sucre analysé (A) et corrélations entre les différents sucres (B)

La distribution de chaque sucre (**Figure 16A**) nous montre que la concentration maximale est de l'ordre de 20 mg/g de matière sèche pour le saccharose. Cependant, une majorité des échantillons présente une concentration de l'ordre de 12 mg/g de matière sèche. Les concentrations en glucose et fructose sont semblables avec des teneurs majoritaires de l'ordre de 2 à 4 mg/g de matière sèche pour la majorité des individus. Pour notre effectif d'échantillons utilisés et sélectionnés selon leur teneur en cellulose, les distributions pour les sucres solubles s'avèrent normales notamment pour le glucose et le fructose.



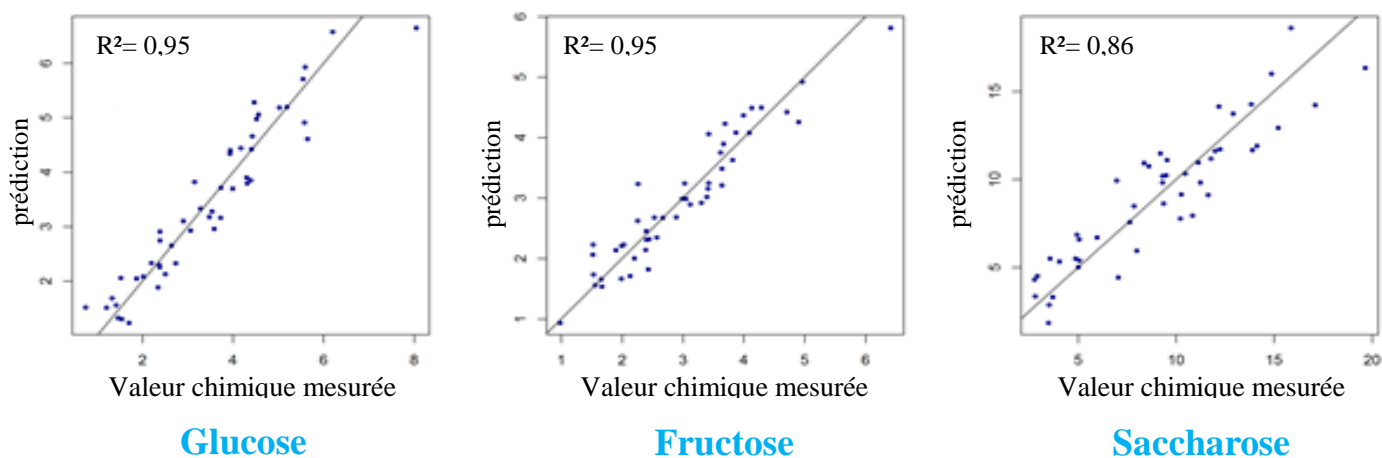
**Figure 17** : Spectres des 48 échantillons de la Famille 54 utilisés pour établir les modèles de calibration.

Cependant, pour le saccharose, il y a un décalage de la distribution vers les plus faibles valeurs. Ces distributions dans nos effectifs d'échantillons expérimentaux sont satisfaisantes pour pouvoir construire un bon modèle de prédiction indirecte. Le coefficient de détermination entre les différents sucres (**Figure 16B**) montre une très forte liaison entre la concentration en glucose et en fructose ( $R^2 = 0,98$ ). La liaison entre la teneur en glucose et la teneur en saccharose ainsi que celle entre la teneur en fructose et la teneur en saccharose sont plus faibles ( $R^2 = 0,55$  et  $0,44$  respectivement).

#### 4.2 Corrélation des données chimiques avec les spectres infrarouges

A partir des 48 échantillons de la Famille 54, des modèles de calibration ont pu être réalisés pour le glucose, le fructose et le saccharose solubles. Pour cela, les spectres obtenus en proche infrarouge (**figure 17**) ont été mis en relation après avoir été normalisés puis dérivés avec les mesures chimiques de référence réalisées précédemment. (**figure 18**).

En abscisse se trouve la valeur chimique mesurée et en ordonnée est indiquée la valeur prédite par le modèle de calibration SPIR. Cette mise en relation a pu être faite par régression PLS (*Partial Least Square*) au moyen du logiciel R



**Figure 18** : Modèles de calibration en proche infrarouge pour les sucres solubles du bois de peupliers; comparaison entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées.

Il est possible de constater que la réalisation des modèles de calibration pour le glucose et le fructose donnent de très bons modèles puisque des coefficients de détermination sont élevés ( $R^2 = 0,95$ ). Le modèle de calibration du saccharose, quant à lui, donne un bon modèle avec un coefficient de détermination  $R^2$  plus faible égal à  $0,86$ . Ce sont les premiers résultats obtenus pour la Famille 54 permettant de voir qu'il est possible de doser les sucres solubles du bois de peuplier et d'établir des modèles de calibration avec la SPIR. De prochains modèles avec un nombre plus important d'échantillons de référence et avec une variabilité









L'analyse des gels permet de constater que la taille des bandes observées est comprise entre 200 et 250 pb ce qui correspond à la taille de l'amplicon du gène 18S pour tous les échantillons, que ce soit du xylème ou du phloème, du bois de tension (T) ou du bois opposé (O) et que l'échantillon provienne du haut de la tige ou du bas. Le témoin négatif indique qu'il n'y a pas eu de contamination du mix PCR durant la manipulation. L'intensité des bandes est globalement la même pour tous les échantillons traduisant donc une expression du gène 18S comparable dans tous les échantillons. Ces résultats permettent de valider la qualité de la reverse transcription : la copie des ARNm en ADNc est à peu près équivalente pour tous les échantillons. J'ai donc ensuite comparé, entre tous les échantillons, l'expression relative du gène PopFla8, qui est exprimé préférentiellement dans le bois de tension (**Figure 20**).



**Figure 20** : Etude de l'expression du gène PopFla8 (828pb) sur nos échantillons (bois de tension et bois opposé) de phloème (**C**) et de xylème (**D**) suivant la hauteur du prélèvement (bas ou haut de la tige). Puits n°9 = Témoin négatif

D'après l'analyse des gels, il est possible de constater qu'aucune bande n'a été amplifiée dans les échantillons de phloème (**Figure 20C**) ce qui confirme que le gène PopFla8 est exprimé uniquement dans le xylème.

En ce qui concerne le xylème, (**Figure 20D**), une bande d'environ 850 pb est observée dans tous les échantillons de xylème tendu (puits 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15 et 17) ce qui correspond au gène PopFla8 puisque la taille attendue du produit d'amplification est de 828 pb.

**Tableau I :** Comparaison des valeurs obtenues pour les 2 pools des échantillons de xylème pour le gène 18S et PopFla8.

pool	Echantillon	gène 18 S		gène PopFla8	
		Ct	Moyenne	Ct	Moyenne
1	opposé bas	11,14	11,01	23,72	23,78
		10,97		23,80	
		10,91		23,83	
	tension bas	10,58	10,77	23,94	24,04
		11,09		24,19	
		10,64		23,98	
	opposé haut	11,25	11,23	23,24	23,15
		11,16		22,99	
11,28		23,23			
tension haut	9,70	10,29	24,13	24,23	
	10,39		24,26		
	10,77		24,29		
2	opposé bas	10,81	10,78	24,63	24,60
		10,82		24,63	
		10,71		24,54	
	tension bas	11,62	11,09	24,85	24,84
		10,83		24,80	
		10,81		24,86	
	opposé haut	13,03	11,89	24,37	24,53
		11,38		24,46	
11,27		24,76			
tension haut	11,84	11,74	24,36	23,72	
	11,70		23,32		
	11,69		23,49		

Cette même bande est présente dans deux échantillons de bois opposé (puits 3 et 10) mais avec une intensité moins élevée que leur échantillon complémentaire du bois de tension (puits 4 et 11)

On peut suspecter une contamination en ADN génomique de ces échantillons d'où l'amplification positive. Bien que les échantillons ARNs aient été traités à la DNaseI lors de leur extraction, il serait intéressant de vérifier qu'il n'y a pas eu de contamination avec de l'ADN génomique. Pour cela, il faut refaire cette expérience en utilisant un témoin *Reverse Transcriptase* négatif pour chaque échantillon : les échantillons seraient traités en double, le premier comme précédemment et le second en omettant l'enzyme Superscript à 200U/ $\mu$ L. Certaines bandes présentes ici pourraient alors se révéler être des contaminations ADN. On peut également suspecter une contamination entre bois tendu et bois opposé dès le prélèvement sur le plant.

Cependant, des travaux antérieurs menés dans l'équipe ont montré que le gène PopFla8 est exprimé également dans le bois opposé mais en quantité moindre : on dit qu'il est **régulé positivement dans le bois de tension et régulé négativement dans le bois opposé** (Lafarguette et *al.*, 2004).

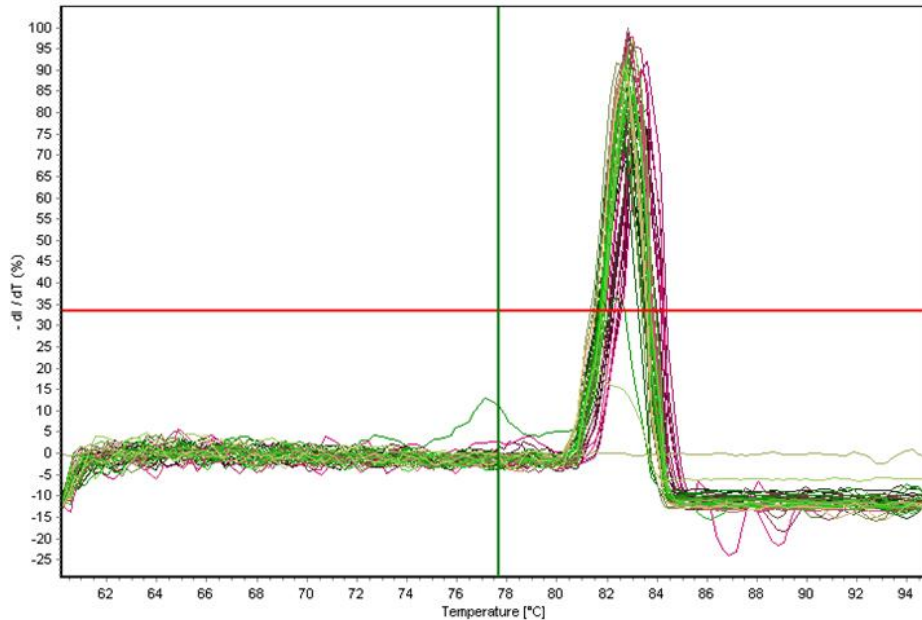
#### 4.3.2 Analyse quantitative du gène par qPCR

La qPCR a été effectuée sur 3 réplicats par échantillon et seulement deux pools de xylème ont été testés. Les résultats sont présentés dans le **tableau 1**.

Il y a une bonne répétabilité entre les réplicats pour chaque échantillon puisque la différence est de l'ordre de 0,5 en moyenne.

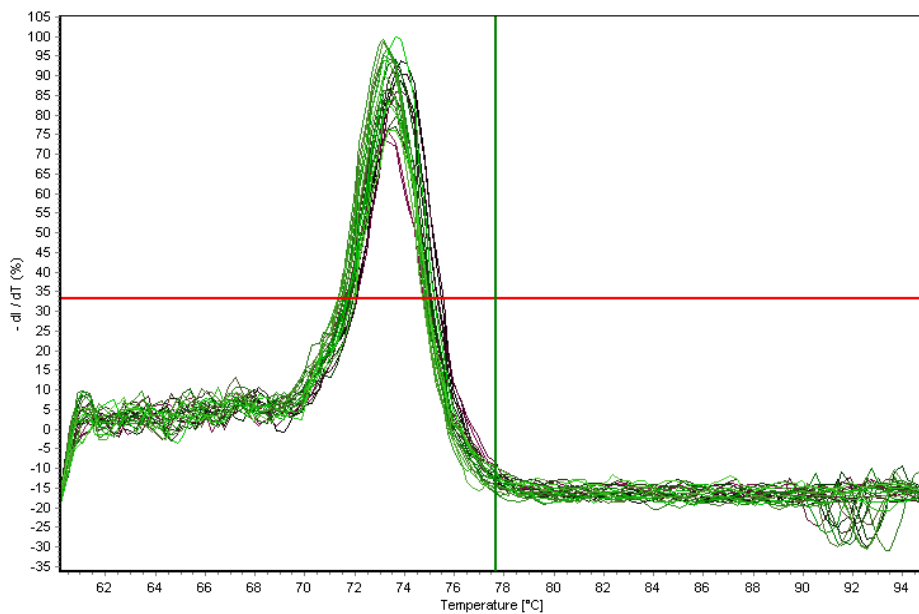
Le gène 18S a également servi de contrôle interne. L'analyse de la courbe de fusion (**Figure 21**) montre la présence d'un seul pic confirmant la spécificité de l'amplicon et la température de fusion du produit PCR est d'environ 83°C. Ces résultats confirment ceux obtenus en RT-PCR. Par ailleurs, les Ct sont relativement bas (entre 10 et 12), ce qui confirme que ce gène est bien exprimé dans tous les échantillons.





**Figure 21** : Courbe de fusion des produits d'amplification du gène 18S

Pour le gène PopFla8, les amorces utilisées sont bien spécifiques de l'amplicon puisqu'il n'y a qu'un seul pic sur la courbe de fusion (**Figure 22**) et la température de fusion du produit PCR est d'environ 73°C. Cependant, il n'y a pas de différence nette entre les échantillons de bois opposé et de bois de tension comme observé dans la RT-PCR. Ces résultats sont inattendus mais cela s'explique probablement par le fait que le fragment amplifié est de 828 pb. En effet, en qPCR pour que l'efficacité de réaction soit bonne, il faut amplifier des fragments de taille inférieure à 300 pb (Udvardi et *al.*, 2008)



**Figure 22** : Courbe de fusion des produits d'amplification du gène PopFla8





## 5. CONCLUSION

### 5.1 Conclusion scientifique

Au terme de cette année de formation, je me suis familiarisée aux techniques de biochimie et de biologie moléculaire sur du matériel végétal.

Dans le cadre du projet *Tree for Joules*, qui a pour objectif d'étudier l'utilisation potentielle du bois de peuplier comme source de matière lignocellulosique pour la production de biocarburant, j'ai réalisé le dosage chimique des sucres solubles et l'analyse SPIR de 48 échantillons de la Famille 54. Cela a permis d'établir un modèle de calibration pour estimer la concentration en sucres solubles des 1460 échantillons restants.

Des analyses complémentaires sont prévues sur 12 individus pour valider ce modèle de calibration. Sur ces mêmes échantillons, il est prévu de doser chimiquement la cellulose et d'établir un modèle de calibration pour estimer la teneur en cellulose sur l'ensemble des individus de la Famille 54.

Les deux modèles seront ensuite confrontés pour identifier les individus les plus riches en cellulose et sucres solubles. L'utilisation de leur bois pourrait être proposée dans le cadre du procédé de fabrication du bioéthanol, étudié dans un autre projet (Futuro1).

L'analyse moléculaire des échantillons de peupliers hybrides 717-1B4 a montré que le gène PopFla8 est surexprimé dans le bois de tension. Il constitue donc un bon marqueur moléculaire de ce type de bois particulier, et pourrait être utilisé dans le cadre d'un criblage à haut-débit au même titre que les dosages chimiques. Le bois de tension étant caractérisé par une proportion plus forte de cellulose dans sa paroi secondaire, il pourrait être intéressant pour la production de bioéthanol (Foston et *al.*, 2011). La technique devra éventuellement être transposée sur d'autres hybrides car le clone 717-1B4 n'est pas homologué pour la populiculture.

### 5.2 Conclusion personnelle

L'année de formation que j'ai réalisé à l'INRA d'Orléans a été très enrichissante, tant du point de vue professionnel que personnel. J'y ai acquis des connaissances et des techniques de laboratoire, et j'ai aussi découvert le travail en équipe. J'ai été très bien accueillie au sein de l'unité AGPF, où règne une ambiance conviviale.

Mon travail m'a beaucoup intéressé car le projet de recherche est vraiment attrayant. D'une part, car les recherches pour le développement durable sont en plein essor et d'autre



part parce qu'il m'a permis de découvrir un ensemble varié de techniques de laboratoire appliquées au matériel végétal.

J'ai eu la chance de pouvoir effectuer mon stage dans deux laboratoires différents, l'un, spécialisé dans la biologie moléculaire, et l'autre orienté vers la biochimie. Ainsi, j'ai pu effectuer différents types d'expériences telles que des extractions d'ARN, des RT-PCR et des qPCR ainsi que des extractions, des dosages de sucres solubles et des analyses en spectrométrie proche infrarouge sur des hybrides de peuplier.

Cette année m'a permis d'élargir la vision du travail d'assistant ingénieur de laboratoire après avoir déjà effectué des stages en laboratoires de recherche médicale. J'ai pu suivre l'organisation du laboratoire (les réunions scientifiques d'unité), voir l'importance du travail d'équipe (travailler en collaboration avec les étudiants en thèse, assistants ingénieurs et techniciens), mais aussi acquérir une réelle autonomie dans la réalisation de mes manipulations.

J'ai côtoyé les chercheurs, les étudiants en Master et en Thèse ainsi que les techniciens, ce qui m'a permis de mûrir mon projet professionnel. A présent, je me conforte dans l'idée de terminer mes études avec ma licence professionnelle et ainsi entrer dans la vie active.

J'estime être heureuse d'avoir pu effectuer cette année entourée de personnes compétentes qui ont su me guider dans mes expériences tout en me laissant progressivement une autonomie de plus en plus importante. Je garde de cette expérience un excellent souvenir qui constitue désormais une expérience professionnelle valorisante et encourageante pour mon avenir.



## 6. ANNEXES

### 6.1 Composition des réactifs utilisés pour le dosage des sucres solubles

#### **NADP $6,4 \cdot 10^{-3}$ M**

60 mg NADP + 12 mL d'eau ultra-pure

#### **ATP $41,3 \cdot 10^{-3}$ M**

300 mg ATP

300 mg NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonate de sodium)

Dissolution dans de l'eau ultra-pure qsp 12 mL

#### **HK-G6PDH**

1 mL de sulfate d'ammonium 2,5 M pH6 soit 1,67 M final

300 µL hexokinase à 1500 U/mL soit 300 U/mL final

200 µL G6PDH à 1000 U/mL soit 133 U/mL final

#### **PGI 1 mg/mL**

200 µL PGI à 10 mg/mL

1800 µL de sulfate d'ammonium 2,5 M pH6

#### **Invertase 5 mg/mL**

10 mg d'invertase

Dissoudre dans 2 mL dans du tampon citrate 0,32 M pH 4,6

#### **Tampon triéthanolamine**

14 g triéthanolamine

250 mg MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O

Ajuster le pH à 7,6 avec une solution de NaOH 5N

Dissolution dans l'eau ultra-pure qsp 100 mL

#### **Tampon réactionnel**

250 µL de tampon triéthanolamine

50 µl de NADP

50 µL d'ATP

420 µL d'eau ultra-pure



## 6.2 Détermination de la concentration en sucres solubles

Réalisation des calculs de la différence d'absorbance et de la concentration en mg/g :

$$\begin{aligned}\Delta A_{\text{glucose}} &= A2-A1 \\ \Delta A_{\text{fructose}} &= A3-A2 \\ \Delta A_{\text{saccharose}} &= (A2-A1) - \Delta A_{\text{glucose}}\end{aligned}$$

$$C(\text{g/L}) = \frac{V \times PM \times \Delta A}{\varepsilon \times d \times v \times 1000}$$

$$C(\text{mg/g}) = \frac{(\text{g/L}) \times V_r}{MS}$$

V : Volume réactionnel ( $\mu\text{L}$ )

PM : Masse moléculaire (180,16 g/mol  $\rightarrow$  glucose/fructose et 342,3 g/mol  $\rightarrow$  saccharose)

$\varepsilon$  : Coefficient d'extinction molaire du NADPH (6,3 L/mmol/cm)

d : Trajet optique soit 1 cm

v : volume d'extrait utilisé pour le dosage

$V_r$  : Volume de reprise du résidu sec (mL)

MS : Masse matière sèche utilisée pour l'extraction (mg)

## 6.3 Composition du tampon d'extraction des ARNs

### Tampon d'extraction

0,5 mL CTAB 20% (PV)

0,5 mL PVP 20% (PV)

0,5 mL Tris-HCl 1M pH 8

0,25 mL EDTA 0,5M

2 mL NaCl 5M

50  $\mu\text{L}$  spermidine 100X (50g/L)

100  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoéthanol

1,1 mL d'eau ultra-pure





## 6.4 Composition du mix RT-PCR

### Mix RT-PCR

- 0,5  $\mu\text{L}$  d'amorce sens 10  $\mu\text{M}$  (Primer F)
- 0,5  $\mu\text{L}$  d'amorce antisens 10  $\mu\text{M}$  (Primer R)
- 0,5  $\mu\text{L}$  dNTPs 10 mM
- 0,25  $\mu\text{L}$  Taq polymérase 4U/ $\mu\text{L}$
- 0,75  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  1,5 mM
- 2,5  $\mu\text{L}$  Tampon enzyme 1X

## 6.5 Composition du mix qPCR

### Mix qPCR

- 6  $\mu\text{L}$  mix SyberGreen 6X (dNTPs, Taq polymérase, tampon enzyme,  $\text{MgCl}_2$ )
- 0,25  $\mu\text{L}$  d'amorce sens 10  $\mu\text{M}$  (Primer F)
- 0,25  $\mu\text{L}$  d'amorce antisens 10  $\mu\text{M}$  (Primer R)
- 3,5  $\mu\text{L}$  d'eau ultra-pure



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ✚ A. Berthelot, G. Chantre, 2004. **La peupleraie française : un maillon essentiel de la filière bois.** *Biofutur*, 247, 20-23
- ✚ H. Camefort, 1984, **Morphologie des végétaux vasculaires. Cytologie. Anatomie. Adaptations.**, Ed. Doin, pp 432
- ✚ A. Déjardin, F. Laurans, D. Arnaud, C. Breton, G. Pilate, J-C. Leplé, 2010. **Wood formation in Angiosperms.** *C.R. Biologies*, 333 (4), 325-334
- ✚ M. Foston, C.A. Hubbell, R. Samuel, S. Jung, H. Fan, S-Y Ding, Y. Zeng, S. Jawdy, M. Davis, R. Sykes, E. Gjersing, G.A. Tuskan, U. Kallur, A.J. Ragauskas, 2011. **Chemical, ultrastructural and supramolecular analysis of tension wood in *Populus tremula x alba* as a model substrate for reduced recalcitrance.** *Energy & Environmental Science*, 4, 4962–4971
- ✚ B. Jourez, 1997. **Le bois de tension.** *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 1 (2) 100-112
- ✚ F. Lafarguette, J-C. Leplé, A. Déjardin, F. Laurans, G. Costa, M-C. Lesage-Descauses, G. Pilate, 2004. **Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood.** *New Phytol.*, 164, 107-121
- ✚ J-C. Leplé, A. Déjardin, F. Laurens, G. Pilate, N. Goué, P. Label, I. Beritognolo, N. Boizot, C. Breton, 2004. **Physiologie et génomique de la formation du bois.** *Biofutur*, 247, 43-48
- ✚ C. Plomion, G. Leprovost, A. Stokes, 2001. **Wood Formation in Trees.** *Plant Physiology*, 127, 1513–1523
- ✚ R. Shleser, 1994. **Ethanol production in Hawaii : Processes, feedstocks, and current economic feasibility of fuel grade ethanol production in Hawaii.** *Department of Business, Economic Development & Tourism, State of Hawaii.*
- ✚ M.K. Udvardi, T. Czechowski, W.R. Scheible, 2008. **Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR.** *Plant Cell*, 20, 1736-1737

## SITOGRAFIE

**projet-futurol.com** : production de bioéthanol de seconde génération

**www.peupliernoir.inra.oreans.fr**: site dédié au peuplier noir appartenant à l'INRA d'Orléans



## RESUME

L'objectif d'étude durant cette année de formation était la mise en œuvre d'analyses sur le bois de peuplier dans le cadre des actions menées pour le projet européen *Tree For Joules*.

Une analyse biochimique sur des hybrides de peuplier a été mise en place avec le dosage des sucres solubles dans le bois (glucose, fructose et saccharose) afin d'en étudier la distribution couplée avec une analyse en spectrométrie proche infrarouge afin d'établir des modèles de calibration qui pourront être utilisés en routine au laboratoire pour phénotyper à haut-débit les propriétés chimiques du bois.

Une analyse moléculaire a également été effectuée sur des hybrides de peuplier produisant du bois de tension suite à un stress mécanique qui leur était imposé. Pour cela, le gène PopFla 8, spécifique du bois de tension, a été détecté par RT-PCR et quantifié par qPCR.

A l'avenir, il sera intéressant de réaliser des analyses chimiques sur le bois de tension afin de le comparer au bois normal et ainsi déterminer quel type de bois serait le plus approprié pour la production de bioéthanol.

## ABSTRACT

The objective of this training year was to carry out various analyses on poplar within the framework of the European project *Tree For Joules*.

Biochemical analysis of hybrid poplar wood samples has been established with the dosage of soluble sugars (glucose, fructose and sucrose) in order to study their distribution and with the near-infrared spectrometry analysis of same samples to establish calibration models that could routinely be used in the lab for high throughput phenotyping of wood properties.

Molecular analysis was also performed on hybrid poplar producing tension wood in response to a mechanical stress. For this, the tension wood specific gene named PopFla 8 was detected by RT-PCR and quantified by qPCR.

In the future, it will be interesting to carry out chemical analysis specially on the tension wood in order to compare it with normal wood and determine what type of wood could be most appropriate for the bioethanol production.