

MALARDIER Adélaïde

Analyse des composants chimiques structuraux (lignines, cellulose) et des composés phénoliques du bois de Robinier



*Licence Professionnelle «Industries Chimiques et Pharmaceutiques»
option Analyse et Contrôle*

Rapport de stage du 3 Mars au 27 Août 2014

*Institut Universitaire de Technologie d'Orléans
Département Chimie
Enseignant tuteur : Reine NEHME*

*INRA Val de Loire, Centre d'Orléans
Unité d'Amélioration Génétique et Physiologie Forestières
Plateforme régionale GENOBOIS*

*Maitre de stage : Jean-Paul CHARPENTIER - Ingénieur de recherche
Référent : Kévin ADER - Technicien de recherche*



Remerciements

Je tiens à remercier M. Gilles PILATE, directeur de l'unité d'Amélioration Génétique et Physiologie Forestières au sein de l'INRA Val de Loire d'Orléans, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche.

Mes remerciements s'adressent tout 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 tout au long de mon stage.

Je souhaite également remercier Mme Nathalie BOIZOT, assistante ingénieur de recherche et M. Kévin ADER, technicien de laboratoire, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs conseils.

Je voudrais remercier mon enseignante référente Mme NEHME pour m'avoir suivi au cours de ce stage.

Pour finir, ma reconnaissance va également à tous les membres permanents et non permanents de l'INRA pour leur accueil et leur gentillesse.

Sommaire

Présentation du lieu de stage.....	1
1. <i>L'INRA</i> :.....	1
2. <i>Le centre INRA Val de Loire</i> :.....	1
3. <i>L'unité de recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF)</i> :.....	2
Introduction	3
1. <i>Le Robinier, producteur de biomasse</i> :.....	3
2. <i>Le projet CARBONEX (Région Champagne-Ardenne)</i> :.....	3
3. <i>Le projet VALROB (Région Centre)</i> :.....	4
4. <i>Caractéristique du bois de robinier</i> :.....	4
4.1 <i>La composition du bois de robinier</i> :.....	4
4.2 <i>La composition chimique du bois de Robinier</i> :.....	5
5. <i>Les objectifs du stage</i> :.....	9
Partie expérimentale	10
1. <i>Matériel végétal</i> :.....	10
2. <i>Dosages des constituants structuraux du bois</i> :.....	10
2.1 <i>Processus d'extraction permettant la préparation du résidu pariétal</i> : 11	
2.1.1 <i>Matériels et produits utilisés</i> :.....	11
2.1.2 <i>Protocole de la manipulation</i> :.....	11
2.2 <i>Dosage des lignines insolubles dites « Klason » et lignines solubles dans le bois de Robinier</i> :.....	12
2.2.1 <i>Matériels et produits utilisés</i> :.....	12
2.2.2 <i>Protocole de la manipulation</i> :.....	12
2.3 <i>Dosage de la cellulose</i> :.....	14
2.3.1 <i>Matériels et produits utilisés</i> :.....	14
2.3.2 <i>Protocole de la manipulation</i> :.....	14
2.4 <i>Dosage de lα-cellulose</i> :.....	15
2.4.1 <i>Matériels et produits utilisés</i> :.....	15
2.4.2 <i>Protocole de la manipulation</i> :.....	16
3. <i>Les composants extractibles du bois</i> :.....	17
3.1 <i>Extraction des composés phénoliques</i> :.....	17
3.1.1 <i>Matériels et produits utilisés</i> :.....	17

3.1.2	<i>Protocole de la manipulation :</i>	17
3.2	<i>Dosage quantitatif des composés phénoliques par la méthode au réactif de Folin :</i>	18
3.2.1	<i>Matériels et produits utilisés :</i>	19
3.2.2	<i>Protocole de la manipulation :</i>	19
3.3	<i>Dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC):</i>	21
3.3.1	<i>Matériels et produits utilisés :</i>	21
3.3.2	<i>Protocole de la manipulation :</i>	21
3.4	<i>Les propriétés des molécules extraites du bois :</i>	24
4.	<i>Les analyses des échantillons par Spectroscopie Proche Infrarouge (SPIR) :</i>	25
4.1	<i>Mode opératoire :</i>	25
Résultats et discussion.....		27
1.	<i>Les constituants extractibles et lignocellulosiques du bois de Robinier quantifiés par les méthodes chimiques :</i>	27
1.1	<i>Teneur en composés solubles extractibles :</i>	27
1.2	<i>Teneur en lignines solubles, insolubles (Klason) et totales :</i>	29
1.3	<i>Teneur en composés cellulosiques :</i>	31
2.	<i>Les composés phénoliques (la robinétine et la dihydrorobinétine) présents dans le bois de robinier :</i>	32
2.1	<i>Teneur en phénols totaux dosés par méthode colorimétrique :</i>	32
2.2	<i>Teneur en robinétine et dihydrorobinétine mesurées par méthode chromatographique (HPLC) :</i>	33
3.	<i>Modèles d'évaluation indirecte des composés du bois par Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) :</i>	36
3.1	<i>Modèle de calibration des extractibles du bois de robinier.....</i>	37
3.2	<i>Modèle de calibration pour les lignines solubles du bois de robinier :</i>	37
3.3	<i>Modèle de calibration des lignines insolubles (Klason) du bois de robinier :</i>	38
3.4	<i>Modèle de calibration des lignines totales du bois de robinier :</i>	38
4.	<i>Activité anti-oxydante des molécules du bois de robinier :</i>	39
Conclusions		41
1.	<i>Conclusion scientifique :</i>	41
2.	<i>Conclusion personnelle :</i>	41
Bibliographie.....		42

Table des figures et illustrations

FIGURE 1 : VUE AERIENNE DU SITE D'ORLEANS	1
FIGURE 2 : SECTION D'UN TRONC DE ROBINIER	5
FIGURE 3 : REPRESENTATION POSSIBLE DE LA STRUCTURE DE LA LIGNINE.....	6
FIGURE 4 : FORMULES CHIMIQUES DES TROIS MONOMERES FORMANT LES CHAINES DE LIGNINE	6
FIGURE 5 : MONOMERE DE LA CELLULOSE.....	7
FIGURE 6 : FORMATION DU CELLOBIOSE.....	7
FIGURE 7 : FORMULES CHIMIQUES DES POLYSACCHARIDES COMPOSANT LES HEMICELLOSES	8
FIGURE 8 : EXEMPLES DE COMPOSES PHENOLIQUES PRESENTS DANS LE BOIS	8
FIGURE 9 : CAROTTE DE BOIS DE ROBINIER	10
FIGURE 10 : TAMISEUSE UTILISEE AU LABORATOIRE.....	10
FIGURE 11 : ETAPE D'EXTRACTION DES COMPOSES SOLUBLES PRESENTS DANS LE BOIS DE ROBINIER.....	12
FIGURE 12 : AUTOCLAVE DE PAILLASSE	13
FIGURE 13 : CREUSET SUR LEQUEL EST DEPOSE LE RESIDU DE LIGNINE "KLASON" APRES LA FILTRATION	13
FIGURE 14 : SPECTROMETRE UV/VISIBLE UTILISE POUR L'ANALYSE DES LIGNINES SOLUBLES	14
FIGURE 15 : RAMPE DE FILTRATION UTILISEE POUR LES DOSAGES DE LIGNINES ET DE CELLULOSES	15
FIGURE 16 : AGITATEUR ORBITAL DE LABORATOIRE	16
FIGURE 17 : CENTRIFUGEUSE REFRIGEREE A 4°C.....	18
FIGURE 18 : SYSTEME D'EVAPORATION SOUS VIDE "SPEED-VAC" (SAVANT, SPEED-VAC SVC100H)	18
FIGURE 19 : PLAQUE DE DOSAGE FOLIN AVEC LA GAMME DE DIHYDROROBINETINE	20
FIGURE 20 : GAMMES D'ETALONNAGES DE LA ROBINETINE ET DE LA DIHYDROROBINETINE REALISEES POUR LE DOSAGE FOLIN.....	20
FIGURE 21 : DROITES DE CALIBRATION DE LA ROBINETINE A 340 NM ET DE LA DIHYDROROBINETINE A 280 NM ANALYSEES EN HPLC.....	22
FIGURE 22 : SPECTRE D'ABSORPTION DE LA DIHYDROROBINETINE A 280 NM.....	23
FIGURE 23 : SPECTRE D'ABSORPTION DE LA ROBINETINE A 340 NM.....	23
FIGURE 24 : CHAINE DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE <i>BECKMAN</i> (HPLC).....	23
FIGURE 25 : FORMULES CHIMIQUES DE LA ROBINETINE ET DE LA DIHYDROROBINETINE	24
FIGURE 26 : FORMULE CHIMIQUE DU 2,2 DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYLE (DPPH).....	24
FIGURE 27 : SPECTROMETRE PROCHE INFRAROUGE (SPIR).....	26
FIGURE 28 : SPECTRES PIR DES ECHANTILLONS DU BOIS DE ROBINIER PRIS SOUS FORME DE POUDRE.....	26
FIGURE 29 : QUANTITE D'EXTRACTIBLES CONTENUS DANS LE BOIS DE ROBINIER.....	27
FIGURE 30 : REPARTITION DES DONNEES (DIAGRAMME EN BOITE A MOUSTACHE) REPRESENTANT LES POURCENTAGES D'EXTRACTIBLES EN FONCTOIN DES DEUX ANNEES DE RECOLTE 2012 ET 2013.	28
FIGURE 31 : QUANTITE DE LIGNINES CONTENUES DANS LE BOIS DE ROBINIER	29
FIGURE 32 : REPARTITION DES DIFFERENTS POURCENTAGES DES LIGNINES DANS LE BOIS DE ROBINIER EN FONCTION DES DEUX ANNEES DE RECOLTE (2012 ET 2013)	30
FIGURE 33 : QUANTITE DE CELLULOSE CONTENUE DANS LE BOIS DE ROBINIER	31

FIGURE 34 : COMPOSITION EN PHENOLS TOTAUX DES ECHANTILLONS DE ROBINIER DOSES PAR LA METHODE AU REACTIF DE FOLIN.	32
FIGURE 35 : CHROMATOGRAMME HPLC TYPE D'UN SOLUTION DE ROBINETINE (ROB) ET DE DIHYDROROBINETINE (DHR)	33
FIGURE 36 : CHROMATOGRAMME HPLC D'UN EXTRAIT PHENOLIQUE DE BOIS DE ROBINIER	34
FIGURE 37 : MODELE DE CALIBRATION SPIR DES EXTRACTIBLES PRESENTS DANS LE BOIS DE ROBINIER EN GARDANT TOUTES LES DONNEES OBTENUES PAR LES DOSAGES.	37
FIGURE 38 : MODELE DE CALIBRATION SPIR DES EXTRACTIBLES PRESENTS DANS LE BOIS DE ROBINIER MODIFIE	37
FIGURE 39 : MODELE DE CALIBRATION SPIR POUR LES LIGNINES SOLUBLES PRESENTENT DANS LE BOIS DE ROBINIER MODIFIE EN LES OUTLIERS.	37
FIGURE 40 : MODELE DE CALIBRATION SPIR POUR LES LIGNINES INSOLUBLES PRESENTENT DANS LE BOIS DE ROBINIER MODIFIE EN ENLEVANT LES OUTLIERS.	38
FIGURE 41 : MODELE DE CALIBRATION SPIR DES LIGNINES TOTALES CONTENUES DANS LE BOIS DE ROBINIER MODIFIE EN ENLEVANT LES OUTLIERS.	38
FIGURE 42 : SUIVI CINETIQUE PAR SPECTROSCOPIE DE LA DECOLORATION DU RADICAL LIBRE DPPH PERMETTANT LA MESURE DE L'EFFICACITE DES ANTIOXYDANTS (MOLECULES ET EXTRAITS).....	40

Table des tableaux

<u>TABLEAU 1</u> : PREPARATION DE LA GAMME D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE FOLIN	19
<u>TABLEAU 2</u> : COMPOSITION DU GRADIENT D'ELUTION UTILISE POUR L'ANALYSE PAR HPLC 21	
<u>TABLEAU 3</u> : COMPOSITION DE LA GAMME DE CALIBRATION EN ROBINETINE ET DIHYDROROBINETINE UTILISEE POUR L'ANALYSE HPLC	22
<u>TABLEAU 4</u> : RESULTATS DE L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE POUR LA DIHYDROROBINETINE ET LA ROBINETINE	34
<u>TABLEAU 5</u> : ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT CONTENANT LA DIHYDROROBINETINE, LA ROBINETINE ET L'ETALON INTERNE (6-METHOXYFLAVONE A 10 ⁻⁴ M).....	35
<u>TABLEAU 6</u> : QUANTITE DES DEUX MOLECULES ROBINETINE ET DIHYDROROBINETINE DANS LE BOIS DE ROBINIER ANALYSEES PAR HPLC (EXPRIMEES EN µG/G DE MAIERE SECHE)	35
<u>TABLEAU 7</u> : PLAN DE PLAQUE POUR LA LECTURE EN CINETIQUE DES ABSORBANCES DES SOLUTIONS (EN QUADRUPLAT) DANS LA PLAQUE A 96 PUIITS UTILISEE POUR LE TEST DES ACTIVITES ANTI-OXYDANTES DES COMPOSES PRESENTS DANS LE BOIS DE ROBINIER	39
<u>TABLEAU 8</u> : ACTIVITE ANTI-OXYDANTE (AAO) DES DIFFERENTES ESPECES ANALYSEES.....	40

Présentation du lieu de stage

1. L'INRA :

L'institut National de la Recherche Agronomique est un organisme créé en 1946 dont les recherches concernent les domaines de l'alimentation, l'agriculture et l'environnement. Il s'agit d'un établissement public à caractère scientifique et technologique qui depuis 1984 est placé sous la tutelle d'une part, du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche puis d'autre part, du ministère de l'agriculture, l'agroalimentaire et de la forêt.

Au niveau mondial, il s'agit de l'acteur majoritaire dans la recherche agronomique étant donné qu'il est classé second pour ses publications en sciences agricoles, des plantes et de l'animal. Au niveau européen, il intervient en tant que premier institut scientifique.

Sur l'ensemble de la France, il comporte 19 centres dont 21 pôles thématiques.

2. Le centre INRA Val de Loire :

Ce centre regroupe les sites de l'INRA présents dans la région Centre parmi lesquels on retrouve les sites de Tours, Bourges et Orléans. Ces derniers mènent des recherches autour de quatre pôles qui sont :

- Biologie intégrative animale et gestion durable des produits animaux, développée dans cinq unités
- Santé animale et santé publique, menées dans deux unités

Les sites de Tours et de Bourges accueillent respectivement ces pôles.

- Dynamique des sols et gestion de l'environnement, thèmes menés dans deux unités
- Biologie intégrative des arbres et organismes associés, pour cinq unités

Ces deux derniers pôles sont présents sur le site d'Orléans (Fig.1).



Figure 1 : Vue aérienne du site d'Orléans

3. L'unité de recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF):

Cette unité fait partie du pôle de recherche « Biologie intégrative des arbres et des organismes associés » permettant le développement de stratégies innovantes de sélection et diffusion du progrès génétique. Elle est impliquée dans l'évaluation et la gestion de la diversité génétique mais également dans l'étude des interactions entre les variétés améliorées et les populations sauvages correspondantes. L'un des thèmes étudiés vise à une meilleure compréhension de l'élaboration du phénotype de l'arbre afin d'identifier les déterminants moléculaires et génétiques des caractères complexes importants pour la production de biomasse et d'étudier les variations du phénotype dans un environnement changeant.

Elle rassemble des compétences en génétique, génomique et physiologie appliquées à l'étude des arbres forestiers. Les recherches réalisées 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. Les programmes d'amélioration génétique sont conduits principalement sur six espèces : le peuplier, le douglas, le mélèze, le pin sylvestre, le frêne et le merisier.

Elle développe également des approches de biologie intégrative afin de mieux comprendre le déterminisme génétique des caractères complexes d'intérêt participant au développement de l'arbre et à son adaptation aux contraintes environnementales. Permettant d'apporter les connaissances nécessaires pour la construction du phénotype un point important pour remplir les objectifs d'amélioration.

Elle intègre également une plateforme technologique régionale nommée « *GénoBois* » qui fédère les activités d'analyse sur le matériau bois et regroupe un ensemble d'appareillages pour évaluer le phénotypage des caractéristiques physico-chimiques du bois. De nombreuses analyses de routine sont réalisées sur le bois d'arbre sur pied ou sur des échantillons prélevés pour répondre aux objectifs des différents domaines suivants :

- Concernant le phénotypage, il s'agit de la mesure sur un grand nombre d'échantillons de leurs propriétés physicochimiques ainsi que la qualité du bois.
- Pour le domaine de la génétique, on observe la diversité génétique des propriétés du bois dans les populations naturelles et d'amélioration.
- Du point de vue environnemental et climatique, on recherche la valorisation des propriétés du bois comme marqueurs adaptatifs ainsi que l'impact d'évènements climatiques.

Les spécificités de « *GénoBois* » résident dans la diversité de ses équipements qui permettent d'une part, de réaliser des prestations de service d'analyse sur le matériau bois pour le compte de tiers et d'autre part, d'être très sollicité par des partenaires français et étrangers.

Mon stage de fin d'année s'est déroulé au sein de cette unité, il est basé sur deux projets régionaux concernant le robinier et la valorisation de ses produits.

Introduction

1. Le Robinier, producteur de biomasse :

Le robinier de son nom latin *Robinia pseudoacacia* est un arbre originaire de la région des Appalaches située en Amérique du Nord ; il a été introduit en Europe mais est considéré comme une espèce invasive.

Il s'agit de la troisième essence feuillue de plantation après le peuplier et l'eucalyptus. Il est très recherché pour ces propriétés puisque c'est une espèce au bois très dur et quasiment imputrescible ; il peut servir à la fabrication de barrique, de menuiserie extérieure, de piquets de vigne ou de clôture. C'est le bois le plus durable de la forêt française (classe 4, équivalent du teck), c'est-à-dire qu'il peut être utilisé en extérieur sans traitement chimique contre les maladies et les insectes. C'est sa propriété la plus remarquable qui fait sa réputation.

Actuellement, les recherches se portent sur la valorisation de son bois pour l'utiliser comme bois d'œuvre et pour la fabrication de meubles de jardin et d'équipements extérieurs c'est aussi un excellent bois de chauffage. De plus, ces fleurs odorantes sont très prisées par le secteur cosmétique pour la parfumerie et la production de miel.

Sa résistance au froid et à la sécheresse permet son implantation sur divers sols. Il a également un pouvoir de fixation de l'azote atmosphérique via ses racines, puisqu'il s'agit d'une espèce légumineuse, il n'est donc pas nécessaire d'utiliser beaucoup d'engrais et peut se satisfaire d'un sol pauvre. Il lutte naturellement contre les champignons et les insectes. Il a aussi la particularité de rejeter de la souche après la coupe (comme le peuplier), ce qui fait de lui un bon candidat pour la production de biomasse forestière.

2. Le projet CARBONEX (Région Champagne-Ardenne) :

CARBONEX est une entreprise familiale créée en 1993 et basée à Gyé-sur-Seine dans la région Champagne-Ardenne. Elle produit environ 10000 tonnes de charbon de bois et 8000 tonnes de briquettes de ce dernier, principalement destinés à leur utilisation lors de la cuisson des barbecues aussi bien chez les particuliers que professionnels.

Depuis 2011, la société a installé une chaudière biomasse de cogénération comportant un four de carbonisation. Cette dernière est alimentée par du bois issus des forêts et des rémanents de la viticulture. Cependant, pour ne pas entacher la diversité de la biomasse combustible et carbonisable, différentes espèces d'arbres ont été évaluées. C'est à la suite de cette étude que le robinier a été sélectionné car il possède le bois le plus dense ce qui est le critère essentiel pour une bonne fabrication de charbon de bois. La densité du bois est donnée principalement par les lignines qui le constituent. Le projet soutenu par la région Champagne-Ardenne prévoit de nombreuses expériences telles que les tests sur les techniques de production, l'impact de l'implantation de cet arbre sur les caractéristiques chimiques et physiques du sol mais aussi une sélection des meilleures provenances tant au niveau croissance que pour la qualité du bois.

Le robinier ne fait pas l'objet d'un programme d'amélioration génétique en France ni en Europe. Les nouvelles plantations font très souvent appel à des provenances de graines non certifiées provenant le plus souvent d'Europe centrale. Dans le projet *Carbonex*, une sélection des meilleurs exemplaires répartis sur toute la France a été effectuée afin d'initier un programme de multiplication clonale et sélectionner les meilleurs individus adaptés à différentes stations environnementales et adaptés à la production soit de bois d'œuvre ou soit de production de biomasse. La plateforme « *GénoBois* » de l'INRA d'Orléans est impliquée dans ce projet dans le cadre des analyses biochimiques des échantillons de robinier récoltés dans une grande partie de la France durant 2012 et 2013 afin de faire une sélection selon les critères de constituants chimiques du bois.

3. *Le projet VALROB (Région Centre) :*

Le projet *ValRob* a été mis en place à partir de 2006-2007, il a pour objectif de valoriser les molécules que l'on peut extraire du bois de robinier plus précisément la robinétine et la dihydrorobinétine. Effectivement, ces molécules sont très intéressantes pour l'industrie cosmétique, la robinétine de par sa fluorescence et sa couleur et la dihydrorobinétine pour ses propriétés anti-oxydantes et antimicrobiennes mais aussi dans d'autres domaines d'activités comme la sylviculture, la pharmacologie et la phytopharmacie.

L'action des propriétés de la dihydrorobinétine ont été testées et prouvées efficaces sur d'autres parasites de plantes, comme des plantes de maraichage et comme la rouille du peuplier ainsi que sur des plantes de grande culture, la vigne par exemple, qui est un domaine qui utilise des quantités importantes de pesticides. Comme les normes sont de plus en plus exigeantes, la recherche essaie de trouver un moyen plus naturel de protéger leur culture.

Les aspects travaillés dans le cadre de ce projet sont également de remplacer le bois des forêts tropicales (le teck par exemple) par du bois des arbres de nos forêts tempérées qui poussent rapidement et qui a toutes les propriétés de durabilité et de résistance aux conditions extérieures et pouvant être implantés dans la région.

Les échantillons traités au cours de ce projet proviennent de la campagne de récolte pour le projet *Carbonex*.

4. *Caractéristique du bois de robinier :*

4.1 *La composition du bois de robinier :*

Le robinier comme tout arbre est constitué d'un tronc recouvert par une écorce, de branches au bout desquelles on retrouve des feuilles ainsi que des racines grâce auxquelles il puise les nutriments dont il a besoin. Les branches et le tronc sont constitués de cinq couches importantes (Fig.2) qui sont :

- L'écorce permettant la protection de l'arbre contre les insectes, les intempéries ou autres.
- L'écorce interne appelée également « liber » qui comporte le phloème qui permet le passage de la sève élaborée dans les feuilles vers les racines.
- Le cambium qui est à la base de la fabrication du bois, il assure la croissance radiale (en épaisseur) de l'arbre.
- L'aubier aide à la circulation de la sève brute du sol jusqu'au feuilles, c'est dans cette partie du bois que se trouve tous les éléments nutritifs tels que l'amidon et les sucres.
- Le duramen appelé aussi « bois de cœur » correspond à la partie la plus dure et résistante de l'arbre. Il possède des antiseptiques naturels comme les tanins et les résines qui le rendent plus résistant aux agressions biologiques.

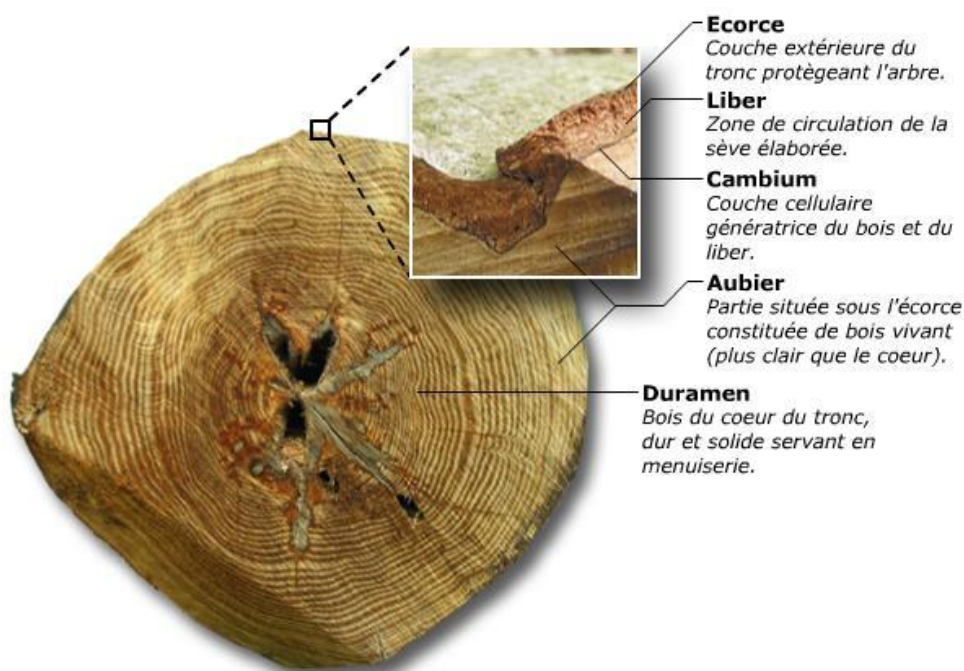


Figure 2 : Section d'un tronc de Robinier

4.2 La composition chimique du bois de Robinier :

Le bois de robinier est constitué d'environ 40% d'eau, 1% de cendres et 59% de principes élémentaires comme l'azote, l'oxygène, l'hydrogène et le carbone. La présence de l'eau permet la formation de la majeure partie de la sève et l'humidification des parois cellulaires.

L'analyse des cendres met en évidence les substances puisées dans le sol par l'arbre qui peuvent être le soufre, le phosphore, le chlore, le silicium, le potassium, le calcium, le magnésium, le fer et le sodium.

Parmi les principes élémentaires, le carbone représente un élément essentiel pour les constituants structuraux essentiels du bois que sont la lignine et la cellulose et aussi l'hémicellulose.

La lignine (Fig.3) est un constituant essentiel du bois car elle est à la base du caractère rigide et durable d'un arbre en se déposant dans la paroi secondaire de certaines cellules végétales. Elle est représentée sous une forme de réseau tridimensionnel composé de l'alcool coumarylique, l'alcool coniféryllique et l'alcool sinapyllique (Fig.4), c'est pourquoi, on parle couramment des lignines. Ces composés sont issus de la biotransformation de la phénylalanine qui est un acide aminé synthétisé par les plantes à partir de la cellulose. De par son caractère hydrophobe, la lignification confère une bonne circulation de la sève au travers de canaux. Néanmoins, il existe aussi des lignines solubles. Les lignines possèdent un important pouvoir calorifique, c'est pour cela qu'elles sont très recherchées dans le bois de chauffage.

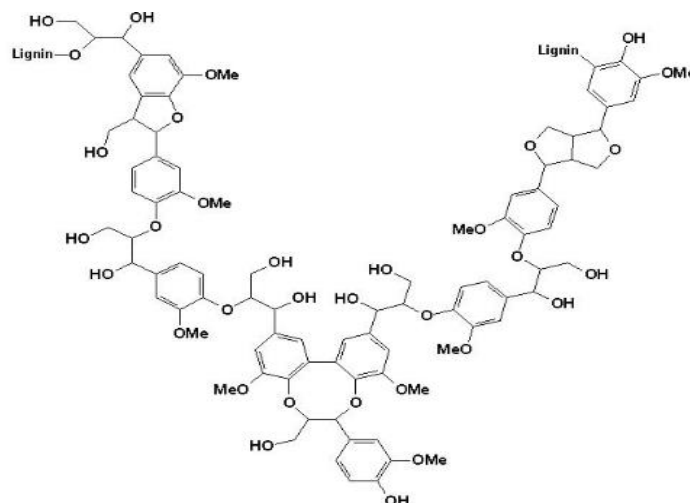


Figure 3 : Représentation possible de la structure de la lignine

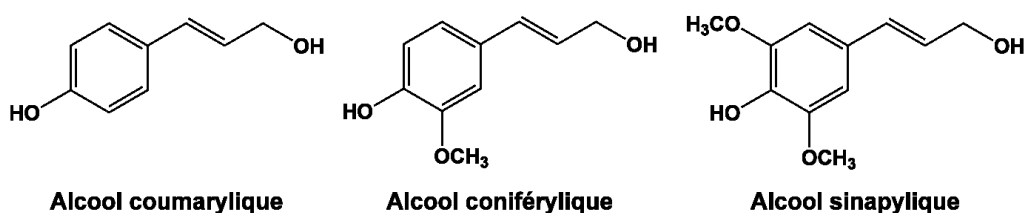


Figure 4 : Formules chimiques des trois monomères formant les chaînes de lignine

La cellulose est le principal constituant des végétaux, il s'agit également de la matière organique la plus abondante sur Terre. Elle constitue la majorité des parois cellulaires végétales. Elle est constituée de plusieurs monomères de glucose liés les uns aux autres par des liaisons β 1-4 conduisant ainsi à une représentation de polymères linéaires (Fig.5). Ces polymères sont assemblés par des liaisons de type hydrogène ce qui donne la structure fibreuse à la cellulose. Le motif de répétition est le dimère cellobiose (Fig.6), dont le degré de polymérisation varie énormément en fonction de l'espèce végétale.

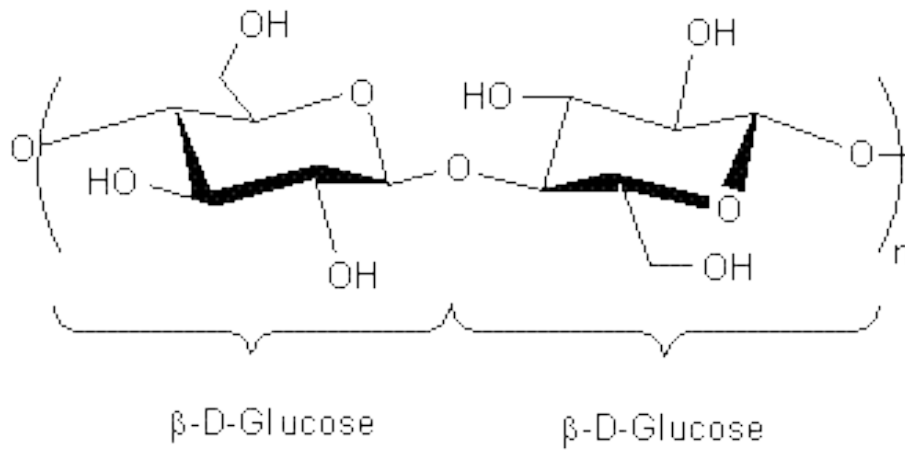


Figure 5 : Monomère de la cellulose

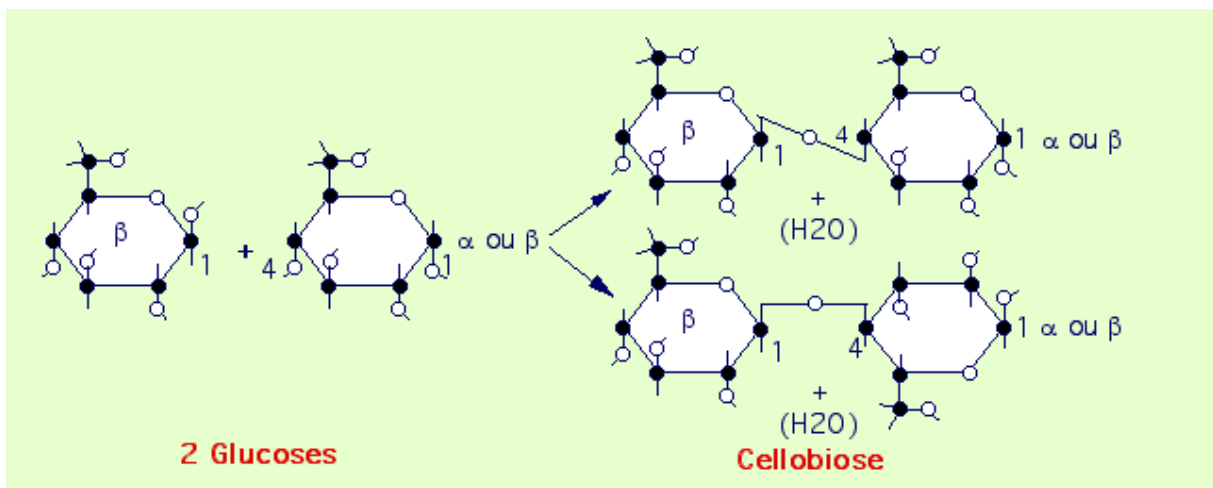


Figure 6 : Formation du cellobiose

Les hémicelluloses sont des polymères amorphes ramifiés constitués de polysaccharides correspondant à différents résidus de sucres. Les principaux polysaccharides qui les composent sont des pentoses, hexoses, acides hexuroniques et déoxy-hexoses dont les formules chimiques sont données ci-après (Fig.7). Avec la cellulose, elles constituent la paroi cellulaire chez les végétaux.

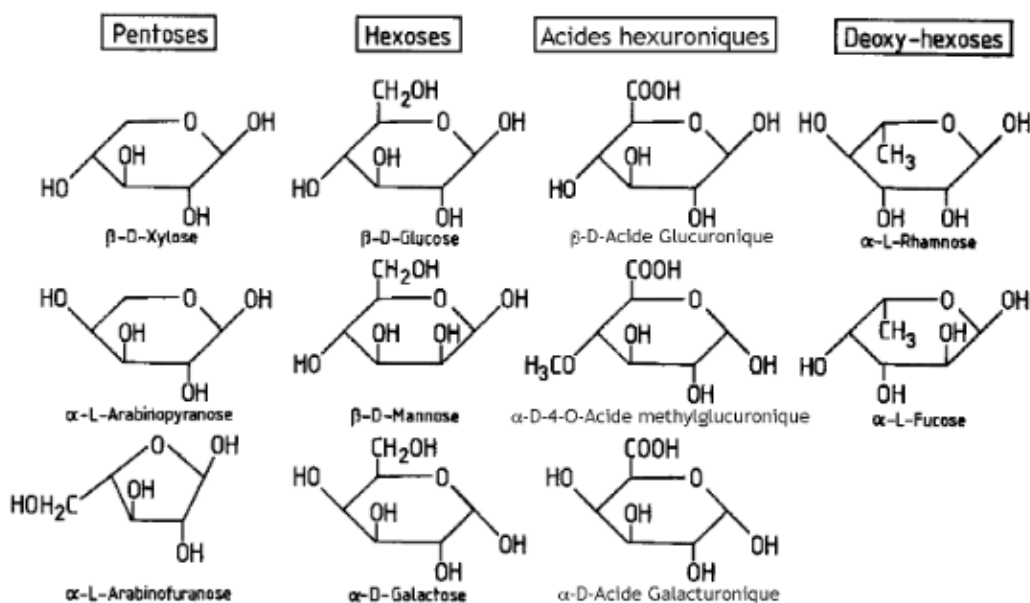


Figure 7 : Formules chimiques des polysaccharides composant les hémicelluloses

Les composés phénoliques fréquemment appelés polyphénols (Fig.8), interviennent dans différents aspects de la vie d'un végétal ainsi que dans l'utilisation de ce dernier par les hommes. En effet, ils interviennent dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification), dans les interactions des plantes avec l'environnement (résistance aux UV et aux maladies), et même dans les critères de qualités tels que la couleur, la durabilité naturelle du bois et aussi l'amertume des fruits.

Il s'agit de molécules organiques comportant plusieurs groupements phénoliques associés en structure plus ou moins complexes. Ils possèdent des propriétés anti-oxydantes naturelles qui suscitent fortement leur étude. De plus, il s'agit des principaux extractibles présents dans le bois. Ils jouent un rôle important dans le phénomène de pédogenèse qui correspond à tous les processus aboutissant à la formation, la transformation et la différenciation des sols.



Figure 8 : Exemples de composés phénoliques présents dans le bois

5. Les objectifs du stage :

Au cours de ce stage, les objectifs qui m'ont été assignés se sont répartis en différentes tâches effectuées qui sont :

- Prendre en charge un échantillonnage de bois de robinier sélectionnés dans la partie sud de la France dans le cadre du projet *Carbonex*.
- Evaluer les teneurs en extractibles, lignines et cellulose sur cet échantillonnage pour avoir une approche de la répartition de ces paramètres au sein d'une population de robinier. Comparer les résultats avec ceux obtenus précédemment sur un échantillonnage du nord de La France
- Evaluer le contenu en composés phénoliques et en molécules de robinétine (ROB) et dihydrorobinétine (DHR) dans les extraits de bois pour avoir une approche de la répartition de ces paramètres au sein d'une population de robinier.
- Tester l'activité antioxydante des extraits de robinier et des molécules.

Pour mener à bien ces travaux et présenter les résultats ci-dessous, j'ai dû effectuer personnellement des analyses sur 89 échantillons principalement de la récolte de 2013 mais aussi de la récolte 2012 avec 2 répétitions qui se répartissent en :

- 168 extractions
- 168 dosages lignines
- 54 dosages cellulose (holo et alpha)
- 24 extractions des composés phénoliques
- 24 échantillons passés en HPLC
- 5 plaques pour tester les activités anti-oxydantes

Dans ce mémoire, j'utiliserai et présenterai aussi des résultats obtenus précédemment sur la récolte 2012 par d'autres opérateurs afin de comparaison.

Partie expérimentale

Au cours de ce stage, dans un premier temps, les dosages des extractibles, lignines et celluloses ont été réalisés sur les différents échantillons de bois de robinier sélectionnés dans le cadre du projet *Carbonex*.

Puis, dans un second temps, le dosage des composés phénoliques a été réalisé par un dosage quantitatif colorimétrique avec le réactif de Folin puis par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) pour ce qui concerne principalement le projet *ValRob* pour l'analyse des molécules.

1. Matériel végétal :

Les échantillons ont été récoltés dans différentes régions de France au cours des années 2012 et 2013 (Annexe 1). L'échantillonnage de 2012 correspond principalement à des arbres présents dans les régions du nord de la France alors que celui de 2013 représente ceux présents dans les régions du sud de la France. Sur les sites de prélèvement, généralement trois arbres sont choisis dans lesquels trois à quatre carottes sont prélevées (Fig.9). Entre les deux années, les prélèvements n'ont pas été effectués par les mêmes personnes.

Dans le cadre du projet *Carbonex*, les échantillons ont été prélevés dans des propriétés privées donc les carottes ont été faites au pied de l'arbre et non au milieu pour éviter toutes perturbations possibles pour la commercialisation des arbres.

2. Dosages des constituants structuraux du bois :

Avant toutes les étapes analytiques, les échantillons ont subi un pré-traitement. Ils sont arrivés sous forme de carotte, ces dernières ont subi un broyage pour obtenir une poudre fine. Puis, une étape de tamisage (Fig.10) a été réalisée avec des tamis de 25, 50 et 100 μm , la poudre inférieure à 25 μm sera utilisée pour les extractions, les analyses en chromatographie liquide haute performance (HPLC) et spectrométrie proche infrarouge (SPIR). Alors que la poudre supérieure à 25 μm jusqu'à 100 μm sera utilisée pour tous les dosages chimiques tels que les lignines, cellulose et extractibles.



Figure 9 : Carotte de bois de robinier



Figure 10 : Tamiseuse utilisée au laboratoire

2.1 Processus d'extraction permettant la préparation du résidu pariétal :

Cette étape analytique a pour but d'extraire les composés solubles présents dans la poudre de bois de robinier qui interféreront par la suite lors des dosages des lignines et cellulose. Pour se faire, la poudre de bois va subir plusieurs extractions à chaud successives par de l'éthanol 96 % et de l'eau. Le solvant organique sert à éliminer les acides phénoliques simples et polyphénols alors que le solvant aqueux permet l'élimination des composés hydrosolubles tels que les protéines et les tanins.

2.1.1 Matériels et produits utilisés :

- ⇒ Ethanol 96 % (ref 20823.362 VWR, USA)
- ⇒ Eau osmosée prise au robinet
- ⇒ Sachets thermo-soudables ANKOM F57 (USA) qui ont une porosité de 25 μm
- ⇒ Balance Sauter (Allemagne) après étalonnage par les masses étalons
- ⇒ Refroidisseurs Minichiller (Huber, Allemagne) remplis de liquide de refroidissement programmé à -10°C , reliés aux refroidisseurs en verre.
- ⇒ Plaques chauffantes
- ⇒ Soude-sac
- ⇒ Fioles à vide de 1 L en verre
- ⇒ Agitateurs magnétiques
- ⇒ Dessiccateurs en verre contenant du Silicagel
- ⇒ Bouilloires de 1 L

2.1.2 Protocole de la manipulation :

Dans un premier temps, tous les échantillons sont mis en sachets poreux thermosoudables contenant environ précisément 0,9 g de poudre. Ces sachets sont ensuite soudés à l'aide d'un soude sac. La préparation de deux sachets par échantillon a été privilégiée, quand l'échantillon possède assez de matière, afin de pouvoir étudier la répétabilité. Puis, ils sont placés au four toute une nuit à 105°C puis pesés après refroidissement sous dessiccateur.

Dans un second temps, huit sachets d'échantillons sont placés dans un erlenmeyer de deux litres ainsi qu'un agitateur magnétique et un litre d'éthanol à 96 %. L'erlenmeyer est placé sur une plaque chauffante et surmonté d'un réfrigérant. Quand l'éthanol commence à bouillir, on laisse 30 minutes avec agitation afin d'éliminer le maximum de composés phénoliques (Fig.11). Ensuite, on vide l'éthanol pour le remplacer par un litre d'eau permettant ainsi l'extraction des composés plus polaires. Ces étapes sont répétées successivement deux fois pour l'éthanol et une fois pour l'eau en alternant les bains organiques et aqueux. Ces changements de bain sont réalisés jusqu'à ce que ces derniers soient clairs signifiant ainsi que tout est extrait.

Dans un troisième temps, les sachets sont récupérés et placés au four pendant toute une nuit à 105°C puis pesés après refroidissement sous dessiccateur. Les poudres extraites sèches sont conservées bien au sec jusqu'aux dosages.



Figure 11 : Etape d'extraction des composés solubles présents dans le bois de robinier

2.2 Dosage des lignines insolubles dites « Klason » et lignines solubles dans le bois de Robinier :

Cette expérimentation permet la dégradation de la cellulose toujours contenue dans la poudre de bois pour ensuite ne doser que les lignines.

2.2.1 Matériels et produits utilisés :

- ⇒ Acide sulfurique à 72 % (ref MC3128922500 VWR, USA)
- ⇒ Acide sulfurique à 3 %
- ⇒ Eau osmosée prise au robinet
- ⇒ Balance Mettler PG503-SBR
- ⇒ Balance Sartorius Cubis (ref MSA 324 SOTRDU 01)
- ⇒ Distributeur Safety 1-5 mL utilisé pour l'acide sulfurique
- ⇒ Bouteilles Schott de 250 mL
- ⇒ Billes en verre
- ⇒ Pompe à vide
- ⇒ Autoclave de pailleasse
- ⇒ Fiole à vide de 1 L
- ⇒ Creusets filtrant 75 mL de porosité 3
- ⇒ Becher de 50 mL
- ⇒ Scellofrais

2.2.2 Protocole de la manipulation :

Premièrement, environ précisément 0,2000 g de poudre de bois précédemment extraite sont placées dans des bouteilles en verre de 250 mL, au fond desquelles sont ajoutées deux billes en verre afin d'améliorer l'agitation. Huit échantillons sont traités à la fois pour chaque série de dosage.

Ensuite, 5 mL d'acide sulfurique à 72 % sont ajoutés dans chacune des bouteilles contenant les échantillons pour permettre la meilleure hydrolyse possible de la poudre. Les bouteilles sont placées sur un agitateur orbital et on laisse agiter à température ambiante pendant deux heures. Une fois ce temps d'attaque terminé, de l'eau est ajoutée dans les bouteilles afin de réaliser une hydrolyse à l'acide sulfurique à 3 %. Cette dilution de l'acide sulfurique est effectuée pour pouvoir passer les bouteilles à l'autoclavage (Fig.12).

Puis, les bouteilles sont refermées et entourées par du film « scellofrais » avant d'être placées dans un autoclave pendant une heure à 120°C. Ce passage permet d'éclater le plus possible les cellules qui ne l'ont pas été au cours de la précédente étape afin de sortir toutes les lignines des cellules. Le contenu de chaque bouteille est filtré sur un verre fritté (Fig.13), le premier filtrat est récupéré dans des béchers de 50 mL et plusieurs lavages à l'eau sont effectués pour éliminer la cellulose qui serait encore retenue dans les fibres de bois. Puis, les frittés sont mis au four à 105°C toute la nuit et sont pesés le lendemain.

En parallèle, une dilution au 10^e du filtrat récupéré est réalisée ainsi pour chaque échantillon, 2 mL de ce filtrat sont prélevés et mis dans un bécher de 25 mL auxquels sont rajoutés 18 mL d'eau avant analyse par spectrométrie ultra-violet à 205 nm (Fig.14). Cette étape permet de déterminer la densité optique des lignines solubles. Trois mesures d'absorbance successives sont réalisées pour chaque échantillon pour observer la répétabilité des analyses.



Figure 12 : Autoclave de pailleasse



Figure 13 : Creuset sur lequel est déposé le résidu de lignine "Klason" après la filtration



Figure 14 : Spectromètre UV/Visible utilisé pour l'analyse des lignines solubles

2.3 Dosage de la cellulose :

Après la dégradation des lignines présentes dans les divers échantillons, les dosages des deux constituants de l'holocellulose (cellulose et hémicellulose) sont effectués.

2.3.1 Matériels et produits utilisés :

- ⇒ Solution de chlorite de sodium à 27 %
- ⇒ Solution tampon acétate (NaOH + eau + acide acétique glacial)
- ⇒ Solution d'acétone
- ⇒ Plaque chauffante
- ⇒ Agitateurs magnétiques
- ⇒ Bouteille Shoot de 250 mL
- ⇒ Balance Sauter après étalonnage par les masses étalons
- ⇒ Fioles à vide de 1 L en verre
- ⇒ Creusets filtre de porosité 3
- ⇒ Pompe à vide
- ⇒ Pipette automatique de 5 mL
- ⇒ Eprouvette graduée de 20 mL

2.3.2 Protocole de la manipulation :

Dans des bouteilles Shoot de 250 mL en verre est placé environ précisément 1 g de poudre extraite. Ensuite, 80 mL de la solution de tampon acétate sont ajoutés dans les bouteilles ainsi que 2 mL de solution de chlorite de sodium. Elles sont placées au bain marie à 78°C sur la plaque magnétique chauffante. Toutes les heures et pendant une durée totale de 4 heures sont ajoutés 2 mL de chlorite de sodium. Une décoloration de la pâte contenue dans les bouteilles est observée, elle correspond à la dégradation subie par la lignine au cours de l'expérience.

Une fois la délignification totale effectuée, la rampe de filtration (Fig.15) est alors installée afin de pouvoir filtrer le contenu des bouteilles. La pâte d'holocellulose obtenue sur les creusets est lavée par 500 mL d'eau *milliQ* jusqu'à une décoloration complète, si la pâte est jaunâtre au départ, elle deviendra blanche après ce lavage. Un deuxième lavage est effectué en ajoutant deux fois 15 mL d'acétone pour être sûre d'avoir éliminé toutes les lignines qui auraient pu rester dans la pâte.

Puis les creusets sont mis au four à 105 °C pendant toute la nuit et sont pesés le lendemain.



Figure 15 : Rampe de filtration utilisée pour les dosages de lignines et de celluloses

2.4 Dosage de l' α -cellulose :

Une fois l'holocellulose dosée et récupérée, l'hémicellulose est alors dégradée permettant ainsi le dosage de l' α -cellulose résiduelle.

2.4.1 Matériels et produits utilisés :

- ⇒ Solution de NaOH à 17,5 %
- ⇒ Solution de NaOH à 8,3 %
- ⇒ Solution d'acide acétique à 10 %
- ⇒ Agitateur orbital
- ⇒ Bouteille Schoot de 100 mL
- ⇒ Bille en verre
- ⇒ Creusets filtre de porosité 3
- ⇒ Pompe à vide
- ⇒ Fiole à vide
- ⇒ Pipette automatique de 5 mL
- ⇒ Pipette automatique de 10 mL
- ⇒ Papier pH

2.4.2 *Protocole de la manipulation :*

Dans un premier temps, pour chaque échantillon, environ précisément 800 mg de poudre sèche d'holocellulose sont mis dans des bouteilles de 100 mL contenant 2 billes en verre. Elles sont placées sur un agitateur orbital (Fig.16) à température ambiante, 5 mL de solution de NaOH 17,5 % y sont ajoutés et l'agitation se fait pendant 5 minutes. Une fois ce temps d'attente fini, on réalise la même opération deux fois avec 2,5 mL de solution cette fois mais avec un temps d'attente de 5 minutes. Puis, on rajoute une troisième fois 2,5 mL de solution et l'agitation dure pendant 30 minutes cette fois.

Dans un second temps, 16,5 mL d'eau osmosée sont versées dans les bouteilles, on remet quelque instant sous agitation afin d'homogénéiser au maximum le contenu des bouteilles que l'on filtre ensuite via les creusets. Sur ces derniers sont présents les résidus α -cellulosiques qui sont lavés avec 50 mL de solution NaOH 8,3 %. Les lavages aux différentes concentrations de soude permettent de rompre les liaisons hémicellulosiques afin de garder seulement l' α -cellulose résiduelle.

Puis, les résidus sont lavés avec de l'eau osmosée et par 7,5 mL d'acide acétique 10 %. Ensuite, le pH du résidu est alors vérifié à l'aide de papier pH, si ce paramètre n'est pas neutre alors une nouvelle étape de lavage à l'eau est réalisée.

Tous ces lavages sont effectués pour être sûre d'éliminer toute l'hémicellulose résiduelle présente dans la poudre à doser et au final se retrouver comptabilisée avec la partie α -cellulose. Quand la filtration est terminée, les creusets contenant les résidus sont placés dans le four à 105°C pendant toute la nuit et pesés le lendemain.



Figure 16 : Agitateur orbital de laboratoire

3. Les composants extractibles du bois :

Les molécules libres présentes dans la structure poreuse du bois sont appelées extractibles car ils peuvent être extraits par de nombreux solvants. Les taux d'extractibles varient en fonction des espèces, du site géographique, de la saison, de l'âge des arbres. Les extractibles sont des composés très importants dans la structure du bois puisqu'ils lui confèrent ses caractéristiques particulières telles que sa couleur, son odeur, sa durabilité naturelle, ses propriétés chimiques, mécaniques et esthétiques. Différentes familles de composés chimiques font parties des extractibles, on retrouve par exemple, les glucides, les lipides, les terpènes, les composés phénoliques, les plus importants en quantité.

Par la suite, seuls les composés phénoliques nous intéresseront.

3.1 Extraction des composés phénoliques :

Les composés phénoliques présents dans le bois de robinier possèdent entre autres des propriétés anti-oxydantes qui sont très intéressantes. Afin d'analyser ces derniers, il a fallu les extraire des échantillons de bois.

3.1.1 Matériels et produits utilisés :

- ⇒ Solvant acétone 80% avec 6-méthoxyflavone à 10^{-4} M
- ⇒ Méthanol
- ⇒ Centrifugeuse réfrigérée à 4°C 1-15K (Sigma, Allemagne)
- ⇒ Evaporateur rotatif sous vide Speed-Vac Savant (Thermo, Finlande)
- ⇒ Eppendorf de 2 mL
- ⇒ Bain à ultrasons
- ⇒ Agitateur orbital

3.1.2 Protocole de la manipulation :

La poudre de bois utilisée à une granulométrie inférieure à 25 μ m, 50 mg environ précisément de chaque échantillon sont placés dans des tubes *Eppendorf* de 2 mL. Ensuite, on ajoute 1,8 mL de solvant acétone 80% contenant 6-méthoxyflavone à 10^{-4} M (l'étalon interne). Les tubes sont placés aux ultra-sons pendant 1h puis sous agitation durant 1h également. Puis, ils sont placés 15 minutes à la centrifugeuse réfrigérée à 4°C (Fig.17) et quand on les sort, le surnageant contenant les polyphénols est récupéré dans des tubes de 5 mL. Une deuxième extraction identique est réalisée sur le culot afin de récupérer le maximum de composés phénoliques.

La préparation des échantillons se fait en chambre froide à une température de 4°C pour empêcher l'action des polyphénoloxydases qui pourraient dégrader les composés phénoliques.

Une fois cette étape terminée, les surnageants sont rassemblés et 500 μ L sont mis dans des tubes *Eppendorf* et évaporés à sec en utilisant le *Speed-Vac* (Fig.18). Pour les deux manipulations suivantes, les échantillons sont alors repris dans 250 μ L de méthanol pur.



Figure 17 : Centrifugeuse réfrigérée à 4°C



Figure 18 : Système d'évaporation sous vide "Speed-Vac" (Savant, Speed-Vac SVC100H)

3.2 Dosage quantitatif des composés phénoliques par la méthode au réactif de Folin :

Il s'agit d'une méthode de quantification des composés phénoliques. Elle est très répandue pour caractériser certaines catégories de molécules de différents extraits végétaux. Les deux objectifs de cette méthode mise au point au laboratoire sont d'une part, de traiter un grand nombre d'échantillons à partir de peu de matière végétale et d'autre part, d'être utilisable à tout type de tissus de l'arbre.

Le principe de ce dosage est basé sur la réduction du réactif de *Folin-Ciocalteu* (mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$)) lors de l'oxydation des phénols présents dans les échantillons. Cette réduction permet l'obtention d'un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, plus ou moins foncés. La coloration ainsi obtenue est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux étudiés [1].

Les résultats sont relatifs et exprimés par rapport à une molécule de référence. En général, l'acide gallique est couramment utilisé mais on peut choisir une molécule plus représentative de l'extrait de l'espèce étudiée dans notre cas soit la robinétine, soit la dihydrorobinétine.

3.2.1 Matériels et produits utilisés :

- ⇒ Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois
- ⇒ Solution de carbonate de sodium à 75 g/L
- ⇒ Solution de robinétine à 0.2 mg/mL
- ⇒ Solution de dihydrorobinétine à 0.2 mg/mL
- ⇒ Méthanol
- ⇒ Plaque à 96 puits
- ⇒ Tubes Eppendorf
- ⇒ Pipettes automatiques
- ⇒ Spectromètre Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation, Finlande)

Les solutions de robinétine et dihydrorobinétine sont préparées à partir de poudre pure (Extrasynthèse, France) des composés standards du commerce dans du méthanol.

3.2.2 Protocole de la manipulation :

Dans un premier temps, une gamme d'étalonnage de robinétine et de dihydrorobinétine sont réalisées dans des tubes Eppendorf selon la composition suivante :

Tableau 1 : Préparation de la gamme d'étalonnage pour le dosage Folin

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Volume de robinétine ou dihydrorobinétine à 0,2 mg/mL	Volume d'eau <i>milliQ</i> (μL)
0	0	100
1	5	95
2	10	90
4	20	80
8	40	60
12	60	40
15	75	25
20	100	0

Les solutions de ces points de gamme sont placées dans la première colonne de la plaque 96 puits. Dans les autres puits, nos échantillons sont placés avec trois répétitions par échantillon, cette méthode permet d'analyser 23 échantillons à la fois.

Les échantillons sont préparés à partir des extraits repris dans le méthanol. A l'intérieur des tubes Eppendorf sont déposés 100 μL d'extraits que l'on va diluer plus ou moins selon leur couleur. En effet, pour les échantillons ayant une couleur d'extrait prononcée une dilution au vingtième sera effectuée. Concernant les échantillons possédant une coloration plutôt pale, une dilution par 10 sera réalisée.

Une fois les dilutions et les dépôts sur la plaque à 96 puits effectués, cette dernière est passée au spectromètre UV/Visible pour une lecture à la longueur d'onde de 735 nm permettant d'obtenir les résultats liés au dosage colorimétrique (Fig.19).

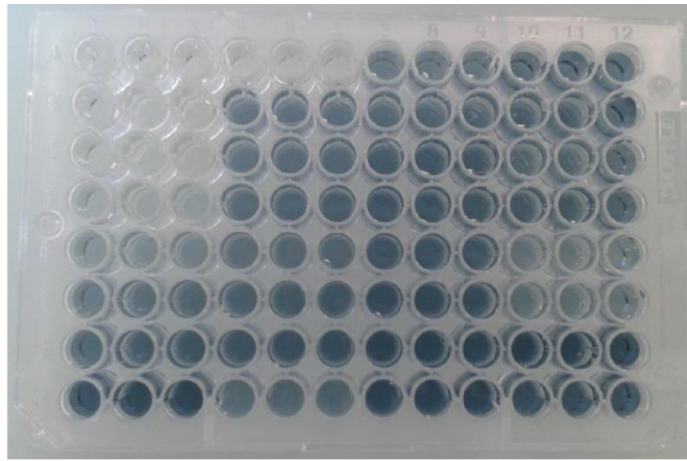


Figure 19 : Plaque de dosage Folin avec la gamme de dihydroquercétine. Les trois premières colonnes correspondent à la gamme d'étalonnage de la dihydroquercétine dont les concentrations vont de 0 à 20 $\mu\text{g/mL}$, les autres colonnes correspondent aux extraits de bois de robinier. La coloration bleue plus ou moins intense est proportionnelle à la quantité de polyphénols dans l'extrait.

Les gammes de quercétine et de dihydroquercétine obtenues suite à l'analyse spectroscopique sont indiquées ci-dessous (Fig.20) :

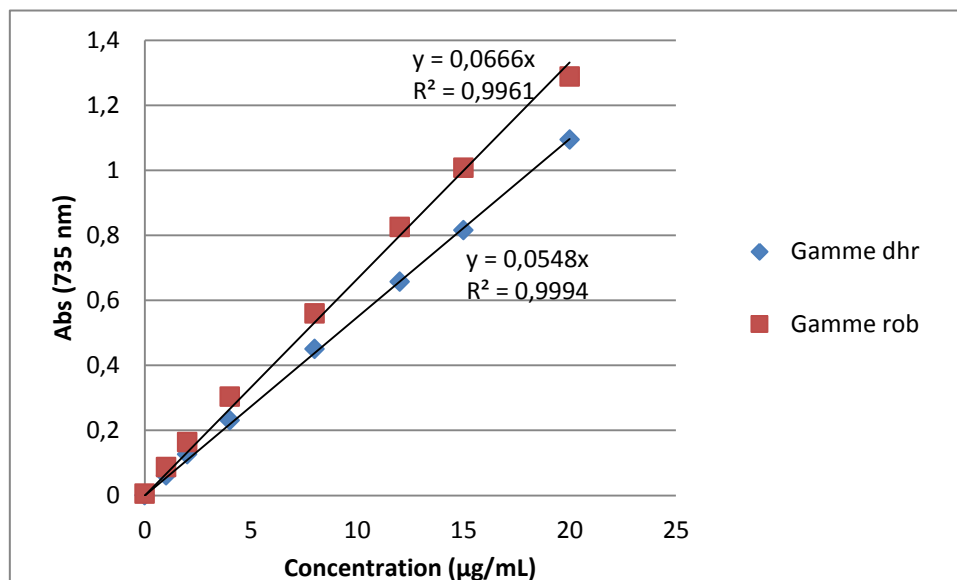


Figure 20 : Gammes d'étalonnages de la quercétine (en rouge) et de la dihydroquercétine (en bleue) réalisées pour le dosage Folin

Suite aux résultats obtenus, les droites représentatives des gammes étalons possèdent un coefficient R^2 tout à fait correct. Celui de la gamme d'étalonnage de dihydroquercétine légèrement supérieur à celui de la gamme de quercétine. On constate également, la différence de pente entre les droites des deux composés, celle de la quercétine est supérieure. Donc pour une même concentration, la quercétine et la dihydroquercétine n'ont pas la même absorbance, ce qui est surtout visible pour les grandes concentrations.

3.3 Dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC):

La chromatographie liquide haute performance est une technique analytique basée sur la séparation des composés non volatils d'un mélange liquide. La séparation se fait en fonction de l'affinité des analytes ciblés pour la phase mobile ou 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.

3.3.1 Matériels et produits utilisés:

- ⇒ Chaîne chromatographique HPLC System Gold (Beckman, USA) comprenant un système de pompe, Détecteur DAD System Gold 168, un passeur d'échantillon et une boucle d'injection de 100 µL
- ⇒ Volume d'injection dans la boucle de 15 µL
- ⇒ Aiguille de 200 µL
- ⇒ Four colonne
- ⇒ Régulateur de température au niveau du support pour les vials
- ⇒ Phase stationnaire utilisée : colonne chromatographique Lichrosphère 100 RP 18e (5µm)
- ⇒ Phase mobile utilisée : eau/acide acétique (1%) et MeOH/ACN (50/50 v/v)
- ⇒ Débit de 1 mL/min

3.3.2 Protocole de la manipulation:

La séparation se fait en mode gradient d'éluion et non en mode isocratique permettant ainsi l'éluion des analytes très retenus. La composition du gradient d'éluion utilisé pour l'analyse des composés phénoliques est indiquée ci-après.

Tableau 2 : Composition du gradient d'éluion utilisé pour l'analyse par HPLC. (MeOH : méthanol et ACN : acétonitrile)

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

Les échantillons, par quantité de 80 µL, sont placés tout d'abord dans des inserts qui eux sont mis dans des vials en verre. Puis, ils sont déposés dans le rack réfrigéré à 4°C avant analyse chromatographique. Le volume injecté dans la colonne est toujours 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. Tous les points étalons sont analysés en triplicat permettant ainsi la mise en évidence de la répétabilité de l'analyse, un volume de 300 µL est donc préparé.

Tableau 3 : Composition de la gamme de calibration en robinétine et dihydrorobinétine utilisée pour l'analyse 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

Les résultats obtenus permettent la construction des droites de calibration ci-dessous (Fig.21), les points roses correspondent à la gamme de calibration de la robinétine détectée à 340 nm et les points bleus à celle de la dihydrorobinétine détectée à 280 nm. Elles seront utilisées comme étalonnage externe pour le dosage des deux molécules dans les extraits analysés en HPLC (Fig.24).

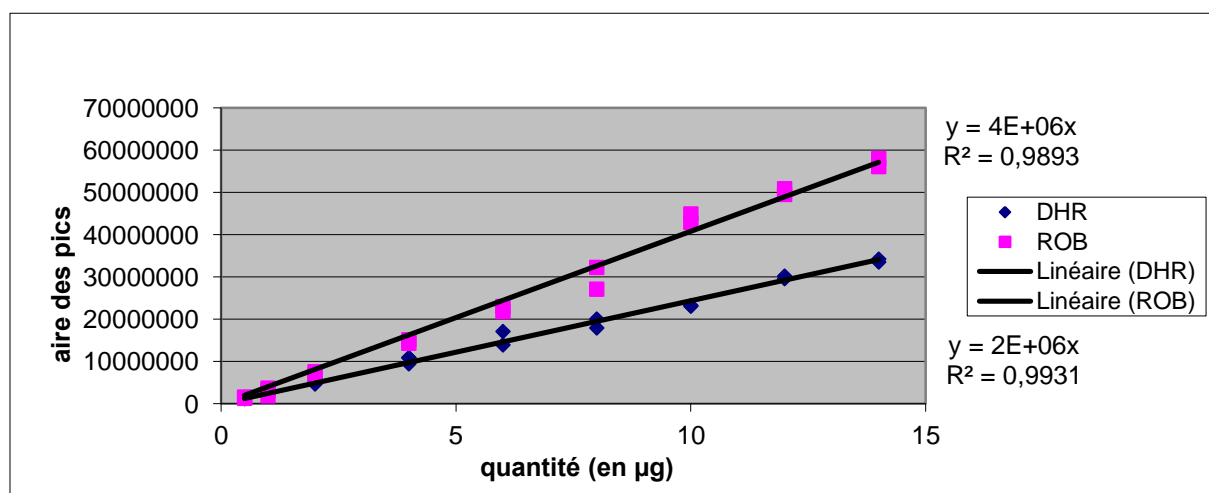


Figure 21 : Droites de calibration de la robinétine à 340 nm et de la dihydrorobinétine à 280 nm analysées en HPLC

Les spectres d'absorption des deux molécules sont présentés ci-dessous (Fig.22 et Fig.23).

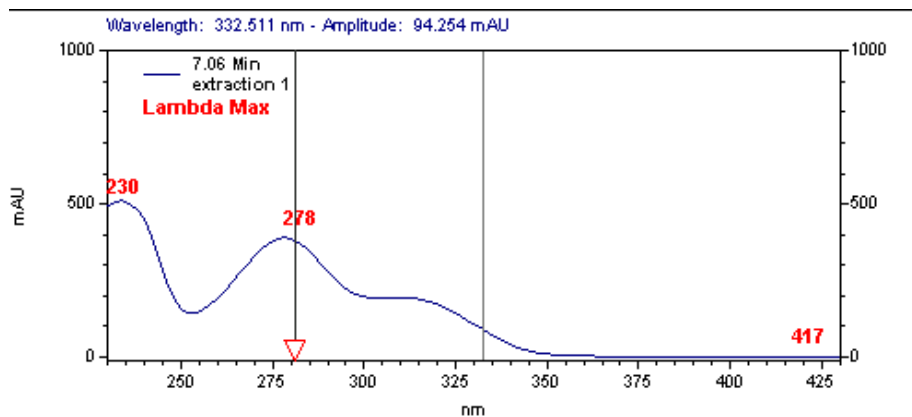


Figure 22 : Spectre d'absorption de la dihydrorobinétine entre 240 et 360 nm

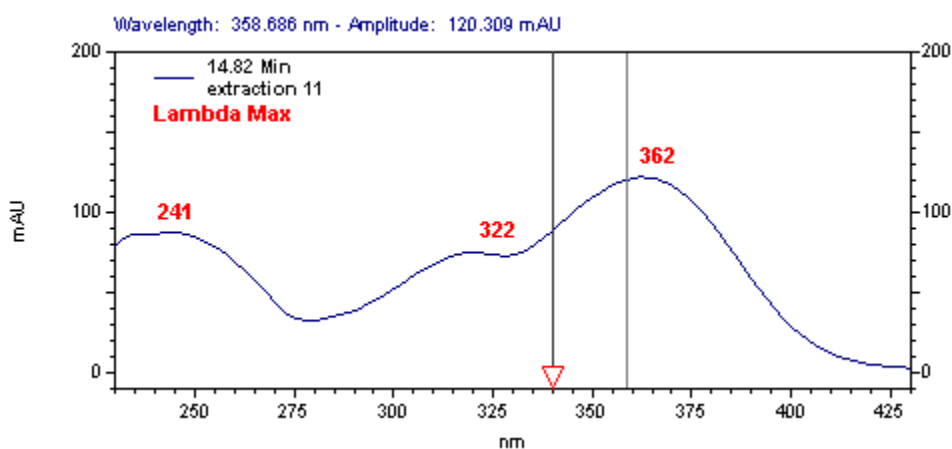


Figure 23 : Spectre d'absorption de la robinétine entre 240 et 360 nm

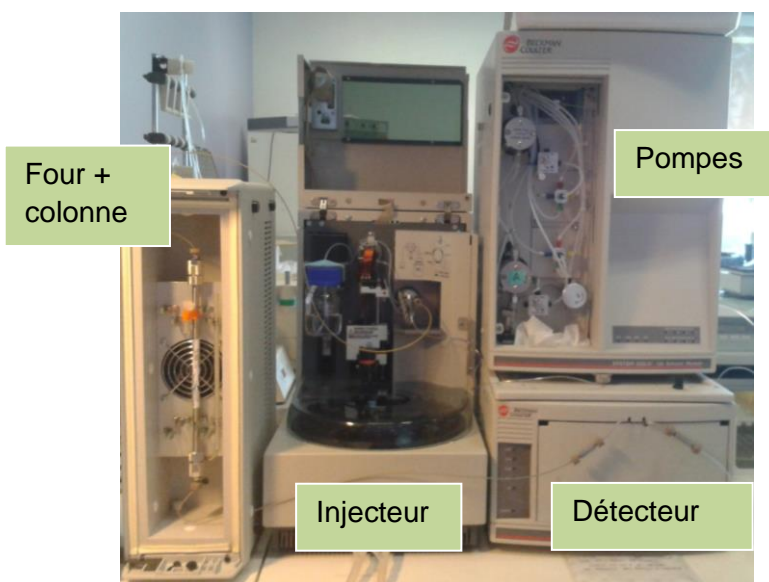


Figure 24 : Chaîne de Chromatographie Liquide Haute Performance *Beckman* (HPLC)

3.4 Les propriétés des molécules extraites du bois :

Les deux molécules principalement ciblées dans le bois de robinier pour leurs propriétés sont la robinétine (ROB) et la dihydrorobinétine (DHR) dont les formules chimiques sont données ci-après (Fig. 25).

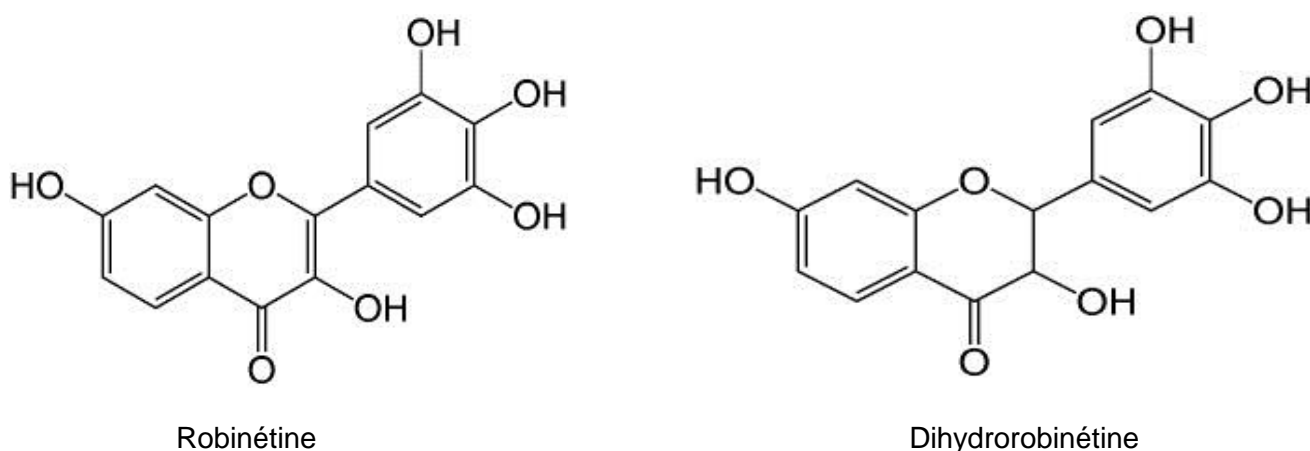


Figure 25 : Formules chimiques de la robinétine et de la dihydrorobinétine

Effectivement, de par ses nombreux groupements chromophores et la rigidité de sa structure, la robinétine est une molécule fluorescente naturellement présente dans le bois de robinier. Elle est principalement intéressante pour le domaine cosmétique.

Alors que l'intérêt de la dihydrorobinétine concerne exclusivement ses propriétés anti-oxydantes et antimicrobiennes qui peuvent être un atout dans la sylviculture, l'industrie pharmaceutique ou encore l'industrie cosmétique.

C'est pourquoi ces molécules sont dosées par chromatographie liquide haute performance afin de déterminer leur teneur dans les différents échantillons du projet *Carbonex*. Ce qui permet de mettre en évidence, l'influence ou non, des conditions géographiques et pédoclimatiques sur la composition des arbres.

Un test est réalisé afin d'évaluer l'activité anti-oxydante des composés présents dans le bois de robinier. Pour se faire le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) (Fig.26) est utilisé, il s'agit d'un radical libre couramment utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Pour les composés phénoliques dont la structure de base est Φ -OH, le mécanisme d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome d'hydrogène (H) sur le DPPH $^{\bullet}$ alors transformé en une molécule stable DPPHH, selon la réaction chimique suivante.

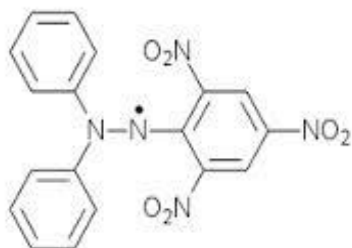
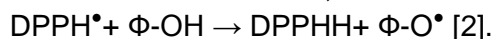


Figure 26 : Formule chimique du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

L'activité anti-oxydante se calcule à l'aide de la formule suivante :

$$AAO (\%) = \frac{(A_0 - A_i)}{A_0} \times 100$$

Avec :

AAO : Activité anti-oxydante exprimée en pourcentage

A₀ : Absorbance du blanc à un temps t donné

A_i : Absorbance de l'échantillon à un temps t donné

4. Les analyses des échantillons par Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) :

La spectrométrie proche infrarouge (Fig.27) a été découverte en 1964 par un chercheur américain qui essayait de mesurer les constituants présents dans les fruits, elle est très utilisée dans les domaines de l'agriculture et de l'agro-alimentaire.

Il s'agit d'une technique analytique basée sur le phénomène d'absorption des rayonnements infrarouge de la matière organique représentée par le bois de robinier dans notre étude. Il s'agit d'une spectroscopie vibrationnelle permettant de mesurer les vibrations de chaque atome d'une molécule.

Les spectres proches infra-rouge (PIR) obtenus correspondent à l'absorption des bandes harmoniques et des bandes de combinaisons des vibrations fondamentales telles que C-H, N-H, O-H, C-N.

Dans le proche infra-rouge, la mesure spectrale repose sur l'évaluation de la quantité de lumière qui n'a pas été absorbée par l'échantillon. Le domaine spectral de cette technique d'analyse est situé entre 800 et 2500 nm soit 12500-4000 cm⁻¹ (nombre d'onde).

A la différence de la spectrométrie en moyen infrarouge, il est très difficile d'assigner telle ou telle bande d'absorption à une molécule mais plutôt à une déformation physique de la molécule sous l'effet des vibrations dues au rayonnement. Nous utilisons ici la SPIR à des fins quantitatives pour établir des modèles de calibration à l'aide d'algorithmes mathématiques et permettre la prédiction de plusieurs paramètres chimiques du bois grâce aux spectres PIR.

4.1 Mode opératoire :

Avant analyse en spectrométrie proche infra-rouge, les échantillons sont préalablement broyés et tamisés. Les poudres de bois seront utilisées à une porosité inférieure ou égale à 25 µm. Elles sont ensuite placées dans une armoire à dessiccation afin de pouvoir contrôler leur taux d'hygrométrie.

Dans un premier temps, un alignement du faisceau est réalisé en plaçant une pastille en *Spectralon* (car le téflon n'absorbe pas en infra-rouge) sur la fenêtre d'analyse ainsi qu'un background permettant de calibrer l'appareil. Un alignement est réalisé toutes les heures pour éviter d'avoir un écart lors de la prise des spectres.

Ensuite, chaque échantillon est placé dans un vial en verre spécial où la poudre est tassée pour éviter les potentielles perturbations du faisceau liées à l'hétérogénéité de la poudre. Le vial est placé sur la fenêtre d'analyse du spectromètre et les spectres sont enregistrés, 64 scans sont réalisés en une trentaine de secondes avec une résolution de 8 cm^{-1} (nombre d'onde), puis un spectre moyen est donné par le spectromètre.

Les spectres se superposent presque tous ce qui est attendu puisque tous les échantillons étudiés proviennent de la même espèce, le robinier (Fig.28). Cependant, ils ne peuvent pas être analysés directement à première vue, il est nécessaire de faire des modèles de calibration pour pouvoir interpréter les spectres et donc d'utiliser un traitement mathématique des données [3].

Néanmoins, cette technique permet d'obtenir des résultats quantitatifs grâce à l'intensité des bandes d'absorption mais aussi qualitatif car on peut observer une absorbance particulière à une zone de longueurs d'onde spécifiques d'un matériau.

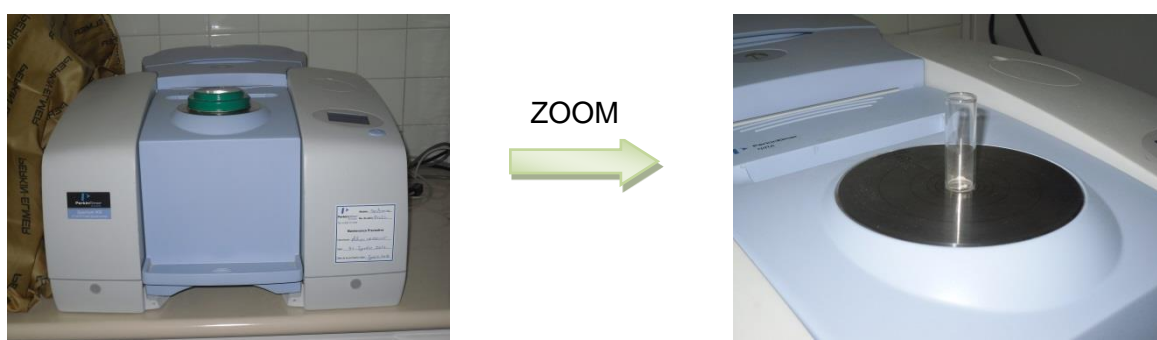


Figure 27 : Spectromètre Proche InfraRouge (SPIR) avec un zoom sur le placement des échantillons à analyser

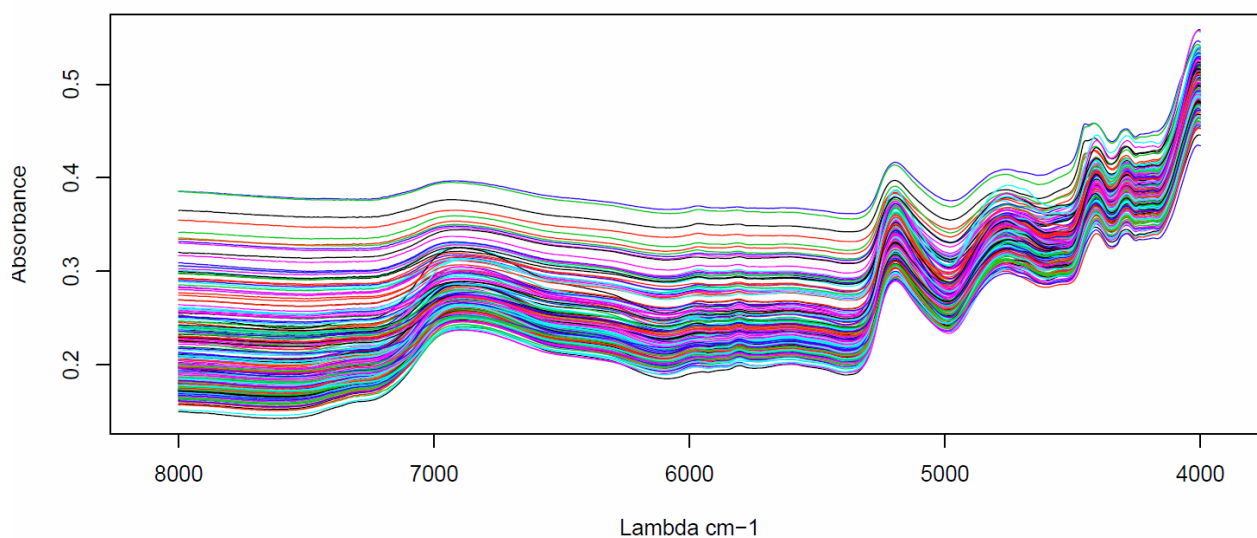


Figure 28 : Spectres PIR des échantillons du bois de robinier pris sous forme de poudre

Les spectres obtenus après chaque traitement mathématique seront mis en annexe 2.

Résultats et discussion

1. Les constituants extractibles et lignocellulosiques du bois de Robinier quantifiés par les méthodes chimiques :

Pour chaque méthode d'analyse, les résultats présentés correspondent à l'ensemble de l'échantillonnage de la récolte 2013 du projet *Carbonex* (sud de la France) soit 93 échantillons qui seront comparés avec les résultats des échantillons appartenant à la récolte 2012 (173 échantillons, nord de la France) obtenus par ailleurs.

1.1 Teneur en composés solubles extractibles :

Les dosages des extractibles pour les échantillons 2012 et 2013 ont été réalisés par deux opérateurs différents. Les résultats présentés ci-dessous (Fig.29) correspondent à ceux obtenu par deux opérateurs, les barres bleues représentent un premier opérateur (moi-même) et les barres rouges l'autre technicien.

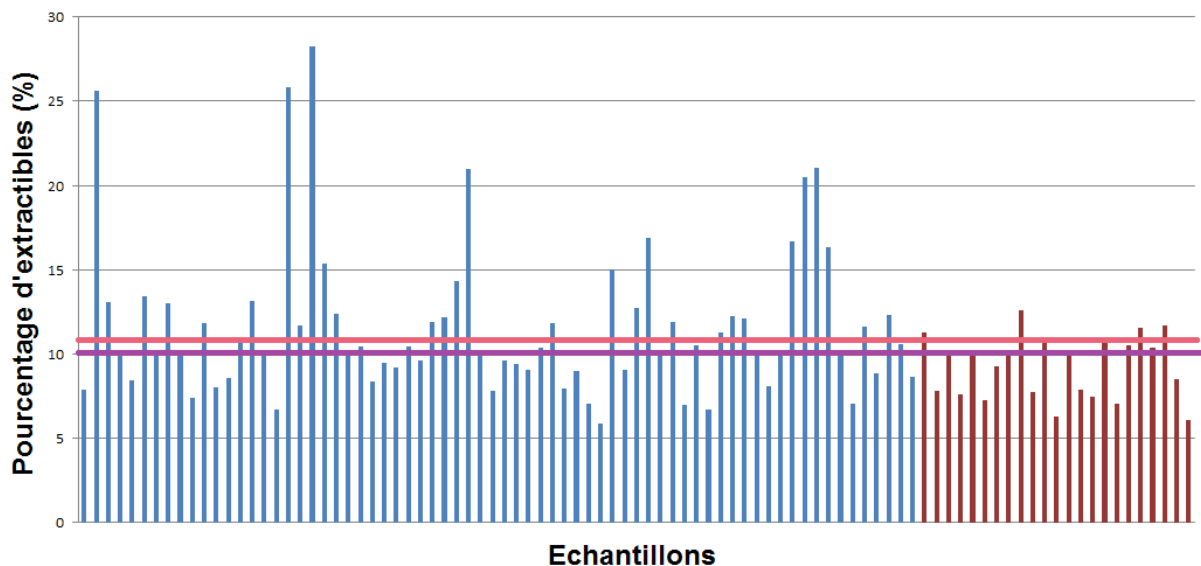


Figure 29 : Quantité d'extractibles contenus dans le bois de robinier récolté durant 2013 (résultats exprimés en pourcentage de masse sèche). Les barres verticales correspondent aux moyennes des deux extractions faites sur les échantillons. La ligne horizontale rose représente la moyenne de tous les échantillons analysés. Alors que la ligne horizontale violette représente la médiane de tous les échantillons analysés.

D'après ces résultats, on constate que six échantillons ont des valeurs nettement supérieures à 20% ce qui n'est pas attendu, on peut alors supposer que les sachets de ces échantillons ont été percés lors de l'extraction. La moyenne de tous les échantillons 2013 analysés est de 11,1% alors que celle des échantillons 2012 est de 11,7%. Pour les échantillons analysés de 2013, le pourcentage en extractibles maximal est 28,3% et le minimum est 5,9%. Tandis que pour les échantillons de la campagne 2012, le maximum du pourcentage d'extractibles est 39,9% et le minimum 5,2%. On remarque qu'il n'y a pas une importante variation entre les échantillons 2012 et 2013. Le coefficient de variation des échantillons du nord de la France est 34,1% et celui des échantillons du sud de la France est 37,2%. Les valeurs étant relativement élevées, on peut en déduire que ce paramètre chimique varie entre les individus analysés et leur provenance.

Afin de comparer de façon statistique les données des analyses des extractibles pour les échantillons des populations de 2012 et 2013, un diagramme en boxplot a été établi et présenté ci-après (Fig.30).

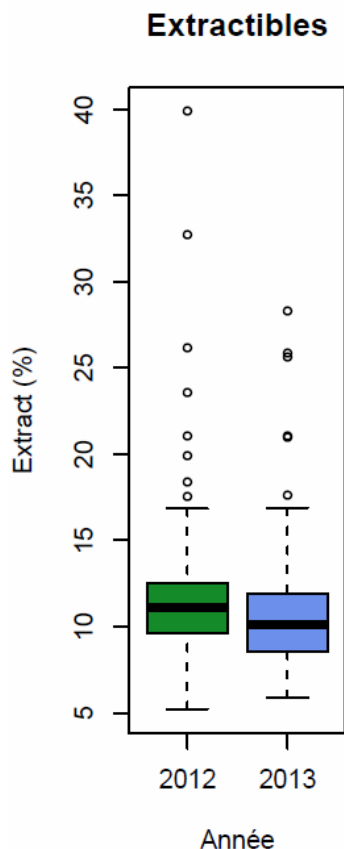


Figure 30 : Répartition des données (diagramme en boîte à moustache) représentant les pourcentages d'extractibles en fonction des deux années de récolte 2012 et 2013.

Sur le diagramme, les rectangles représentent 50% des échantillons avec la moyenne au milieu, autour il s'agit des quartiles qui représentent 25% des échantillons de part et d'autres du rectangle. Les points qui sont au-dessus symbolisent les échantillons qui ont de fortes teneurs en extractibles, comme ces valeurs ne sont pas cohérentes, il faudra refaire le dosage sur ces échantillons. On peut constater qu'il n'y a pas une grande variation des données entre les deux années et donc entre les deux zones de prélèvement.

1.2 Teneur en lignines solubles, insolubles (Klason) et totales :

Les dosages des lignines pour les échantillons 2012 et 2013 ont été réalisés par trois opérateurs. La figure suivante (Fig.31) représente les différents taux de lignines présents dans le bois. La barre horizontale verte correspond à la moyenne du taux de lignines totales, la barre horizontale bleue représente la moyenne du taux de lignines solubles et la barre horizontale rouge permet de visualiser la moyenne du taux de lignines Klason.

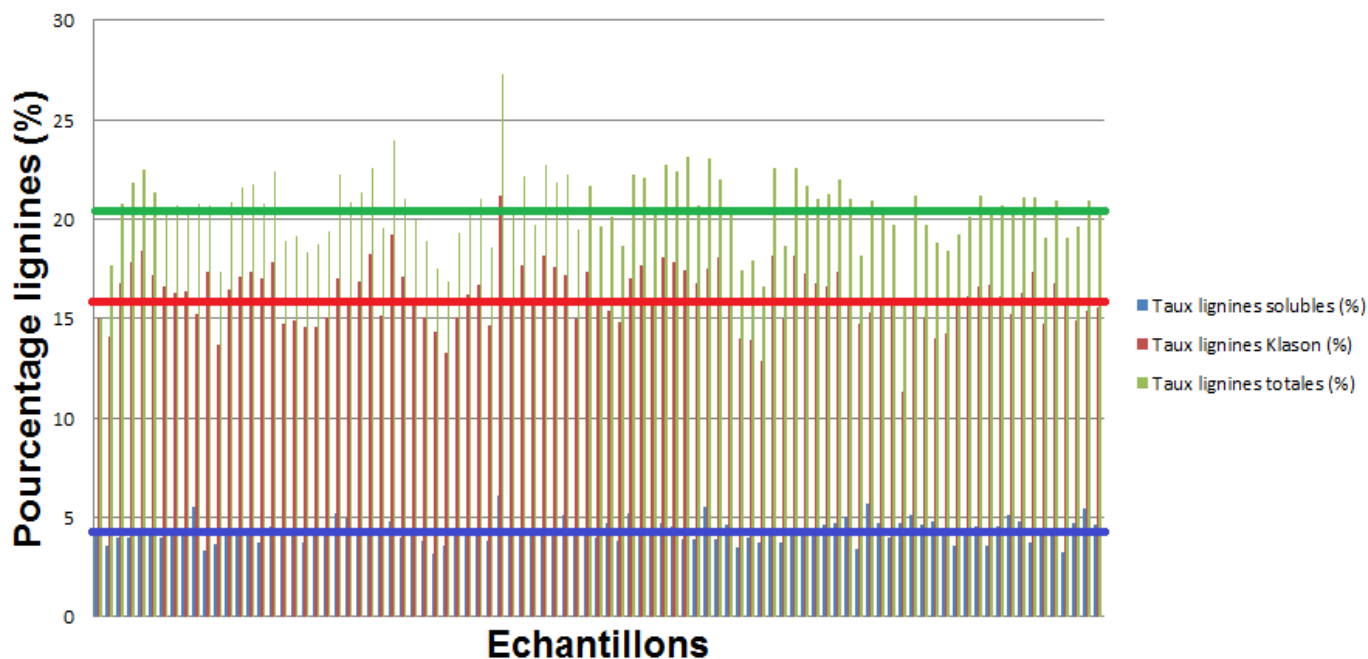


Figure 31 : Quantité de lignines contenues dans le bois de robinier (résultats exprimés en pourcentage de matière sèche). Les barres verticales représentent les différents pourcentages de lignines obtenus pour chaque échantillon 2013 analysé. Les différentes barres horizontales correspondent aux moyennes des différents taux de lignines présentes dans les échantillons.

Les résultats pour les lignines mettent en évidence l'homogénéité des différents taux de lignines présentes dans les échantillons 2013, à l'exception d'un échantillon qui a des pourcentages élevés des différentes lignines.

Pour les lignines solubles, la moyenne des échantillons 2013 est 4,3% alors que pour les échantillons 2012 elle est de 4,8%. Chez les échantillons récoltés dans le sud de la France, le pourcentage maximal est 6,1% et le minimal 3,2%. En comparaison, les échantillons récoltés dans le nord de la France possèdent une teneur maximale de 6,2% et minimale de 2,5%.

Concernant les lignines insolubles dites Klason, les échantillons récoltés en 2013 ont une moyenne de 16,1% tandis que pour les échantillons récoltés en 2012, elle est de 15,7%. Leur taux maximal pour les échantillons de 2013 est 21,2% et le minimal de 11,3%. Pour les échantillons 2012, la teneur maximale est 20,3% et celle minimale de 7,3%.

Enfin, pour les lignines totales, la moyenne chez l'échantillonnage de 2013 est 20,4% comparable à celle de l'échantillonnage de 2012 qui est de 20,6%. Pour les échantillons de 2013 la valeur maximale est 27,3% et celle des échantillons 2012 est 25,6%. La valeur minimale pour les échantillons 2013 est de 15,0% et pour les échantillons de 2012, elle est de 12,5%.

On peut alors conclure que sur l'ensemble de l'échantillonnage du projet *Carbonex*, les résultats correspondant aux différents taux de lignines dans les échantillons sont relativement homogènes excepté pour certains échantillons. La teneur en lignines est le caractère le plus important de ce projet, effectivement, les individus possédant les meilleurs taux seront sélectionnés pour être multipliés et testés en plantation pour la production de charbon de bois.

Afin de comparer si l'effet de l'année de la récolte des échantillons entre en compte sur les résultats obtenus pour les différents taux de lignines, une étude statistique a été réalisée à la suite de laquelle des boxplots sont obtenus pour chaque type de lignines et par année (donc par zone de prélèvement) (Fig.32).

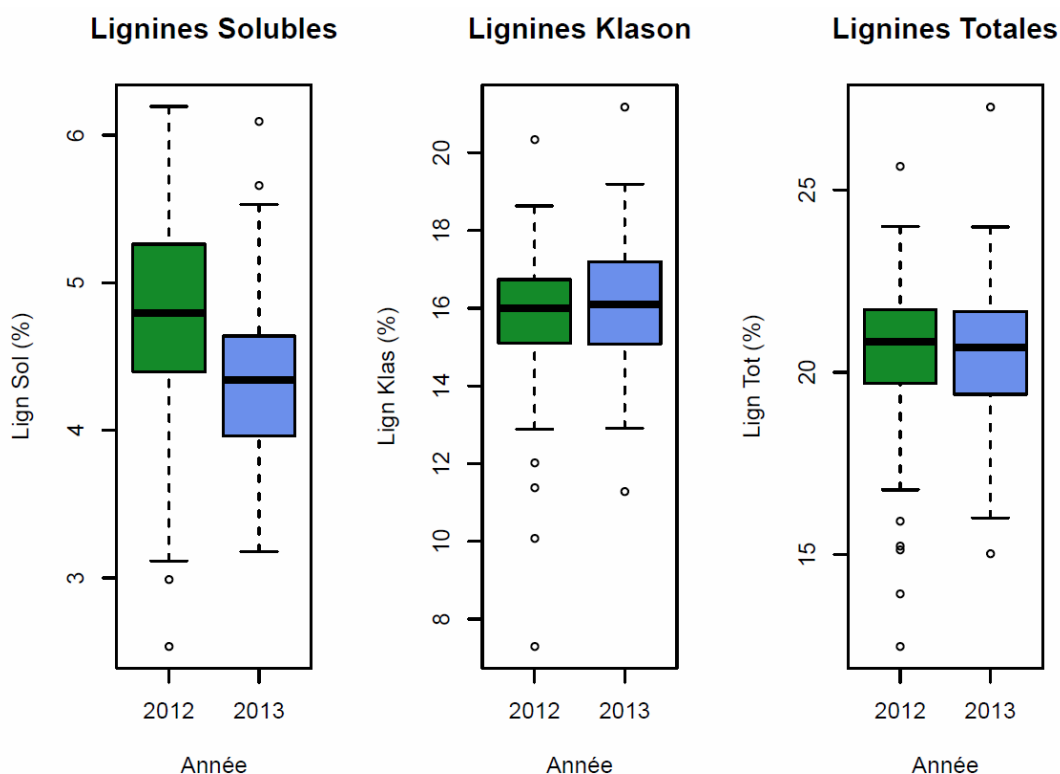


Figure 32 : Répartition des différents pourcentages des lignines dans le bois de robinier en fonction des deux années de récolte (2012 et 2013)

D'après le diagramme concernant le taux de lignines solubles, on observe une différence entre les résultats obtenus pour chaque année, on en conclut alors qu'il y a un fort effet entre les résultats obtenus pour les échantillons 2012 et ceux obtenus pour les échantillons 2013.

Pour le diagramme du pourcentage en lignines insolubles, on ne remarque pas de différence entre les résultats de 2012 et 2013. On en conclut alors qu'il n'y a pas d'effet année qui intervient sur les résultats. Quelques échantillons ont des valeurs extrêmes, il faudra alors les doser une nouvelle fois.

Concernant le diagramme des lignines totales, on peut constater qu'il n'y a pas de décalage entre les deux années, donc il n'y a pas de différence entre les résultats obtenus pour les échantillons prélevés en 2012 ou 2013.

On peut estimer que pour les constituants lignines du bois de robinier, il n'y a pas de différence significative entre les bois de robinier récoltés au nord de la France (en 2012) et au sud de la France (en 2013).

1.3 *Teneur en composés cellulose :*

Les différentes teneurs de cellulose présentes dans les échantillons de bois de robinier sont représentées ci-dessous (Fig.33). La barre horizontale bleue correspond à la moyenne du taux d'holocellulose, la barre horizontale rose représente la moyenne du taux d'alpha-cellulose et la barre horizontale verte montre la moyenne du taux d'hémicellulose chez tous les individus de 2013 analysés.

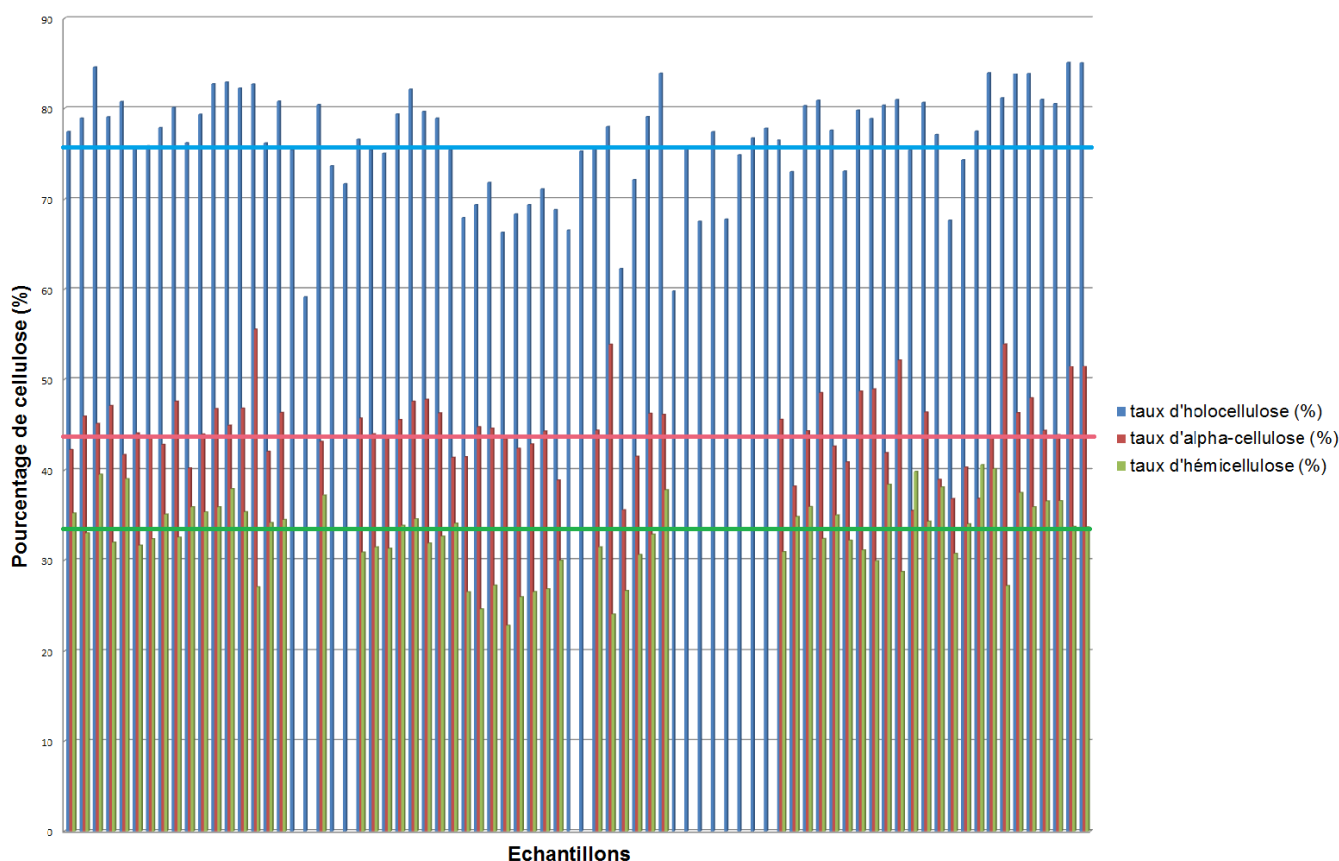


Figure 33 : Quantité de cellulose contenue dans le bois de robinier (résultats exprimés en pourcentage de matière sèche). Les barres verticales représentent les différents pourcentages de cellulose obtenus pour chaque échantillon analysé. Les barres horizontales permettent de visualiser les moyennes des différents taux de cellulose présente dans les échantillons.

Le dosage de la cellulose n'a pas encore été réalisé pour tous les échantillons, c'est pourquoi, avec les résultats obtenus on constate une certaine variation des différents taux de cellulose.

Pour la teneur en holocellulose de l'échantillonnage analysé, la valeur moyenne est 76,4% alors que la moyenne des échantillons de 2012 analysés est 73,6%. Chez les échantillons 2013, la teneur maximale est 85,1% et celle minimale est 59,2%. Concernant les échantillons récoltés en 2012, la valeur maximale est 78,5% et la valeur minimale est 66,2%.

A propos du taux d'alpha-cellulose présent dans les échantillons de 2013, la valeur moyenne est 44,6% tandis que pour les échantillons de 2012, elle est de 39,9%. Pour les échantillons récoltés en 2013, la teneur maximale est 55,6% et celle minimale est 35,6%. Alors que pour les échantillons récoltés au cours de 2012, le taux maximum est 47,4% et le taux minimum est 32,8%.

En ce qui concerne le taux d'hémicellulose, sa valeur moyenne chez les échantillons 2013 est 32,9%, pour les échantillons de 2012, elle est de 33,7%. Les valeurs maximales pour les échantillons de 2013 et de 2012 sont respectivement, 40,6% et 38,6%. Et les valeurs minimales sont 22,8% et 27,4%.

D'après les valeurs obtenues sur les quelques échantillons analysés, on remarque que les valeurs des différents taux de cellulose sont assez variables entre les deux années de récolte. Les coefficients de variation pour les échantillons de 2012 et de 2013 étant respectivement 4,5% et 7,5%. Il faudra alors vérifier par la suite, après l'analyse de tous les échantillons si ces constatations sont vérifiées ou non.

2. Les composés phénoliques (la robinétine et la dihydrorobinétine) présents dans le bois de robinier :

2.1 Teneur en phénols totaux dosés par méthode colorimétrique :

Le dosage au réactif de Folin a été réalisé sur onze échantillons, les résultats obtenus pour ces onze échantillons analysés avec la gamme de robinétine ou de dihydrorobinétine sont présentés ci-dessous (Fig.34).

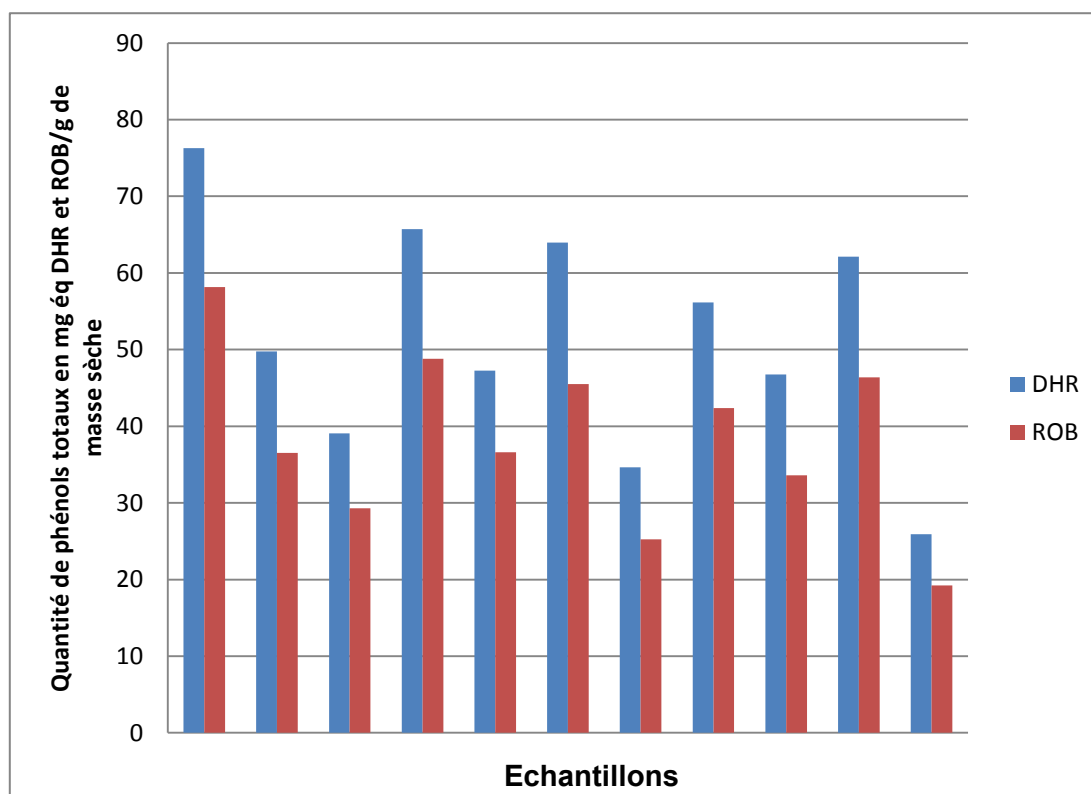


Figure 34 : Composition en phénols totaux des échantillons de robinier dosés par la méthode au réactif de Folin. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de composés phénoliques par g de matière sèche. Les barres verticales représentent les différents résultats obtenus en fonction du composé utilisé comme étalon, soit la dihydrorobinétine, soit la robinétine.

Avec la gamme de dihydrorobinétine, la moyenne de la quantité de phénols totaux en mg d'équivalent de dihydrorobinétine par g de matière sèche est 51,6. La valeur maximale est 76,3 et la minimale est 25,9 mg d'équivalent en dihydrorobinétine par gramme de matière sèche. Alors que la moyenne en mg d'équivalent de robinétine par g de matière sèche est de 38,3. La valeur maximale est 58,2 mg d'équivalent de robinétine par g de matière sèche et la valeur minimale est 19,3 mg d'équivalent de robinétine par g de matière sèche. Le coefficient de variation obtenu avec la gamme de robinétine est de 28,1% et celui obtenu avec la gamme de dihydrorobinétine est de 27,7%. L'histogramme met en évidence que la quantité en phénols totaux est plus importante lors de l'utilisation de la gamme de dihydrorobinétine.

2.2 *Teneur en robinétine et dihydrorobinétine mesurées par méthode chromatographique (HPLC) :*

L'analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) est réalisée en premier lieu pour établir une gamme de calibration puis sur douze échantillons qui ont été extrait en double appartenant à la campagne de récolte de 2013. C'est pourquoi, le chromatogramme d'un point de gamme de calibration (Fig.35) et un chromatogramme d'un extrait (Fig.36) ont été choisis pour illustrer ces analyses.

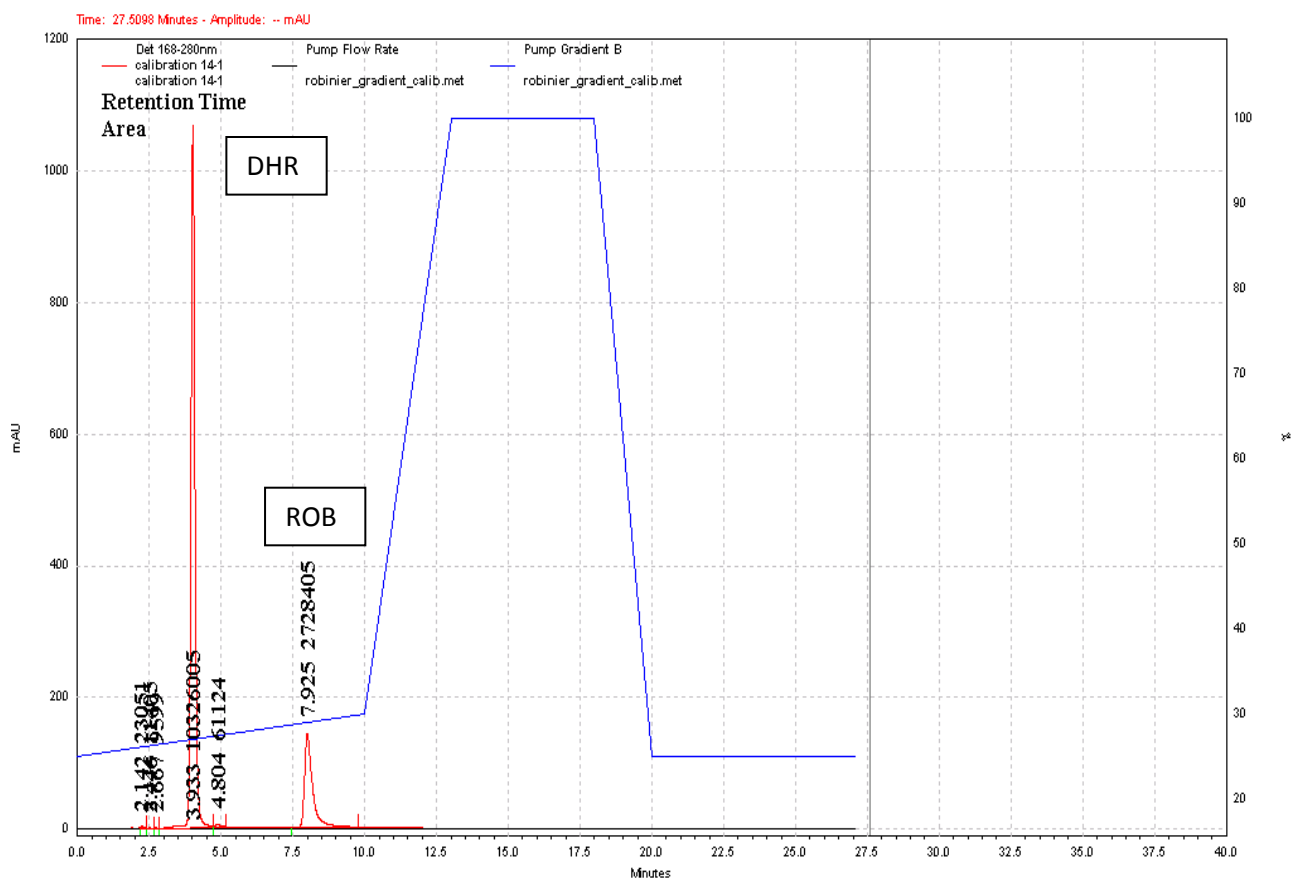


Figure 35 : Chromatogramme HPLC du point de gamme de calibration à 14 µg en robinétine et dihydrorobinétine dans 15 µL. Le tracé bleu correspond à la composition du gradient d'élution exprimée en fonction du pourcentage de la voie B.

Nous constatons que la dihydrorobinétine sort avant la robinétine car elle est plus polaire et la séparation est réalisée sur une colonne apolaire.

Le tableau des résultats lié au chromatogramme précédent est :

Tableau 4 : Analyse chromatographique pour la dihydrorobinétine et la robinétine, pour le point de gamme 14, temps de rétention et aires des pics détectés

Composés analysés	Temps de rétention des composés (min)	Aires des pics des composés
Dihydrorobinétine (DHR) à 14 µg dans 15 µL	3,933	10326005
Robinétine (ROB) à 14 µg dans 15 µL	7,925	2728405

Le profil du chromatogramme montre une séparation correcte des composés, l'analyse a été arrêtée après la sortie de la robinétine et une fois le retour à la ligne de base. Pour l'analyse chromatographique HPLC des points de calibration, un gradient plus court a été effectué permettant un temps d'analyse plus court.

Une gamme de calibration pour l'étalonnage de chaque molécule a pu être établie. Elles sont présentées dans la partie expérimentale (Fig.18) et seront utilisées pour l'évaluation de la quantité de chaque molécule détectées dans les extraits de bois analysés.

En ce qui concerne le chromatogramme d'un extrait phénolique du bois de robinier, il est possible de le visualiser ci-dessous (Fig.36) :

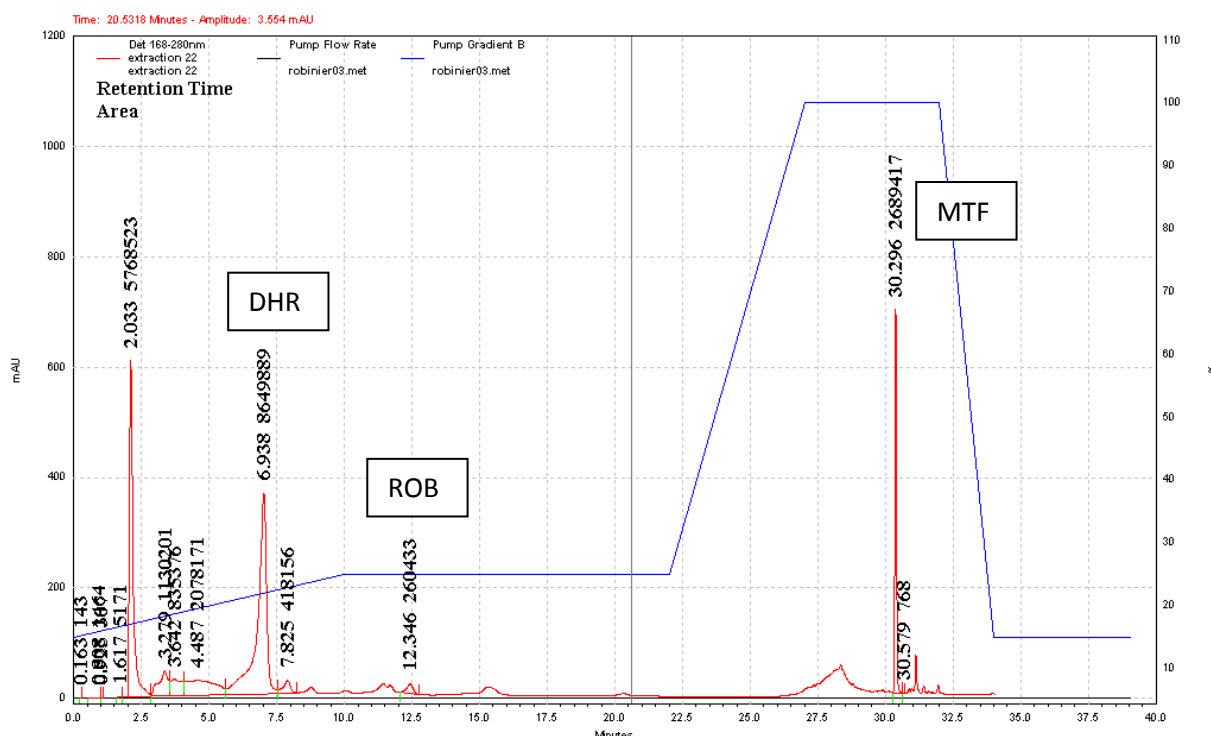


Figure 36 : Chromatogramme HPLC d'un extrait appartenant à la récolte 2013 analysé à l'aide du gradient d'éluant. DHR : dihydrorobinétine, ROB : robinétine, MTF : 6-méthoxyflavone (étalon interne). Le tracé bleu correspond à la composition du gradient d'éluant exprimée en fonction du pourcentage de la voie B.

Le tableau des résultats liés au chromatogramme d'un extrait analysé ci-dessus est :

Tableau 5 : Analyse chromatographique HPLC d'un extrait de bois de robinier contenant la dihydrorobinétine, la robinétine séparées et détectées et l'étalon interne (6-méthoxyflavone à 10⁻⁴ M dans le solvant d'extraction)

Composés analysés	Temps de rétention des composés (min)	Aires des pics des composés	Quantité correspondante de composé en µg dans 15 µL
Dihydrorobinétine (DHR)	6,938	8649889	4,3
Robinétine (ROB)	12,346	260433	0,6
6-Méthoxyflavone	30,296	2689417	0,8

La 6-Méthoxyflavone correspond à la solution témoin d'où sa présence sur le chromatogramme. On remarque également que l'extrait végétal est un mélange complexe puisqu'il y a la présence de nombreux autres pics en plus de ceux de la robinétine, la dihydrorobinétine et la 6-méthoxyflavone. On remarque également, une faible teneur en robinétine dans l'échantillon analysé, beaucoup moins représentée quantitativement que la dihydrorobinétine, ce qui sera une constante dans tous les extraits de bois de robinier analysés. Les résultats quantitatifs obtenus pour chaque échantillon analysé pour ce qui concerne les teneurs en robinétine et dihydrorobinétine sont représentés dans le tableau suivant, les calculs ont été réalisés à l'aide des droites de calibration établies précédemment.

Tableau 6 : Quantités des deux molécules robinétine et dihydrorobinétine dans les extraits de bois de robinier analysés par HPLC (exprimées en mg/g de matière sèche MS)

Echantillon analysé	Répétition	Masse des échantillons (en mg)	Aire des pics en ROB (à 320 nm)	Aire des pics en DHR (à 280 nm)	Quantité de ROB dans 15 µL (en µg)	Quantité de DHR dans 15 µL (en µg)	Quantité de ROB exprimée en mg/g de matière sèche	Quantité de DHR exprimée en mg/g de matière sèche
1	1	50,1	3269777	18236574	0,8	9,1	1,5	16,7
	2	50,1	3001945	18409573	0,8	9,2	1,4	16,8
2	1	50	2331152	11547019	0,6	5,8	1,1	10,6
	2	50	2859519	16032400	0,7	8,0	1,3	14,7
3	1	50,6	2688365	15775954	0,7	7,9	1,2	14,3
	2	50,1	2901212	16783200	0,7	8,4	1,3	15,4
4	1	50,3	6790350	28703098	1,7	14,4	3,1	26,2
	2	50,2	3479908	14474966	0,9	7,2	1,6	13,2
5	1	49,8	4233772	12125788	1,1	6,1	1,9	11,2
	2	50,7	2150774	12576105	0,5	6,3	1,0	11,4
6	1	50	2868479	14977339	0,7	7,5	1,3	13,7
	2	49,9	4287489	17351011	1,1	8,7	2,0	15,9
7	1	50,2	1541966	10122200	0,4	5,1	0,7	9,2
	2	50,2	1764032	10935716	0,4	5,5	0,8	10,0
8	1	50,3	2112049	16733389	0,5	8,4	1,0	15,2
	2	50	4988546	17593806	1,2	8,8	2,3	16,1
9	1	50,1	2740077	15820156	0,7	7,9	1,3	14,5
	2	50,3	2402142	12858820	0,6	6,4	1,1	11,7
10	1	49,9	3675217	16053796	0,9	8,0	1,7	14,7
	2	50,5	3719469	15723860	0,9	7,9	1,7	14,3
11	1	50,3	2452376	9327146	0,6	4,7	1,1	8,5
	2	50,4	2316481	8649889	0,6	4,3	1,1	7,9
12	1	50	1973238	6211825	0,5	3,1	0,9	5,7
	2	50,6	1843435	5795535	0,5	2,9	0,8	5,2

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que la dihydrorobinétine est en quantité supérieure à la robinétine dans les échantillons de bois analysés. La quantité moyenne de robinétine présente dans les échantillons est 1,4 mg/g de matière sèche alors que celle de la dihydrorobinétine présente chez les mêmes échantillons est 13,1 mg/g de matière sèche. On constate également une grande variation entre les différents échantillons étudiés, le coefficient de variation de la robinétine est de 38,4% et celui pour la dihydrorobinétine est de 32,8%. On peut penser que ce critère restera très variable au sein de la population entière de robiniers échantillonnés. Pour la quantité de robinétine, les résultats maximum et minimum sont respectivement 3,1 et 0,7 mg/g de matière sèche. En ce qui concerne la dihydrorobinétine, ces mêmes résultats sont respectivement 26,2 et 5,3 mg/g de matière sèche.

3. Modèles d'évaluation indirecte des composés du bois par Spectrométrie Proche Infrarouge (SPIR) :

Les modèles de calibration en SPIR des différents paramètres recherchés sont réalisés à l'aide du logiciel *R*, librement accessible. Dans un premier temps, les spectres de tous les échantillons sont regroupés et observés. De nombreuses variations entre les spectres sont observées c'est pourquoi plusieurs traitements mathématiques vont être effectués afin d'obtenir le meilleur modèle de calibration possible.

Pour commencer, les spectres sont découpés entre 10 000 et 8 000 cm^{-1} car il s'agit d'une zone fortement bruitée et qui est peu informative. Donc les spectres avec lesquels nous allons travailler ont une plage de longueurs d'onde comprise entre 8 000 et 4 000 cm^{-1} .

Les pré-traitements mathématiques subis par les spectres sont :

- Une première normalisation permettant de minimiser les éventuelles variations indésirables entre les spectres dues à l'appareil et à l'environnement.
- Une seconde normalisation est réalisée afin de corriger la ligne de base et d'éliminer l'augmentation de l'absorbance lorsque les nombres d'onde diminuent.
- Une dérivation de premier ordre sur les données brutes qui permet à l'aide d'une fonction de calculer le pas.
- Une dérivation de second ordre sur les données brutes
- Une dérivation de premier ordre sur les données normalisées
- Une dérivation de second ordre sur les données normalisées

Une fois ces traitements mathématiques effectués, le traitement permettant l'obtention du meilleur modèle de calibration ne peut pas être choisi directement, il faut d'abord faire des modèles pour chaque traitement avant de faire un choix.

Quand les modèles de chaque traitement sont obtenus, on regarde celui qui possède le meilleur r^2 et si possible le plus faible RMSE, indicateur permettant de déterminer l'erreur sur la validation croisée du modèle de prédiction.

Enfin, le moyen utilisé pour évaluer si notre modèle est correct ou non est la validation croisée, le modèle de prédiction est réalisé en enlevant à chaque fois une valeur différente. C'est pourquoi, quand le modèle est validé, les valeurs en différents paramètres chimiques des échantillons n'ayant pas subis les dosages chimiques peuvent être prédites.

Pour chacune des caractéristiques étudiées, au moins deux modèles ont été réalisés, un premier en gardant toutes les valeurs obtenus lors des dosages chimiques et le deuxième en enlevant les valeurs aberrantes appelées aussi « outliers ».

3.1 *Modèle de calibration des extractibles du bois de robinier*

En ce qui concerne les extractibles présents dans le bois de robinier, deux modèles de calibration ont été réalisés. Ils sont présentés par la suite (Fig.37 et Fig.38). Les points présents sur les modèles correspondent aux différents échantillons qui ont subis les dosages. L'axe vertical correspond aux valeurs prédites et celui horizontal aux valeurs observées lors des dosages. Le traitement mathématique permettant l'obtention du meilleur modèle est la dérivation.

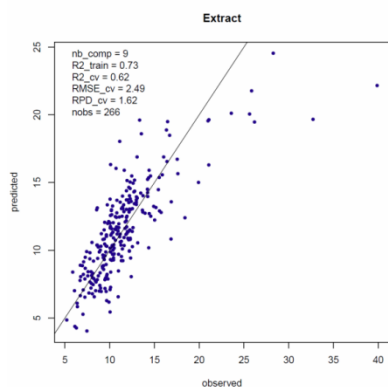


Figure 37 : Modèle de calibration SPIR des extractibles présents dans le bois de robinier en gardant toutes les données obtenues par les dosages.

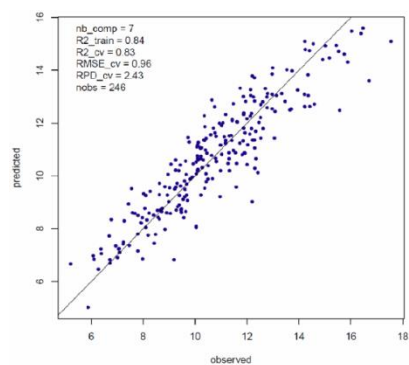


Figure 38 : Modèle de calibration SPIR des extractibles présents dans le bois de robinier en enlevant 20 outliers.

D'après le modèle (Fig.19), on constate un étalement des points de part et d'autre de la ligne tout en restant proche de la ligne. Avec les différents paramètres du modèle obtenus nous pouvons estimer le modèle de calibration de qualité suffisante pour être utilisé pour la prédiction de ce paramètre, évitant ainsi de faire les dosages des extractibles qui sont coûteux et longs.

3.2 *Modèle de calibration pour les lignines solubles du bois de robinier*

Le modèle de calibration des lignines solubles présenté ci-dessous a été obtenu avec le pré-traitement subtil par la normalisation de la dérivée seconde (Fig.39) auquel ont été enlevés 16 outliers.

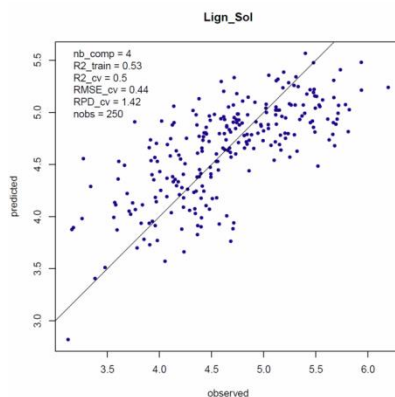


Figure 39 : Modèle de calibration SPIR pour les lignines solubles présentées dans le bois de robinier en enlevant 16 outliers.

D'après le résultat obtenu, on observe une dispersion importante des échantillons de part et d'autre de la ligne. Le modèle n'est donc pas de qualité satisfaisante, il ne pourra pas être validé et ne sera donc pas utilisable en état.

3.3 Modèle de calibration des lignines insolubles (Klason) du bois de robinier :

Le meilleur modèle de calibration des lignines insolubles a été obtenu par le traitement mathématique de dérivée première (Fig.40), pour se faire, il a fallu enlever 27 valeurs.

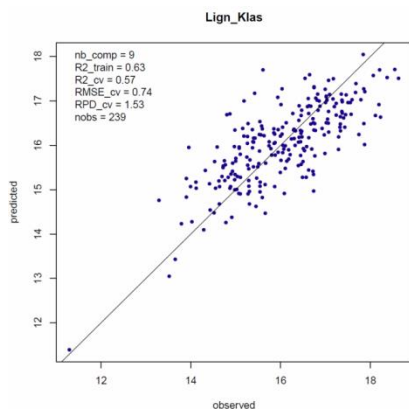


Figure 40 : Modèle de calibration SPIR pour les lignines insolubles présentent dans le bois de robinier en enlevant 27 outliers.

Suite au modèle précédent, on observe une variation relativement faible des données puisque les points sont principalement compris entre 14 et 18 pour les valeurs observées, ce qui rend difficile l'obtention d'un bon modèle. On en conclut alors que le modèle n'est pas acceptable en état, ses critères de qualité ne sont pas suffisants pour prédire convenablement ce paramètre avec une précision meilleure à la méthode d'analyse chimique.

3.4 Modèle de calibration des lignines totales du bois de robinier :

Le meilleur modèle de calibration des lignines totales a été obtenu par dérivation des données (Fig.41) auquel 26 outliers ont été enlevé des données.

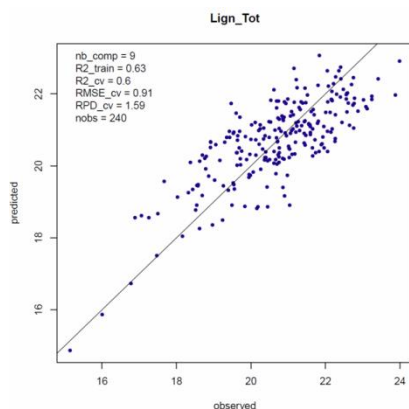


Figure 41 : Modèle de calibration SPIR des lignines totales contenues dans le bois de robinier en enlevant 26 outliers.

D'après le modèle de calibration, on remarque comme dans le cas des lignines insolubles, une répartition non homogène le long de la droite. On en conclut alors que le modèle en PIR n'est pas satisfaisant pour le moment et ne pourra donc pas être utilisable. On regarde également, si l'effet de l'année de récolte entre en compte dans les résultats.

4. Activité anti-oxydante des molécules du bois de robinier :

Afin d'évaluer l'activité anti-oxydante des molécules présentes dans le bois de robinier, un test a été réalisé avec une solution de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en suivant la décoloration de la solution bleue, dû au DPPH, par spectroscopie à 517 nm. Cette analyse consiste à faire un suivi cinétique des solutions présentes dans les plaques à 96 puits contenant différents extraits à différentes concentrations par rapport à un standard connu ou par rapport à un blanc [5].

La composition des solutions utilisées pour l'analyse est indiquée par la suite ainsi que leur position dans la plaque à 96 puits.

- Blanc : 50 μ L MeOH + 200 μ L DPPH
- Solution témoin : 50 μ L du mélange (solution mère de DHR et ROB à 2 μ g/ μ L diluées à 10⁻⁴M) + 200 μ L DPPH
- Essais : 1 μ L d'extrait + 49 μ L MeOH + 200 μ L DPPH

Tableau 7 : Plan de plaque pour la lecture en cinétique des absorbances des solutions (en quadruplât) dans la plaque à 96 puits utilisée pour le test des activités anti-oxydantes des composés présents dans le bois de robinier

Blanc	ROB 2+DHR 2 10 ⁻⁴ M	Ech 1- 1 μ L	Ech 2- 1 μ L	Ech 3- 1 μ L	Ech 4 1 μ L	Ech 5- 1 μ L	Ech 6- 1 μ L	Ech 7- 1 μ L
Blanc	ROB 2+DHR 2 10 ⁻⁴ M	Ech 1- 1 μ L	Ech 2- 1 μ L	Ech 3- 1 μ L	Ech 4-1 μ L	Ech 5- 1 μ L	Ech 6- 1 μ L	Ech 7- 1 μ L
Blanc	ROB 2+DHR 2 10 ⁻⁴ M	Ech 1- 1 μ L	Ech 2- 1 μ L	Ech 3- 1 μ L	Ech 4-1 μ L	Ech 5- 1 μ L	Ech 6- 1 μ L	Ech 7- 1 μ L
Blanc	ROB 2+DHR 2 10 ⁻⁴ M	Ech 1- 1 μ L	Ech 2- 1 μ L	Ech 3- 1 μ L	Ech 4-1 μ L	Ech 5- 1 μ L	Ech 6- 1 μ L	Ech 7- 1 μ L

Suite à l'analyse par spectroscopie effectuée toutes les cinq minutes à une longueur d'onde de 517 nm, les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (Fig.42).

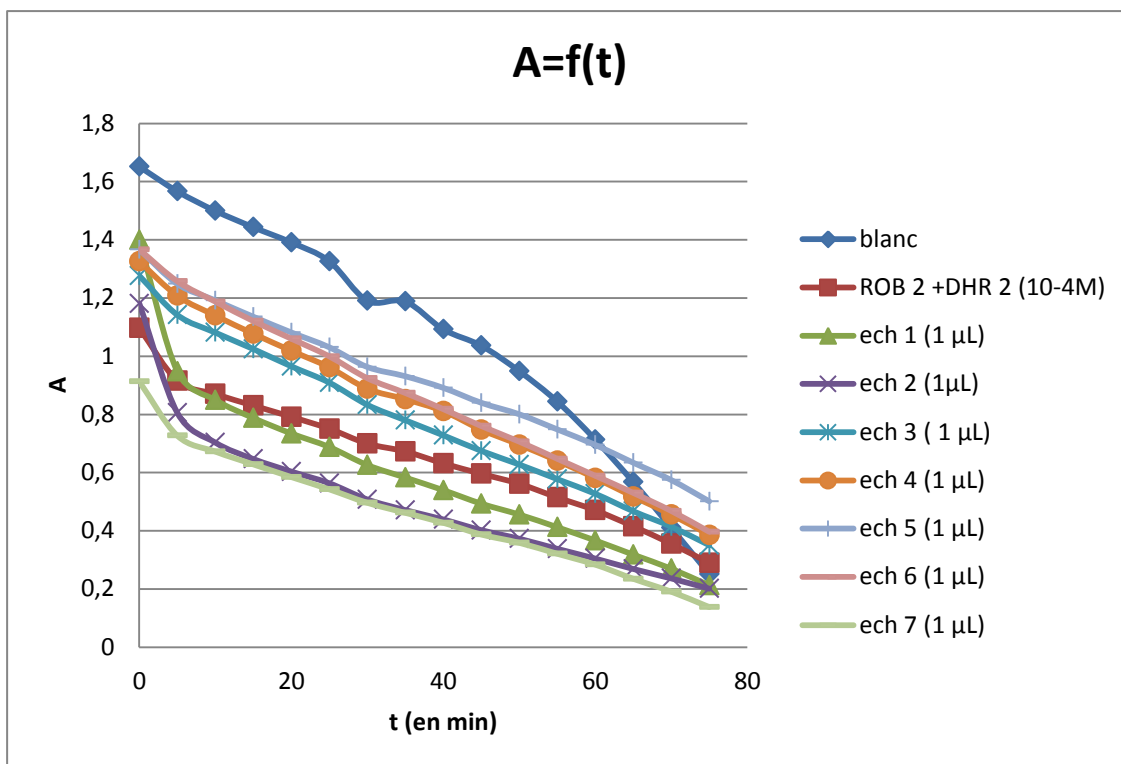


Figure 42 : Suivi cinétique par spectroscopie de la décoloration du radical libre DPPH permettant la mesure de l'efficacité des antioxydants (molécules et extraits)

On remarque la diminution de l'absorbance au cours du temps, cependant au bout de 75 min le plateau n'est pas encore atteint. L'activité anti-oxydante (AAO) a été calculée pour l'échantillon 1 au bout de 15 puis 30 min, les résultats obtenus pour 15 min est 45% et 47% au bout de 30 min, on constate une légère augmentation de cette activité anti-oxydante au cours du temps. D'autres tests devront être effectués sur les échantillons restant.

L'activité anti-oxydante des extraits de bois de robinier peut être comparée à celle présente dans d'autres espèces végétales chez lesquelles les analyses ont été effectuées par une précédente stagiaire.

Tableau 8 : Activité anti-oxydante (AAO) des différentes espèces analysées

Espèces végétales testées	Capacité anti-oxydante (%)
Chêne	49
Peuplier	35
Teck	12
Robinier	38

D'après le tableau ci-dessus, le robinier a une activité anti-oxydante nettement supérieure à celle du teck. Il s'agit d'un point important puisque les analyses effectuées sur le robinier ont pour but de voir si ce dernier peut remplacer le teck.

Conclusions

1. Conclusion scientifique :

Les objectifs de ce stage étaient l'analyse des différents constituants chimiques structuraux et extractibles d'échantillons de bois de robinier récoltés au cours de deux années (2012 et 2013) partout en France, pour permettre de déterminer la composition chimique des échantillons ceci dans le cadre de deux projets régionaux. Ces projets visent la valorisation du bois de robinier afin de lancer sa production en France tout en élargissant son utilisation dans d'autres domaines.

En ce qui concerne le projet *Carbonex*, le critère le plus important est la teneur en lignines 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. Les modèles de calibration en spectrométrie proche infrarouge réalisés sur les différents types de lignines n'ont pas été concluants donc d'autres essais devront être effectués afin d'améliorer les modèles et les méthodes chimiques d'évaluation seront pour l'instant encore utilisées pour les futures analyses. Sur tous les dosages que j'ai réalisés, on ne remarque pas une grande variation entre les différents échantillons analysés qu'ils proviennent de la récolte 2012 ou 2013 excepté pour le taux en lignine soluble.

Pour le projet *ValRob*, le caractère recherché est la quantité respective en deux molécules, dihydrorobinétine et robinétine dans les extraits de bois et leur activité anti-oxydante (AAO) associée. Nous n'avons pu analyser un nombre important d'échantillons pour explorer la variation de ses molécules au sein de la population mais par contre nos analyses de l'activité anti-oxydante sur quelques échantillons montrent un niveau très satisfaisant pour les molécules en elles-mêmes et pour les extraits de bois aussi. A côté des activités antibactériennes et antifongiques déjà détectées pour ces molécules et pour les extraits de bois de robinier, cette activité anti-oxydante est un plus et intéresse particulièrement l'industrie cosmétique.

2. Conclusion personnelle :

Ce stage 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 des connaissances en biochimie ainsi que les techniques de laboratoire appliquées au matériel végétal.

Mon travail m'a beaucoup intéressé, les projets de recherche très appliqués auxquels j'ai participé permettent d'une part de produire du charbon de bois à partir d'arbres cultivés à côté de l'usine diminuant ainsi les coûts de transport. D'autre part, d'utiliser les propriétés anti-oxydantes des composés présents dans le robinier afin de les isoler, pour les utiliser par la suite dans le domaine pharmaceutique, cosmétique ou encore agricole.

En parallèle avec le stage réalisé dans un laboratoire pharmaceutique de contrôle-qualité, cette expérience professionnelle de 6 mois dans le domaine de la recherche scientifique m'a permis de suivre l'organisation et la mise en place d'un projet de recherche, de travailler en équipe et d'acquérir un peu plus d'autonomie lors de la réalisation de mes manipulations.

Je suis heureuse d'avoir pu effectuer ce stage entouré de personnes compétentes et passionnées qui m'ont encadré tout en me laissant de l'autonomie. Je garde de cette expérience un excellent souvenir qui constitue dorénavant une expérience professionnelle valorisante.

Bibliographie

- [1] Boizot, N. ; Charpentier, J.-P., 2006. *Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un bois forestier*. Cahier des Techniques de l'INRA Bulletin de Liaison Interne, numéro spécial.
- [2] Popovici, C. ; Saykova, I. ; Tylkowski, B., 2009. *Evaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH*. Revue de Génie Industriel, 4 : 25-39.
- [3] Hruschka, W.R. 1987. *Data analysis:wavelength selection methods*. In Williams, P.C. ; Norris, K. H., *Nearinfrared Technology in the Agricultural and Food Industries 2* : 35-55.
- [4] Aadil.,K. R.; Barapatre, A.; Sahu S. and all., 2014. *Free radical scavenging activity and reducing power of Acacia nilotica wood lignin*. International Journal of Biological Macromolecules, 67 : 220-227.

Annexes

Annexe 1 : Listing des échantillons récoltés en 2013 et 2012

Annexe 2 : Spectres PIR après les différents traitements mathématiques

Annexe 1 : Listing des échantillons récoltés en 2013 et 2012.

Echantillons 2013	Date de récolte	Région	Age	densité (nombre arbre/ha)
0III12-1	24/05/2013	Aquitaine	20-25	540
0III12-2	24/05/2013	Aquitaine	20-25	760
0III12-3	24/05/2013	Aquitaine	20-25	500
0III13-3	24/05/2013	Aquitaine	20-25	540
0III13-1	24/05/2013	Aquitaine	20-25	520
0III13-2	24/05/2013	Aquitaine	20-25	620
0Bud14-1	28/05/2013	Aquitaine	30-35	340
0Bud14-2	28/05/2013	Aquitaine	30-35	240
0Bud14-3	28/05/2013	Aquitaine	30-35	360
0Bud14-4	28/05/2013	Aquitaine	30-35	560
3Sai1-1	18/03/2013	Languedoc-Roussillon	25-30	740
3Sai1-2	18/03/2013	Languedoc-Roussillon	25-30	1000
3Sai1-3	21/03/2013	Languedoc-Roussillon	20-25	1500
3Bes2-1	21/03/2013	Languedoc-Roussillon	,10-15	940
3Bes2-2	21/03/2013	Languedoc-Roussillon	,10-15	1180
3Pon3-1	22/03/2013	Languedoc-Roussillon	30-35	1120
3Pon3-2	22/03/2013	Languedoc-Roussillon	30-35	1060
3Pon4-1	22/03/2013	Languedoc-Roussillon	30-35	660
3Fra5-1	20/03/2013	Languedoc-Roussillon	40-45	420
3Moi6-1	20/03/2013	Languedoc-Roussillon	15-20	1420
3Moi6-2	20/03/2013	Languedoc-Roussillon	15-20	600
3Moi6-3	20/03/2013	Languedoc-Roussillon	15-20	440
3Nes7-1	16/04/2013	Auvergne	30-35	820
3Nes8-1	16/04/2013	Auvergne	20-25	1260
3Nes9-1	16/04/2013	Auvergne	30-35	880
3Ger10-1	17/04/2013	Auvergne	30	1120
3Puy11-1	17/04/2013	Auvergne	pourri au cœur	880
3Mon12-1	18/04/2013	Auvergne	40-45	440
3Mon12-2	18/04/2013	Auvergne	45-50	520
3Mon13-1	18/04/2013	Auvergne	30-35	560
3Lez14-1	18/04/2013	Auvergne	30-35	520
3Dor15-1	19/04/2013	Auvergne	20-25	1100
3Dor15-2	19/04/2013	Auvergne	20-25	1100
3Thi16-1	19/04/2013	Auvergne	25-30	620
3Thi16-2	19/04/2013	Auvergne	30-35	640
3Yze17-1	22/04/2013	Auvergne	20	660
3Yze17-2	22/04/2013	Auvergne	20	880
3Dom18-2	22/04/2013	Auvergne	40-45	560
3Dom18-1	22/04/2013	Auvergne	pourri au cœur	320
3Neu19-2	23/04/2013	Auvergne	20-25	1060
3Neu19-1	23/04/2013	Auvergne	20-25	580
3Sai20-1	24/04/2013	Auvergne	25-30	780
3Sai20-2	24/04/2013	Auvergne	25	960
3Dom21-1	24/04/2013	Auvergne	30-35	660
3Cou22-1	25/04/2013	Auvergne	20-25	600
3Cou23-1	25/04/2013	Auvergne	16	1100
3Cou23-2	25/04/2013	Auvergne	22	660

3Cou24-1	25/04/2013	Auvergne	inconnu	700
3Esp25-1	26/04/2013	Auvergne	30-35	520
3Esp25-2	26/04/2013	Auvergne	25-30	840
3Léo26-1	26/04/2013	Auvergne	pourri au cœur	580
4Bas1-1	25/03/2013	Aquitaine	10	900
4Bas1-2	25/03/2013	Aquitaine	10	1020
4Cre2-1	14/05/2013	Aquitaine	20-25	640
4Lam3-1	14/05/2013	Aquitaine	20-25	540
4Vil4-1	22/05/2013	Aquitaine	30-35	800
4Vil4-2	22/05/2013	Aquitaine	30-35	620
4Far5-1	22/05/2013	Aquitaine	30-35	740
4Cas6-1	22/05/2013	Aquitaine	25-30	560
4Pré7-1	21/05/2013	Aquitaine	40-45	500
4Vil8-1	21/05/2013	Aquitaine	inconnu	340
4Vil9-1	21/05/2013	Aquitaine	20-25	560
4Pre10-1	23/05/2013	Aquitaine	15-20	500
4Sai11-1	29/04/2013	Aquitaine	25-30	720
4Sai11-2	29/04/2013	Aquitaine	25-30	420
4Sai12-2	29/04/2013	Aquitaine	21	600
4Sai12-1	29/04/2013	Aquitaine	20	820
4Sai13-1	17/05/2013	Aquitaine	tronc pourri au cœur	700
4Lis14-1	29/04/2013	Aquitaine	20-25	440
4Tar17-1	27/03/2013	Aquitaine	35	300
4Tar18-1	27/03/2013	Aquitaine	25-30	500
4Mor19-1	28/03/2013	Aquitaine	25-30	460
4Arz20-1	28/03/2013	Aquitaine	25-30	540
4Sai21-1	02/04/2013	Midi-Pyrénées	30	340
4Sai21-2	02/04/2013	Midi-Pyrénées	30	420
4Cap22-1	03/04/2013	Midi-Pyrénées	20	660
4Cap22-2	03/04/2013	Midi-Pyrénées	20	600
4Cap22-3	03/04/2013	Midi-Pyrénées	20	800
4Fra23-1	04/04/2013	Midi-Pyrénées	20	740
4Art24-1	05/04/2013	Midi-Pyrénées	25-30	520
4Art24-2	05/04/2013	Midi-Pyrénées	24	360
4Art24-3	05/04/2013	Midi-Pyrénées	25-30	420
4Sai25-1	08/04/2013	Midi-Pyrénées	35-40	680
4Sai25-2	08/04/2013	Midi-Pyrénées	35-40	560
4Sai25-3	08/04/2013	Midi-Pyrénées	35-40	560
4Sou26-1	09/04/2013	Midi-Pyrénées	35-40	640
4Tar27-1	10/04/2013	Aquitaine	20-25	420
4Luc28-1	11/04/2013	Aquitaine	35-40	380
4Luc28-2	11/04/2013	Aquitaine	45-50	240
4Luc29-1	11/04/2013	Aquitaine	25-30	320
4Luc29-2	11/04/2013	Aquitaine	pourri au cœur	200
4Sai30-1	15/04/2013	Midi-Pyrénées	25-30	900
4Sai30-2	15/04/2013	Midi-Pyrénées	30-35	900
4Sar31-1	16/05/2013	Aquitaine	25-30	440
4Sar31-2	16/05/2013	Aquitaine	30-35	520
4Cuz32-1	15/05/2013	Aquitaine	pourri au cœur	540

Echantillons 2012	Date de récolte	Région	Age	Densité des arbres (nombre d'arbre/ha)
0Bay1-1	18/04/2011	Champagne-Ardenne		260
0Bay1-2	18/04/2011	Champagne-Ardenne		180
0Bay1-3	18/04/2011	Champagne-Ardenne		80
0Bay1-4	18/04/2011	Champagne-Ardenne		200
0Fay2-1	18/04/2011	Champagne-Ardenne		160
0Fay2-2	18/04/2011	Champagne-Ardenne		200
0Mul3-1	18/04/2011	Champagne-Ardenne		120
0Mul3-2	18/04/2011	Champagne-Ardenne		120
0Mul3-3	18/04/2011	Champagne-Ardenne		120
0Mul3-4	18/04/2011	Champagne-Ardenne		20
0Cre4-1	19/04/2011	Champagne-Ardenne		220
0Cre4-2	19/04/2011	Champagne-Ardenne		280
0Cre4-3	19/04/2011	Champagne-Ardenne		300
0Cre4-4	19/04/2011	Champagne-Ardenne		260
0Avr5-1	19/04/2011	Champagne-Ardenne		160
0Avr5-2	19/04/2011	Champagne-Ardenne		340
0Aux6-1	19/04/2011	Champagne-Ardenne		140
0Aux6-2	19/04/2011	Champagne-Ardenne		200
0Ren7-1	20/04/2011	Bourgogne		200
0Ren7-2	20/04/2011	Bourgogne		180
0Ren8-1	20/04/2011	Bourgogne		200
0Ren8-2	20/04/2011	Bourgogne		380
0Tal9-1	20/04/2011	Bourgogne		480
0Tal9-2	20/04/2011	Bourgogne		340
0Max10-1	21/04/2011	Bourgogne		100
0Max10-2	21/04/2011	Bourgogne		100
0Max11-1	21/04/2011	Bourgogne		520
0Max11-2	21/04/2011	Bourgogne		440
1Lav1-1	16/02/2012			160
1Cha2-1	16/02/2012			220
1Cha2-2	16/02/2012			460
1Cuf3-1	16/02/2012			340
1Dor4-1	17/02/2012			260
1Dor4-2	17/02/2012			220
1Cer5-1	17/02/2012			200
1Cer5-2	17/02/2012			100
1Vil6-1	20/02/2012	Picardie	45-50 ans	200
1Vil6-2	20/02/2012	Picardie	45-50 ans	400
1Véz7-1	20/02/2012	Picardie		20
1Véz7-2	20/02/2012	Picardie		60
1Véz7-3	20/02/2012	Picardie		20
1Har8-1	20/02/2012	Picardie		60
1Har8-2	20/02/2012	Picardie		160
1Rou9-1	21/02/2012	Picardie	>= 50 ans	280
1Rou9-2	21/02/2012	Picardie		280
1Nan10-1	21/02/2012	Picardie		280
1Nan10-2	21/02/2012	Picardie		100
1Béz11-1	22/02/2012	Picardie		240
1Béz11-2	22/02/2012	Picardie		240
1Fèr12-1	22/02/2012	Picardie		100
1Lon13-1	23/02/2012	Picardie		280
1Lon13-2	23/02/2012	Picardie		180

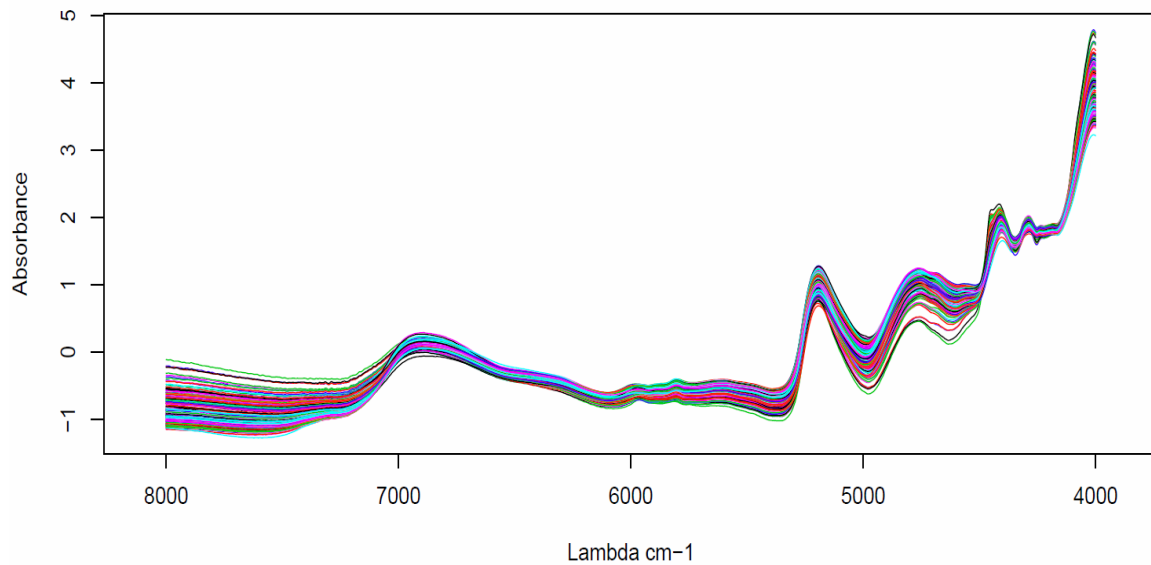
1Mon14-1	23/02/2012	Picardie		140
1Mon14-2	23/02/2012	Picardie		20
1Mon15-1	27/02/2012		40 ans env.	200
1Mon15-2	27/02/2012			100
1Mon16-1	01/03/2012			340
1Mon16-2	01/03/2012			420
1Mon16-3	01/03/2012			480
1Clé17-1	01/03/2012			200
1Clé17-2	27/02/2012			380
1Vei18-1	01/03/2012			360
1Esv19-1	28/02/2012			220
1Esv19-2	28/02/2012			220
1Cou20-1	29/02/2012			240
1Cou20-3	29/02/2012			120
1Cha21-1	29/02/2012			540
1Ple22-1	05/03/2012			340
1Ple22-2	05/03/2012			280
1Ciz23-1	06/03/2012			160
1Mon24-1	06/03/2012			420
1Sai25-1	06/03/2012			180
1Mai26-1	07/03/2012			440
1Mai26-2	07/03/2012			280
1Par27-1	07/03/2012			240
1Par27-2	07/03/2012			220
1Flè28-1	07/03/2012			380
1Flè28-2	07/03/2012			240
1Vaa29-1	07/03/2012			40
1Mah30-1	08/03/2012	Normandie		160
1Cha31-1	08/03/2012	Normandie		280
1Pou32-1	08/03/2012	Normandie	20-25 ans	320
1Vau33-1	08/03/2012	Normandie		360
1Vau33-2	08/03/2012	Normandie		200
1Gue34-1	12/03/2012	Poitou Charente		280
1Gue34-2	12/03/2012	Poitou Charente		320
1Gue34-3	12/03/2012	Poitou Charente		140
1Sér35-1	13/03/2012	Poitou Charente		380
1Sér35-2	13/03/2012	Poitou Charente		380
1Bou36-1	13/03/2012	Poitou Charente		180
1Bou36-2	13/03/2012	Poitou Charente		380
1Sua37-1	14/03/2012	Poitou Charente		520
1Sua37-2	14/03/2012	Poitou Charente		560
1Sua37-3	14/03/2012	Poitou Charente		400
1Che38-1	14/03/2012	Poitou Charente		140
1Bea39-1	14/03/2012	Poitou Charente		540
1Bea39-2	14/03/2012	Poitou Charente		580
1Sai40-1	15/03/2012	Poitou Charente		180
1Sai40-2	15/03/2012	Poitou Charente		480
1Sai40-3	15/03/2012	Poitou Charente		520
1Sai41-1	15/03/2012	Poitou Charente		180
1Sai41-2	15/03/2012	Poitou Charente		340
1Sai41-3	15/03/2012	Poitou Charente		620
1Gai42-1	16/03/2012	Normandie		160
1Gai42-2	16/03/2012	Normandie		160
1Mel43-1	20/03/2012	Picardie		180
1Mel43-2	20/03/2012	Picardie		160
1Boi44-1	12/04/2012			280

2Aux1-3	10/04/2012	Champagne-Ardenne	NR	340
2Aux1-4	10/04/2012	Champagne-Ardenne	NR	480
2Aux1-5	10/04/2012	Champagne-Ardenne	NR	400
2Bra1-1	13/02/2011	Bourgogne	40-70	140
2Bra1-2	14/02/2011	Bourgogne	40-70	200
2Mon1-1	10/04/2012	Champagne-Ardenne	NR	480
2Mon2-1	10/04/2012	Champagne-Ardenne	NR	440
2Mon2-2	10/04/2012	Champagne-Ardenne	NR	80
2Fre3-1	11/04/2012	Champagne-Ardenne	20	400
2Fre3-3	11/04/2012	Champagne-Ardenne	20	180
2Fre3-4	11/04/2012	Champagne-Ardenne	30	460
2Oue3-1	27/03/2012	Bourgogne	30	540
2Oue3-2	27/03/2012	Bourgogne	30	280
2Oue3-3	27/03/2012	Bourgogne	30	420
2Bon4-1	27/03/2012	Bourgogne	35	200
2Bon4-2	27/03/2012	Bourgogne	35	480
2Bon4-3	27/03/2012	Bourgogne	35	240
2Cha4-2	12/04/2012	Champagne-Ardenne	NR	220
2Ger6-1	15/02/2012	Bourgogne	35	60
2Lou7-1	28/03/2012	Bourgogne	25	380
2Lou7-2	28/03/2012	Bourgogne	25	480
2Stg8-1	15/02/2012	Bourgogne	NR	280
2Stg8-2	15/02/2012	Bourgogne	NR	60
2Ger9-1	15/02/2012	Bourgogne	27	380
2Ger9-2	15/02/2012	Bourgogne	30	520
2Mel10-1	21/02/2012	Franche-Comté	15	260
2Mel11-1	21/02/2012	Franche-Comté	20	220
2Lie12-1	22/02/2012	Franche-Comté	45	80
2Lie12-2	22/02/2012	Franche-Comté	45	180
2Lie12-3	22/02/2012	Franche-Comté	45	420
2Lie12-4	22/02/2012	Franche-Comté	45	220
2Lie12-6	22/02/2012	Franche-Comté	45	80
2Aut13-1	22/02/2012	Franche-Comté	60	300
2Aut13-2	22/02/2012	Franche-Comté	60	320
2Aut13-3	22/02/2012	Franche-Comté	60	180
2Aut13-4	22/02/2012	Franche-Comté	60	200
2Aut13-5	22/02/2012	Franche-Comté	60	180
2Aut13-6	22/02/2012	Franche-Comté	60	140
2Rig14-1	22/02/2012	Franche-Comté	40	140
2Rig14-2	22/02/2012	Franche-Comté	40	500
2Rig14-3	22/02/2012	Franche-Comté	40	300
2Rig14-4	22/02/2012	Franche-Comté	40	40
2Rig14-5	22/02/2012	Franche-Comté	40	260
2Ley15-1	27/02/2012	Rhône-Alpes	20	520
2Ley15-2	27/02/2012	Rhône-Alpes	20	480
2Ley15-3	27/02/2012	Rhône-Alpes	20	420

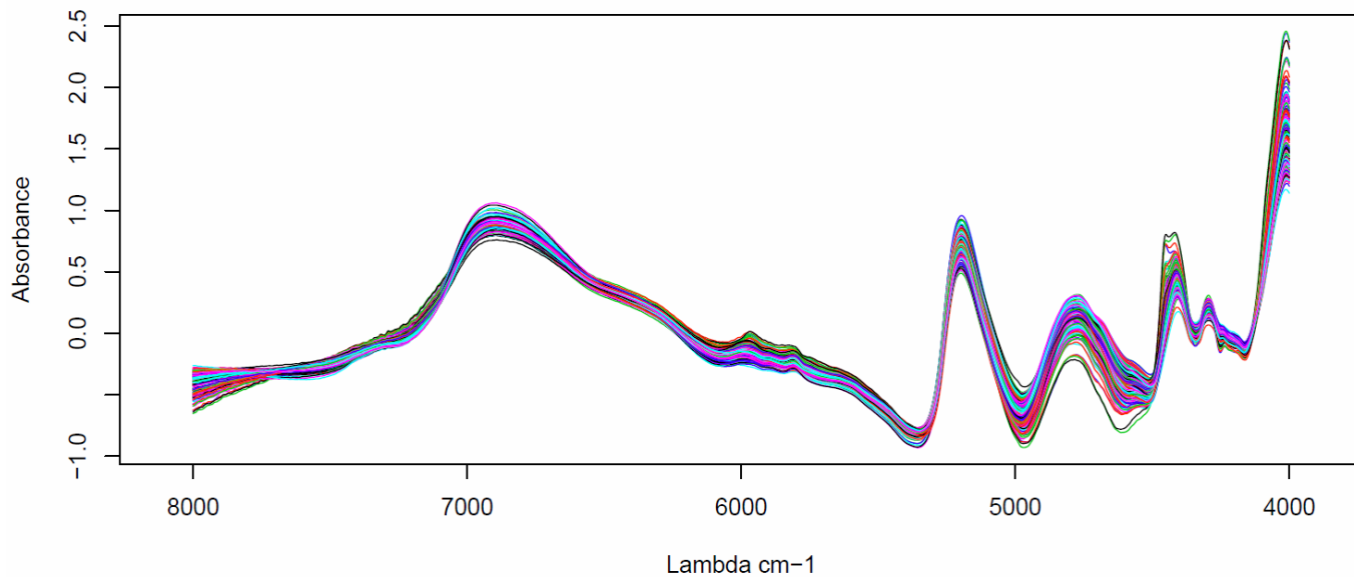
2Ley15-4	27/02/2012	Rhône-Alpes	20	480
2Juj16-1	28/02/2012	Rhône-Alpes	40	440
2Juj16-2	28/02/2012	Rhône-Alpes	40	240
2Juj17-1	01/03/2012	Rhône-Alpes	40	100
2Juj17-2	01/03/2012	Rhône-Alpes	35	180
2Bel18-1	29/02/2012	Rhône-Alpes	25	120
2Bel18-2	29/02/2012	Rhône-Alpes	40	80
2Bel19-1	29/02/2012	Rhône-Alpes	30	40
2Bel19-2	29/02/2012	Rhône-Alpes	30	60
2Bel20-1	29/02/2012	Rhône-Alpes	30	180
2Aut21-1	02/03/2012	Bourgogne	35-40	100
2Aut21-2	02/03/2012	Bourgogne	40	120
2Aut22-1	02/03/2012	Bourgogne	25-30	80
2Mon23-1	02/03/2012	Bourgogne	45	100
2Mon23-2	02/03/2012	Bourgogne	45	80
2Hdc24-1	05/03/2012	Lorraine-Alsace	30	400
2Hdc24-2	05/03/2012	Lorraine-Alsace	40-45	220
2Hdc24-3	05/03/2012	Lorraine-Alsace	40	160
2Lou25-1	05/03/2012	Lorraine-Alsace	25-30	180
2Sai26-2	06/03/2012	Lorraine-Alsace	NR	340
2Sau27-1	07/03/2012	Lorraine-Alsace	45-50	100
2Sau27-2	07/03/2012	Lorraine-Alsace	45-50	120
2Tou28-1	07/03/2012	Lorraine-Alsace	20	300
2Die29-1	07/03/2012	Lorraine-Alsace	20	240
2Die29-2	07/03/2012	Lorraine-Alsace	20	320
2Kir30-1	08/03/2012	Lorraine-Alsace	15	180
2Kir30-2	08/03/2012	Lorraine-Alsace	15	240
2Kir30-3	08/03/2012	Lorraine-Alsace	30	80
2Bos31-1	08/03/2012	Lorraine-Alsace	40	360
2Bos31-2	08/03/2012	Lorraine-Alsace	40	300
2Wes32-1	08/03/2012	Lorraine-Alsace	40	240
2Gue33-1	08/03/2012	Lorraine-Alsace	40	200
2Rou34-1	09/03/2012	Lorraine-Alsace	35-40	280
2Rou34-2	09/03/2012	Lorraine-Alsace	35-40	300
2Voe35-1	09/03/2012	Lorraine-Alsace	45	400
2Voe35-2	09/03/2012	Lorraine-Alsace	35-40	400
2Arc36-1	15/03/2012	Franche-Comté	40	100
2Arc36-2	15/03/2012	Franche-Comté	25-30	320
2Arc36-3	15/03/2012	Franche-Comté	30	80
2Tor37-1	12/03/2012	Franche-Comté	30	380
2Tor37-2	12/03/2012	Franche-Comté	30	180
2Tor37-3	12/03/2012	Franche-Comté	30	100
2Tor37-4	12/03/2012	Franche-Comté	30	80
2Amb38-1	22/03/2012	Rhône-Alpes	40	360
2Amb38-2	22/03/2012	Rhône-Alpes	40	200
2Amb38-3	22/03/2012	Rhône-Alpes	40	300
2Vil39-1	20/03/2012	Rhône-Alpes	50	220
2Vil39-2	20/03/2012	Rhône-Alpes	50	220
2Vil39-3	22/03/2012	Rhône-Alpes	30	300
2App41-1	31/03/2012	Bourgogne	30	460
2Cha43-1	06/04/2012	Lorraine-Alsace	NR	340
2Fon44-1	12/04/2012	Champagne-Ardenne	NR	20

Annexe 2 : Spectres PIR après les différents traitements mathématiques

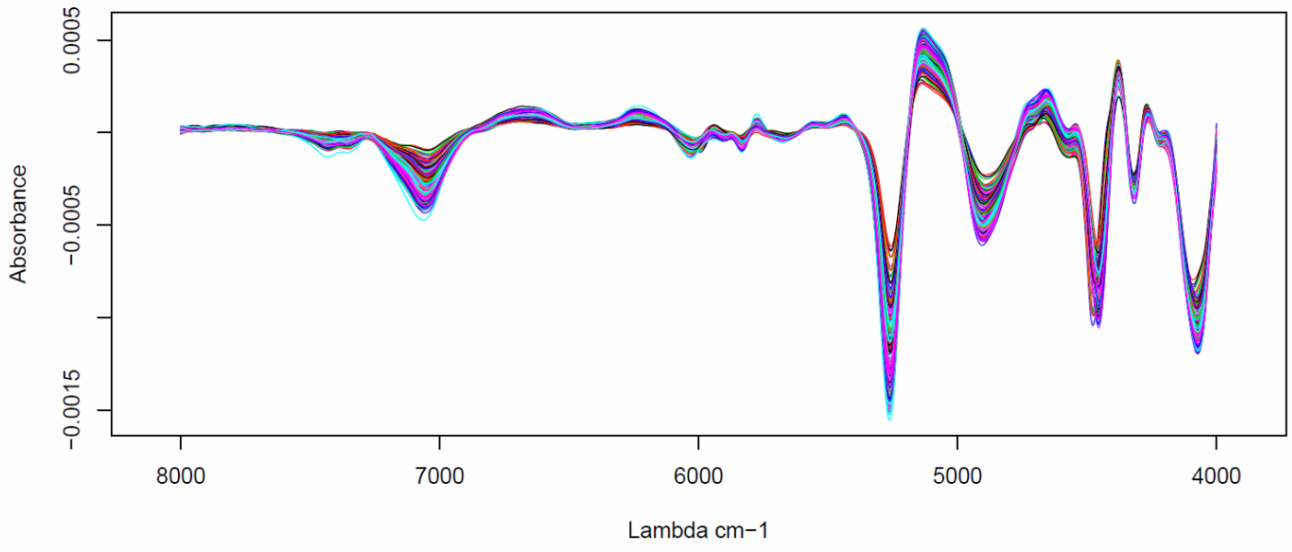
norm



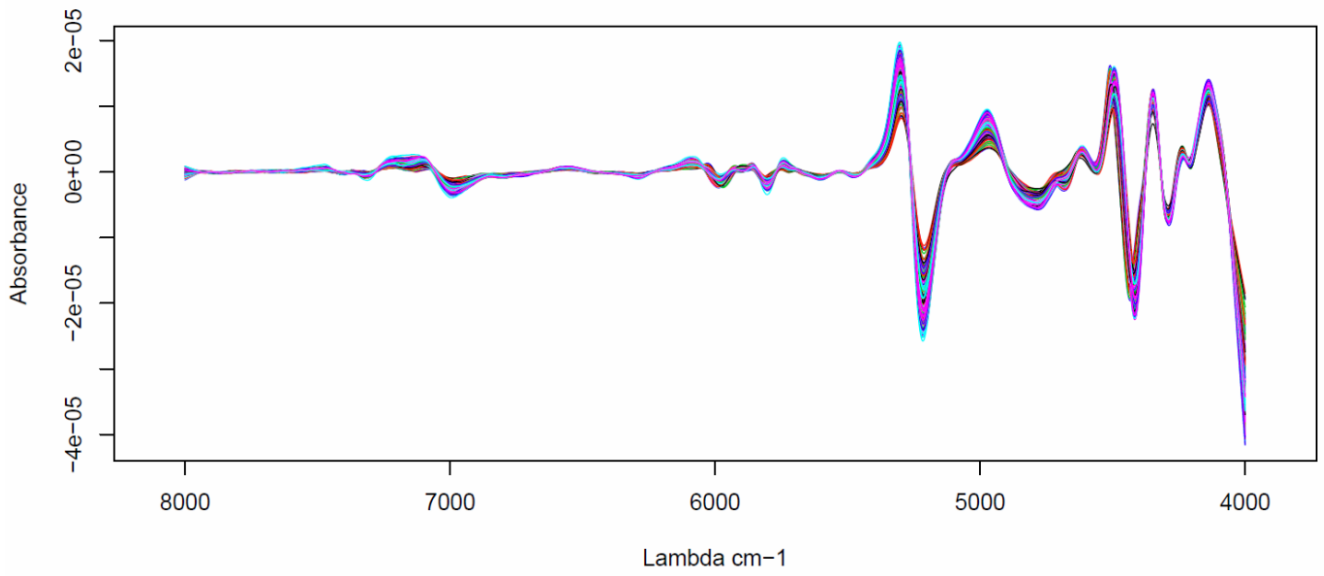
dt



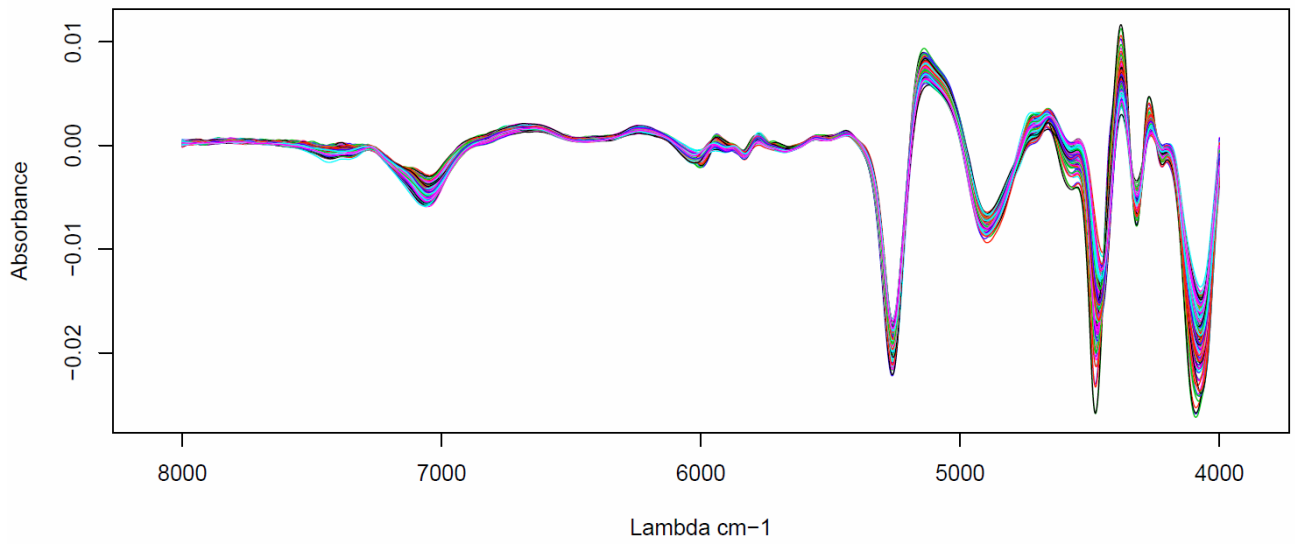
der1



der2



norm_der1



norm_der2

