



Validation de modèles de calibration en
spectrométrie proche infra rouge.
Dosage de la cellulose et des lignines
dans le bois de
peuplier hybride *Deltoïdes xTrichocarpa*.

Sandy JOUET

Stage du 7 janvier au 6 mars

Deuxième année BTS Biotechnologies

Lycée Jacques Monod

45803 ST Jean de Braye ; rue Léon Blum

2012-2013

Maitre de stage : Jean-Paul Charpentier

Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestières

Centre INRA Orléans

2163 Ardon ; av.de la pomme de pin



Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier M. Gilles Pilate, directeur de l'unité de recherche amélioration génétique et physiologie forestière, de m'avoir accueillie durant ces huit semaines de stage.

Je remercie également mon maître de stage M. Jean-Paul Charpentier, ingénieur de recherche et responsable du plateau technique Genobois, d'une part car il a su trouver un sujet intéressant et valorisant dans le cadre de mes études, d'autre part pour sa disponibilité et les explications enrichissantes qu'il a pu m'apporter.

Je voudrais témoigner de ma reconnaissance à M. Kevin ADER, technicien de laboratoire, pour m'avoir encadrée, transmettre ses savoirs pour réaliser les différents dosages.

Je souhaiterais aussi remercier M. Segura Vincent, chercheur statisticien et Mlle Serin Elise, étudiante en deuxième année de master, pour m'avoir fourni le modèle de calibration.

Enfin ma reconnaissance va également à tous les membres de l'unité d'AGPF d'Orléans pour son aide et sa collaboration tout au long de mon stage.

Sommaire :

I) Introduction :

1) <i>Introduction sur le laboratoire</i> :	1
1.1) L'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) :	1
1.2) Le centre d'Orléans :	2
a). Unité d'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières :	3
b). Le plateau technique Génobois :	4
2) <i>Introduction scientifique</i> :	5
2.1) Le projet européen Tree For Joules (T4J) :	5
2.2) Le peuplier :	6
2.3) Constituants chimiques de la paroi végétale du bois :	7
a). La biomasse lignocellulosique :	7
b). Les lignines :	7
c). La cellulose :	7
d). L'hémicellulose :	8
2.4) Objectifs du stage :	8

II) Matériel et méthodes :

1) <i>Le matériel d'étude</i> :	9
1.1) Les différents clones et échantillonnages :	9
1.2) Broyage et tamisage :	9
2) <i>Méthodes d'extraction des différents composés du bois</i> :	9
2.1) Préparation du résidu pariétal :	9
a). Principe :	10
b). Mode opératoire :	10
2.2) Dosage des lignines :	10
a). Principe :	10
b). Mode opératoire :	11
2.3) Dosage de la cellulose :	12
a). Principe :	12
b). Mode opératoire :	12
3) <i>La Spectrométrie Proche Infrarouge</i> :	14

III) Résultats et discussions :

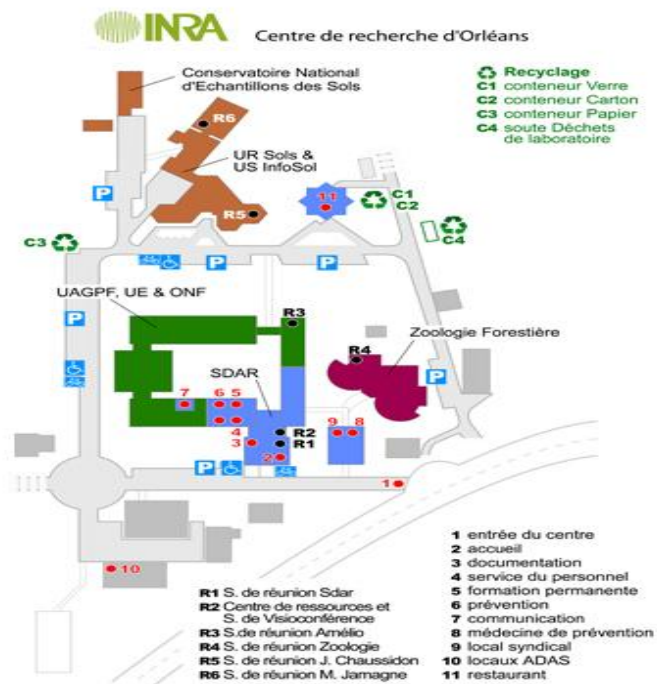
1) <i>Répartition des constituants chimiques structuraux du bois de peuplier hybride</i> :	15
1.1) Extractibles :	15
1.2) Lignines :	15
1.3) La cellulose :	16
2) <i>Corrélation des données chimiques avec les spectres proches infra rouge dans le but de la construction de modèles de calibration</i> :	17
2.1) Logiciel et méthode de corrélation :	17
2.2) Etude des modèles :	18
Conclusion scientifique et personnelle	19; 20

Figure 1 : Vue aérienne du centre INRA d'Orléans (2007) :



Photo : © INRA J.-C. Bastien & O. Berte

Figure 2 : Plan du centre d'Orléans :



© Inra 2011, O. Bertel

I. Introduction :

1) Introduction sur le laboratoire :

1.1) L'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) :

L'INRA fut fondé en 1946 dans un contexte de reconstruction d'après guerre et de modernisation de l'agriculture. Celui-ci est aujourd'hui un organisme français figurant comme le premier institut européen de recherche agronomique et le deuxième dans le monde notamment grâce à ses nombreuses publications en sciences agricoles, plantes et animales. Cet EPST (Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique) est placé sous la double tutelle du ministère délégué à l'Enseignement supérieur et à la Recherche ainsi que du ministère de l'Agriculture et de la Pêche, depuis 1984.

L'INRA travaille sur des recherches visant à maintenir un développement durable. Ceci grâce à des travaux qui s'articulent autour d'un déploiement d'une alimentation saine et de qualité mise en place par une agriculture durable et compétitive tout en visant à préserver et à valoriser l'environnement par une meilleure gestion du territoire.

L'INRA a pour objectif de fournir et de diffuser des connaissances dans le domaine de l'environnement de l'agriculture et de l'alimentation. L'INRA se doit de transmettre son savoir faire, des différentes formations et promouvoir la culture scientifique à travers des débats de science et de société.

Les recherches de l'INRA sont regroupées sur quatorze départements scientifiques qui mobilisent 8478 chercheurs, ingénieurs et techniciens à plein temps. Ces départements sont répartis sur dix-neuf centres régionaux qui travaillent sur vingt-et-un pôles scientifiques. Ceci représente 381 unités (218 unités de recherche, 52 unités expérimentales, 75 unités d'appui à la recherche, et 11 unités de service).

De plus, l'INRA entretient de bons rapports scientifiques avec de grands laboratoires français tels que le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) notamment grâce à la création d'Agreenium en 2009, de l'INSERM (Institut National de la Recherche Médicale), mais aussi avec de nombreux instituts européens.

L'INRA possède aussi de forts moyens budgétaires qui s'élèvent à 845 millions d'euros en 2012. Soixante-dix pour cent de cette somme furent consacrées aux charges salariales. Les ressources financières sont obtenues auprès de l'Etat (35% en 2011) et par des contrats et des conventions de recherches (65% en 2011).

Figure 3 : Organigramme de répartition des unités de l'INRA :

unités (381)

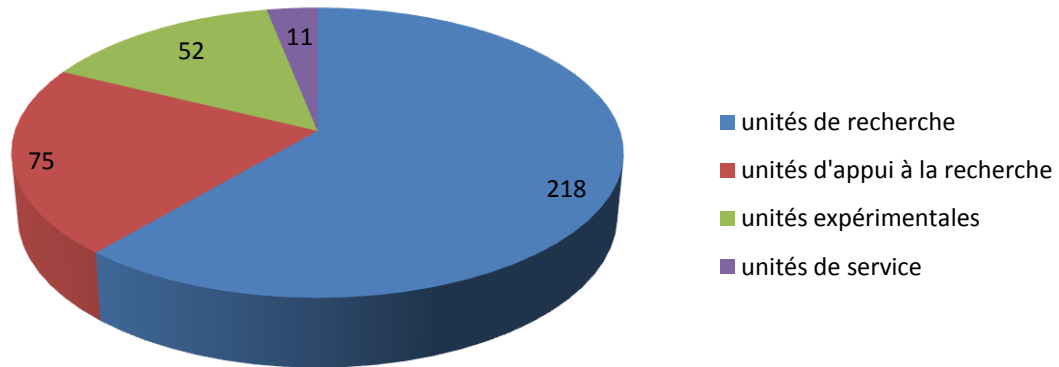
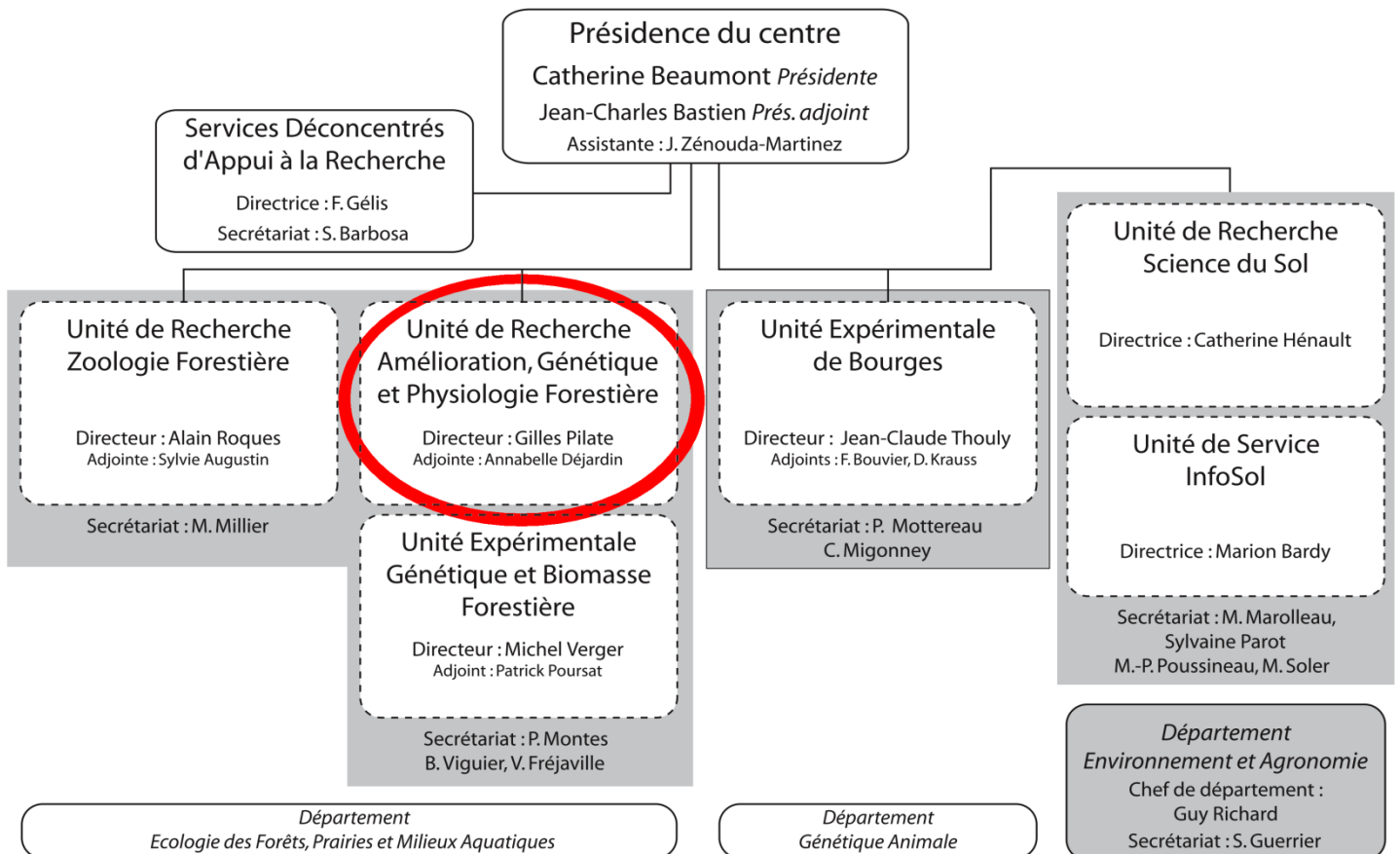


Figure 4 : Organigramme du centre INRA d'Orléans :



1.2) Le centre d'Orléans :

Le premier janvier 2013, le centre d'Orléans a fusionné avec celui de Tours et est devenu le centre du Val de Loire. L'INRA d'Orléans (figure 1) fut créé en 1972, il inclut également un domaine d'expérimentation animale près de Bourges et un service administratif SDAR (Service D'Appui à la Recherche) à côté de 3 unités de recherches. Ce centre compte environ deux-cents personnes titulaires et accueille un bon nombre d'étudiants (BTS à Master) et de contractuels (CDD, thésard et post-doc). Le site de l'INRA d'Orléans s'étend sur 63 hectares dont 35 de pépinières.

L'INRA d'Orléans a centré ses recherches autour de la forêt, du sol et des animaux d'élevages. Ces grands axes de recherches sont exploités par six unités (figures 2, 3 et 4) :

- l'unité de recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF) mène des études sur les arbres forestiers afin d'exploiter au mieux leurs ressources. Pour cela les chercheurs améliorent génétiquement les arbres, étudient leurs facultés d'adaptation, leur production de biomasse ; dans le but de fournir du bois pour de multiples usages tout en maintenant une forêt durable. L'unité accueille et collabore avec le Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers (CGAF) de l'Office National des Forêts (ONF) sur différents sujets de recherches.
- l'Unité de Recherche de Zoologie Forestière (URZF) a pour but de comprendre l'influence des effets environnementaux et humains sur des populations d'insectes pouvant nuire aux qualités du bois ou encore à la survie des forêts ; ceci tout en préservant la biodiversité.
- l'unité de recherche science du sol travaille sur les différentes propriétés des sols, leurs capacités de régénération, leurs évolutions et leur fonctionnement afin de mieux exploiter leurs avantages au profit d'une meilleure agriculture. Ceci tout en assurant la protection, la régénération des sols et le contrôle de leur teneur en substances polluantes.
- l'unité de service infosol : elle réalise et coordonne l'acquisition des données nécessaires à la constitution d'un système d'information sur les sols de France, permettant ainsi d'évaluer les aptitudes aux différents usages et de proposer un modèle pour mieux s'approprier leur gestion.
- l'unité expérimentale Génétique et Biomasse Forestières d'Orléans (GBFOr) travaille sur la description, la diversité génétique des différentes espèces forestières afin d'estimer par exemple la résistance, la croissance et la qualité du bois, pour produire de façon durable de la biomasse forestière.
- l'unité expérimentale de Bourges travaille sur la sélection des animaux reproducteurs résistants aux maladies et portant des caractères intéressants pour une filière précise afin d'améliorer les rendements en viande ou en lait.

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

Organigramme de l'unité AGPF (31 Janvier 2013)

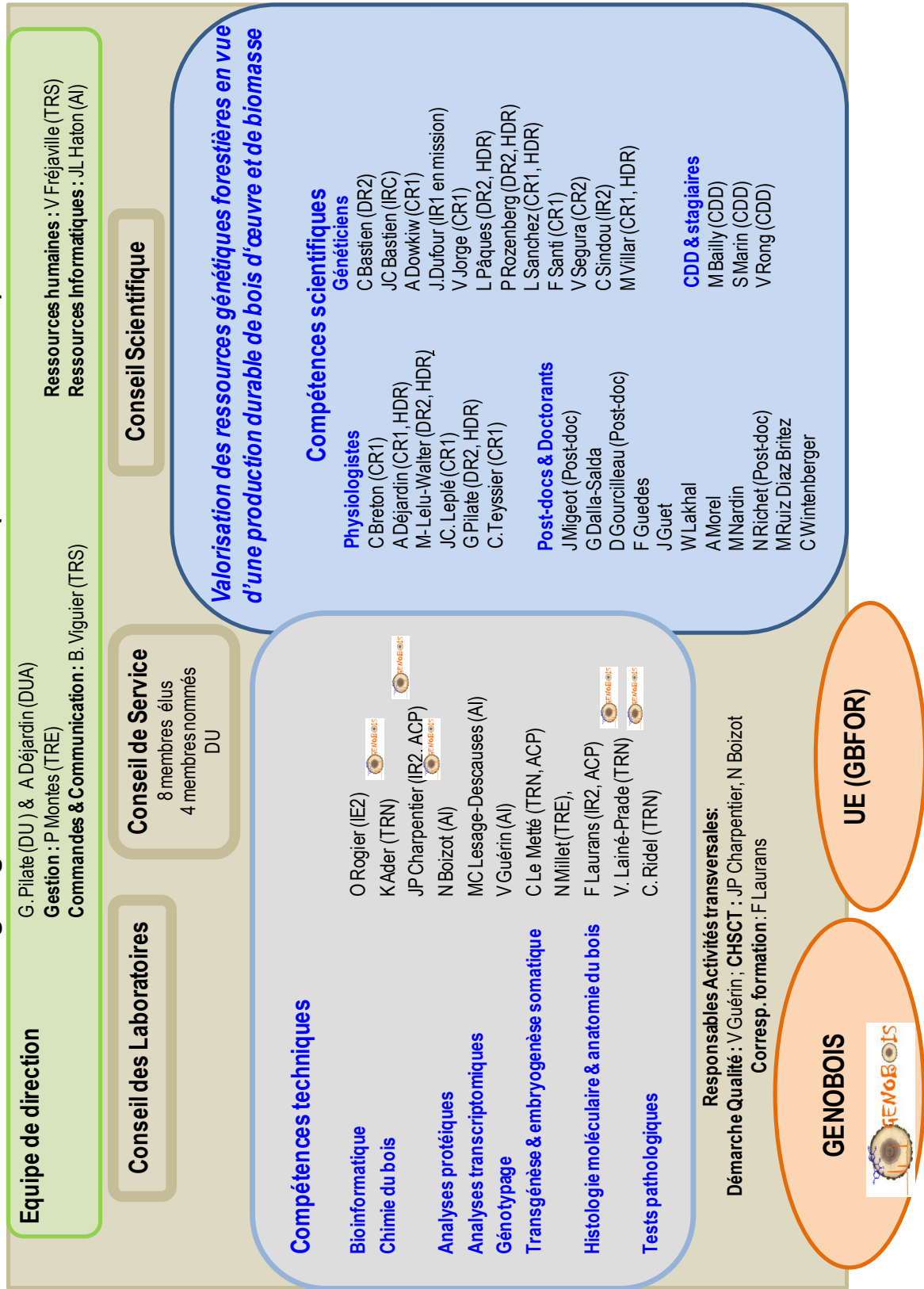


Figure 5 : Organigramme de l'unité AGPF :

techniques et collectifs. De plus, le centre d'Orléans emploie 186 agents titulaires et 144 agents non titulaires (2011).

Pour l'année 2012, le budget du centre orléanais s'est élevé à 12,3 millions d'euros dont 1,6 venant de l'Etat, 1,7 ajoutés par les contrats et conventions de recherche et pour finir 9 millions d'euros en contrats de recherche pour les centres d'Orléans et Tours en 2013.

Mon stage s'est déroulé au sein de l'unité d'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF)

a). Unité d'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières :

L'unité de recherche AGFP (figure 5) dans laquelle travaillent environ quarante personnes est dirigée par M Gilles Pilate. Cette unité qui interagit avec trois autres unités locales (l'unité Génétique et Biomasse Forestières (GBFOR), l'Office National des Forêts (ONF) et l'unité Arbre et Réponses aux Contraintes Hybrides et Environnementales de l'université d'Orléans (ARCHE) concentre ses travaux sur l'étude des caractères physiologiques, génétiques et génomiques des espèces végétales forestières. Plus précisément sur six espèces qui sont : le frêne, le douglas, le merisier, le pin sylvestre, le mélèze et le peuplier.

L'Unité de Recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières cherche à valoriser les différentes compétences du bois, afin de produire au mieux le bois brut et la biomasse sans pour autant créer un fort impact écologique. Pour cela, l'unité prend en compte de nombreux phénomènes comme les changements climatiques, les interactions pouvant exister entre les variétés améliorées et les populations sauvages correspondantes. Afin de mener à bien ces recherches, l'unité s'appuie principalement sur une espèce modèle, le peuplier, et utilise des méthodes de biologie intégrative pour mieux comprendre de nombreux caractères complexes participant au développement du bois ou à sa résistance sur le plan environnemental comme des propriétés du bois, la résistance aux agents pathogènes, l'aptitude à utiliser peu d'eau, la croissance. Ceci amène donc l'unité à mettre en œuvre la construction du meilleur phénotype pour les arbres.

b). Le plateau technique Génobois :

Le bois, capable d'offrir de nombreux avantages sous toutes ses formes, est aujourd'hui devenu l'un des programmes majoritaires de recherche et projets développés à l'INRA d'Orléans. C'est donc à la demande du département Ecologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques (EFPA) que le plateau technique Génobois a vu le jour en 2008 et a été labellisé par la Commission Nationale des Outils Communs (CNOC) de l'INRA pour rentrer en activité en 2009. Celui-ci a comme principal objectif de répondre aux besoins expérimentaux de phénotypage en masse des propriétés physico-chimiques du bois. Génobois est dirigé par M. Jean-Paul Charpentier et comprend huit personnes réparties dans différents ateliers et laboratoires.

Génobois regroupe les compétences sur l'étude du bois réparties sur deux unités de l'INRA, localisées à Orléans (AGPF et GBFOR) et à l'INRA de Bordeaux (BIOGECO) et constitue un outil pour progresser dans l'analyse de grandes problématiques sur la productivité et la qualité du bois d'arbre forestier, l'influence de l'amélioration génétique sur la productivité et la qualité des arbres forestiers, l'influence des changements globaux sur le fonctionnement et les caractéristiques des arbres.

Ces objectifs scientifiques font appel à des travaux de biochimie, de biologie moléculaire et cellulaire, de dendrochronologie, d'anatomie, d'histologie, de préparation et de traitement du bois en général.

Le plateau technique Génobois offre toutes les mesures, analyses et caractérisations des propriétés physico-chimiques du bois sur plusieurs centaines ou milliers d'échantillons.

Le plateau technique Génobois est équipé d'un broyeur à couteaux et de tamiseurs afin de préparer les échantillons. Il est aussi habilité à effectuer des mesures mécaniques et physiques comme la masse volumique ou la rigidité du bois. L'utilisation d'appareils d'imagerie haut débit révèle l'anatomie du bois. Cette technique est approfondie par un microdensitomètre à rayons X qui permet d'évaluer les variations de densité des échantillons. De plus, les bois sont analysés par immunomarquages, microscopie optique, spectrométrie proche infra rouge. Enfin les dosages des extractibles et des sucres sont obtenus par dosages biochimiques.

J'ai effectué mon stage au sein du plateau technique Génobois, plus particulièrement dans le laboratoire de chimie du bois qui effectue les dosages sur les constituants du bois tels que les extractibles, les lignines et la cellulose.

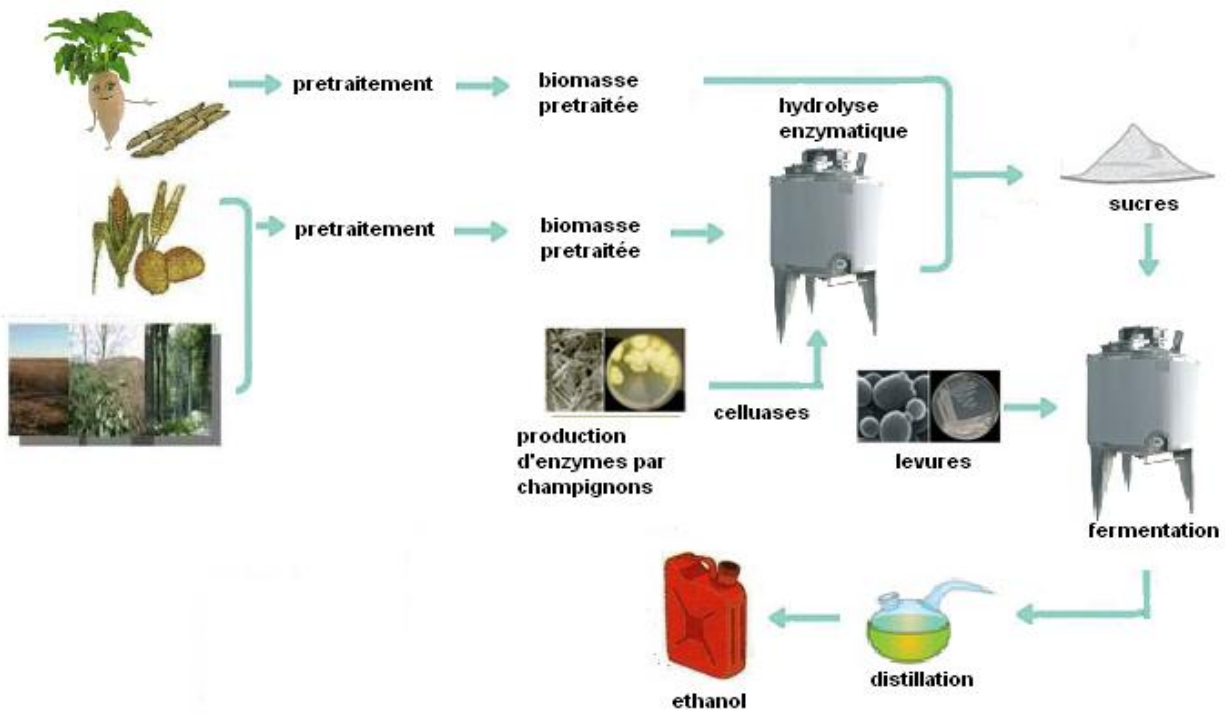


Figure 6 : Procédés de fabrication du bioéthanol :

2) Introduction scientifique :

2.1) Le projet européen Tree For Joules (T4J) :

Le projet T4J fut créé pour répondre à une problématique de taille et de plus en plus importante, celle des ressources renouvelables. Face à une raréfaction inévitable des énergies fossiles comme le charbon, le pétrole et face aux problèmes de pollution entraînés par leurs utilisations, les chercheurs se penchent sur la création de nouvelles alternatives : les ressources renouvelables.

L'objectif à long terme de ces recherches est donc de remplacer les énergies fossiles par d'autres énergies pouvant apporter les mêmes bénéfices tout en étant plus écologiques comme les biocarburants. Cela permettrait aussi aux Etats d'accroître leur indépendance énergétique pour renforcer leur compétitivité. Ce projet fut donc construit pour répondre à un enjeu mondial, principalement ciblé sur l'élaboration de biocarburant, car aujourd'hui le pétrole représente 40% de la consommation mondiale en énergie primaire avec l'utilisation d'environ 115 milliards de litres de pétrole consommés par an en France (chiffres 2011).

De nos jours, il existe déjà du bioéthanol disponible sur le marché (figure 6): le bioéthanol de première génération. Il s'agit de biocarburant (carburant issu de la biomasse) obtenu par la transformation en alcool des sucres de réserve des plantes sucrières et amylacées (amidon). Pour cela, sont utilisés : les sucres de canne, de betterave et des oléagineux (plantes possédants des graines ou des fruits riches en matière grasses). Le développement de cette énergie semble être un remède aux problèmes actuels ; cependant, cette nouvelle technologie est limitée du fait qu'elle utilise des matières premières servant à l'alimentation et à l'affourage. La solution la plus écologique serait d'utiliser la biomasse ne servant pas à l'approvisionnement alimentaire avec une mise en œuvre utilisant des procédés biologiques.

Le projet T4J a donc vu le jour en 2011; prévu sur quatre ans, il est porté par quatre pays partenaires, la France et l'Espagne, avec chacune quatre laboratoires et/ou universités impliqués, le Portugal avec trois instituts et l'Allemagne avec deux établissements.

L'objectif global du projet est d'identifier les facteurs majeurs soutenant les propriétés physicochimiques de la paroi cellulaire afin de produire durablement des biocarburants de deuxième génération. Cette méthode de fabrication porte le nom de biomasse lignocellulosique, c'est-à-dire qu'elle s'appuie sur la présence des lignines et des celluloses (composants abondants dans les parois des cellules végétales) pour produire le bioéthanol. Cette technique a pour principe de dégrader la cellulose afin de libérer des sucres simples comme le glucose puis de le transformer en alcool.

Il existe deux techniques de production du bioéthanol. La première technique nécessite de l'acide afin d'hydrolyser la cellulose et l'hémicellulose, cette attaque à l'acide sulfurique se fait à deux températures différentes. A chaque stade de l'hydrolyse, les sucres ainsi obtenus sont récupérés pour être par la suite fermentés en éthanol. La lignine et la cellulose résiduelles qui ne sont donc pas hydrolysées produiront de l'électricité ou de la vapeur.

La deuxième méthode utilise des procédés biologiques comme la cellulase des champignons préalablement sélectionnés afin de procéder à la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose.

Figure 7 : Taillis à courte rotation :



Figure 8 : Taillis à très courte rotation :



La lyse ainsi faite, on obtient en fin de réaction des sucres en C5 qui serviront à la production des champignons et des sucres en C6. Les oses récupérés subissent ensuite une fermentation. C'est ce procédé que développe T4J car il est plus économique (car la survie des champignons est assurée à chaque hydrolyse en récupérant les sucres C5 obtenus, *a contrario* l'acide sulfurique ne peut être gardé après son action) et il est moins énergivore.

2.2) Le peuplier :

Du genre *populus*, cette essence d'arbre est répartie sur six sections (espèces ayant des caractéristiques morphologiques et écologiques proches), il est diploïde et possède dix-neuf chromosomes ($2n=38$). Le peuplier est un arbre dioïque c'est-à-dire que les fleurs mâles et femelles se retrouvent sur des pieds différents.

Il possède une croissance rapide et une grande dimension (25 à 30m) mais sa longévité est assez courte (70 à 80 ans). Ces caractéristiques sont exploitées de façon à cultiver le peuplier rapidement et à forte densité afin de produire le maximum de biomasse ligneuse par unité de surface. Pour cela, les producteurs mettent en place des cultures en Taillis à Courte Rotation (TCR ; figure 7) où l'arbre est coupé tous les 7 à 10 ans ou bien en TTCR (Taillis à Très Courte Rotation ; figure 8) pour lequel l'arbre est coupé tous les trois ans. Ce sont des espèces hybrides que l'on utilise pour ce genre de plantations, hybrides entre une espèce américaine et une européenne ou entre deux espèces américaines. En France, la répartition du peuplier hybride de plantation occupe environ 250 000 ha, soit 1,6% des surfaces forestières et produisent 1,5 millions de mètres cubes de bois.

On le retrouve principalement dans le nord de la France et dans l'ouest où il s'est développé ces douze dernières années. C'est en France que le développement du peuplier occupe la plus grande surface en comparaison avec les autres pays de l'Europe.

On distingue trois espèces naturellement implantées sur le territoire français, le peuplier noir (*Populus nigra*), le peuplier tremble (*Populus tremula*) et le peuplier blanc (*Populus alba*) et deux espèces provenant d'Amérique : *Populus deltoïdes* et *Populus trichocarpa* qui servent pour la majeure partie des hybrides utilisés en Europe. Pour des raisons de croissance et de résistance aux maladies, des hybrides entre *P. nigra* et *P. deltoïdes* sont maintenant utilisés notamment en France.

Figure 9 : Représentation schématique des composants de la paroi cellulaire végétale des biomasses lignocellulosiques (d'après Shleser, 1994) :

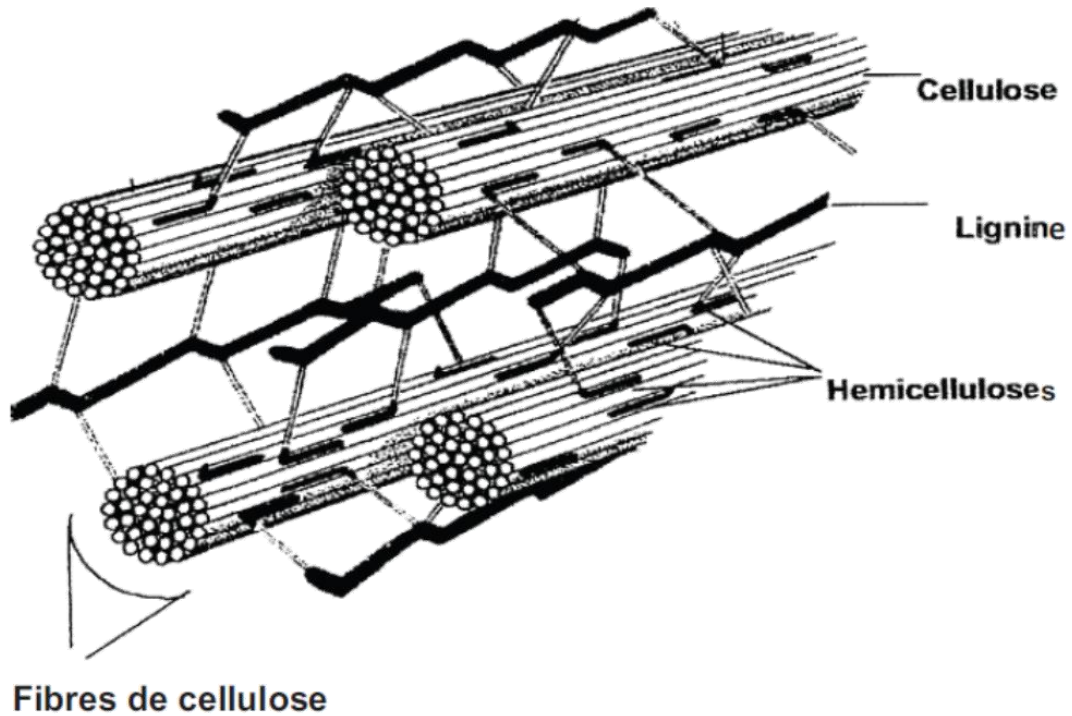
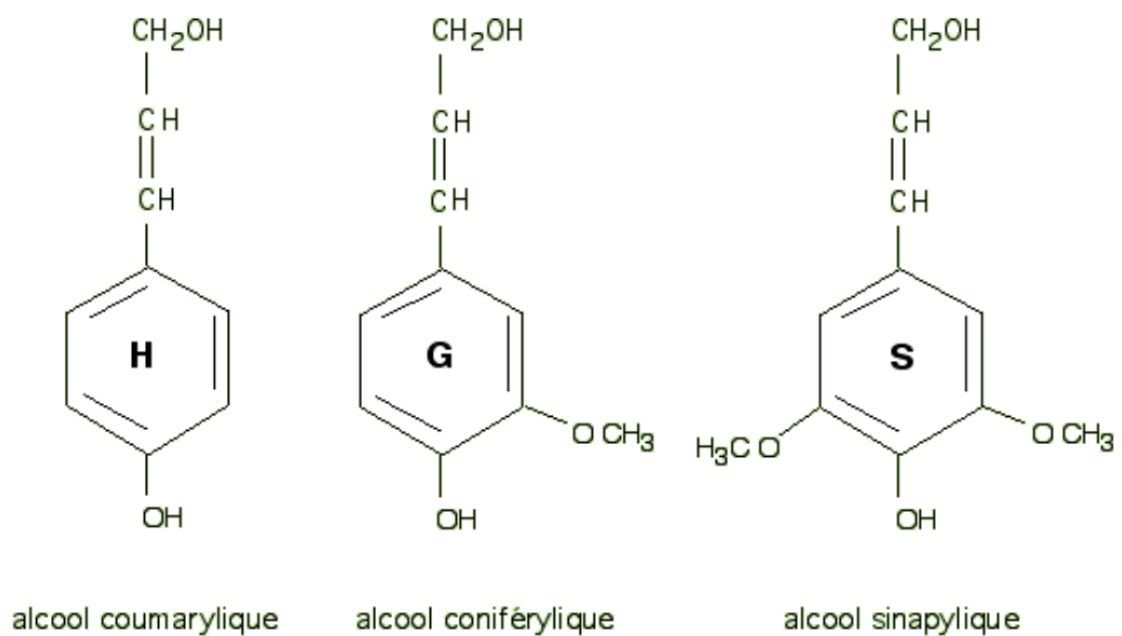


Figure 10 : Les trois monomères constitutifs de la chaîne de lignine : (Biologie et Multimédia- université Pierre et Marie Curie)



2.3) Constituants chimiques de la paroi végétale du bois :

Le bois est constitué de trois principaux composants : la cellulose (65 à 80 %) et la lignine (20 à 35 %) et hémicellulose. La cellulose constitue les fibres du bois orientées dans l'axe de l'arbre. La lignine est une substance complexe qui s'incruste dans les parois des fibres (figure 9).

a). La biomasse lignocellulosique :

Cette biomasse que l'on retrouve dans le bois, la paille ou les herbacés est exclusivement composée de lignine, de cellulose et d'hémicellulose en proportion différente selon le végétal. Elle procure les différentes caractéristiques du bois comme sa résistance ou sa coloration. De nos jours, elle est utilisée dans différentes industries papetières ou pour la menuiserie courante (panneaux de particules). Cette source de carbone abondante et naturelle est la principale alternative au carbone fossile.

Les constituants de la biomasse lignocellulosique possèdent une organisation complexe qui donne aux cellules leur structure.

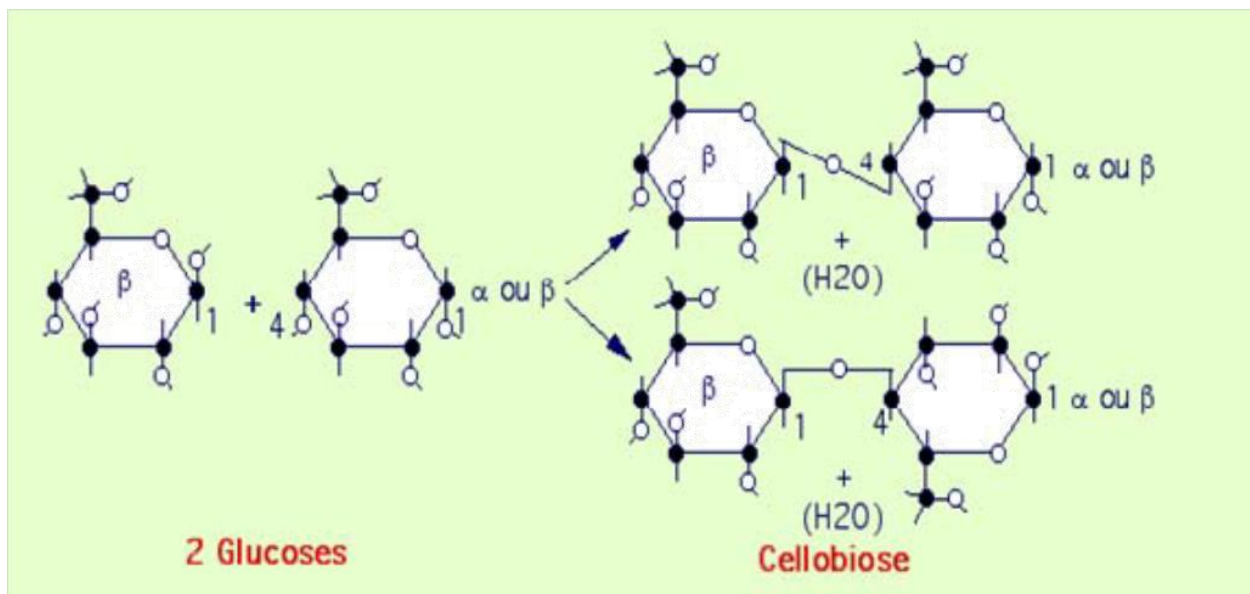
b). Les lignines :

Il existe deux types de lignines : les lignines solubles et les lignines insolubles aussi appelées lignines « Klason ». Principalement situées dans la paroi secondaire des cellules (paroi plus rigide que la paroi primaire et qui ne permet plus la croissance cellulaire), elles confèrent aux plantes une bonne solidité et un bon maintien car la lignine est résistante contre les compressions. Les lignines sont des polymères de composés chimiques organiques, composés d'un réseau tridimensionnel hydrophobe complexe ; l'unité de base de la lignine se résume essentiellement à une unité de phénylpropane. Il existe au moins trois types de monomères différents : l'alcool paracoumarylique, l'alcool coniférylique, l'alcool sinapylique (figure 10). De plus, grâce à sa propriété hydrophobe, la lignine possède un pouvoir d'imperméabilisation des cellules. Malgré sa grande variabilité au sein d'une espèce donnée due à l'environnement physico-chimique dans lequel le végétal croît, on emploie le terme général de lignines.

c). La cellulose :

La cellulose est le principal constituant du bois et le premier de la paroi primaire, elle procure des propriétés de solidité et d'élasticité au bois. La cellulose est un homopolymère linéaire composé de très nombreuses unités de glucose reliées entre elles par des liaisons glycosidiques β -(1→4). Le motif de répétition est le dimère cellobiose (figure 11).

Figure 11 : Configuration du cellobiose à partir de deux molécules de glucose dans la chaîne de cellulose : (Biologie et Multimédia- université Pierre et Marie Curie)



d). L'hémicellulose :

L'hémicellulose contribue au renforcement de la paroi primaire par interaction avec la cellulose, car c'est le deuxième constituant principal de la paroi pectocellulosique. Exclusivement constituée de sucres à six carbones (d'hexoses) et d'oses à cinq carbones (pentose), l'hémicellulose ne possède pas que du glucose. En outre, elle peut aussi être constituée de L-arabinose, D-xylose, D-mannose et de D-galactose en plus faibles proportions.

2.4) Objectifs du stage :

Dans le cadre du projet Tree For Joules, dans lequel on doit évaluer la qualité technologique du bois (sachant que la production de bioéthanol nécessite une forte teneur en cellulose et une faible teneur en lignines), j'ai pris en charge les analyses d'un sous échantillonnage (quarante-huit échantillons) d'une population de peupliers hybrides sélectionnée pour ce projet.

Mon objectif premier a été la mise en œuvre de dosages des extractibles, de la cellulose et des lignines, réalisés sur le bois de peupliers hybrides DxT issus du croisement des parents *Populus deltoïdes* et *Populus trichocarpa*. Cet hybride a été conçu pour coupler la résistance de *Populus trichocarpa* vis à vis de la maladie de la rouille foliaire provoquée par le champignon *Melampsora larici-populina* et la rapidité de croissance de *Populus deltoïdes*.

Mon deuxième objectif est d'utiliser les résultats de ces dosages des constituants chimiques du bois pour établir et consolider des modèles de calibration puis de prédiction en Spectroscopie Proche Infrarouge (SPIR) afin d'évaluer rapidement les propriétés du bois importantes dans des populations de cet hybride de peuplier et ainsi avoir un indicateur du potentiel de saccharification de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol.

Figure 12 : Tamiseuse :



II. Matériel et méthodes :

1) Le matériel d'étude :

1.1) Les différents clones et échantillonnages :

Le matériel végétal analysé correspond à du bois prélevé sur des clones de peuplier hybride *Populus deltoïdes x trichocarpa* âgés de deux ans. La population d'échantillonnage représente 745 clones différents. Les arbres ont été cultivés en TCR (Taillis à Courte Rotation) sur le site de l'INRA d'Orléans, deux branches ont été prélevées sur deux clones à deux ans de leur développement. Les échantillons ainsi prélevés (environ 1400) ont été écorchés puis séchés avant d'être broyés.

Les vingt-quatre clones de peuplier qui ont été soumis à l'étude durant mon stage, ont été sélectionnés de façon à représenter l'ensemble de la variabilité de la population pour les teneurs en cellulose. Ce choix a été fait à partir d'un pré-modèle de calibration PIR pour la cellulose à partir de 100 échantillons analysés dans un laboratoire externe à l'INRA mais avec une méthode différente de celle mise en œuvre à l'INRA.

1.2) Broyage et tamisage :

Les échantillons sont broyés sur le site même de l'INRA d'Orléans à l'aide d'un broyeur à couteau. La poudre ainsi obtenue est ensuite tamisée de façon à obtenir des particules allant de un millimètre à cinquante micromètres de diamètre (figure 12). Le tamisage est obligatoire pour éliminer les particules les plus fines, car afin d'effectuer les dosages chimiques des composants du bois, la poudre est placée dans des sachets ayant une porosité de 25 µm.

2) Méthodes d'extraction des différents composés du bois :

2.1) Préparation du résidu pariétal :

Cette extraction a pour but d'éliminer les composés solubles de la poudre de bois qui interfèrent lors du dosage des lignines et de la cellulose. C'est à partir de la poudre de bois extraite que sont réalisés les dosages de la lignine et de la cellulose. De plus cette étape permet d'évaluer le pourcentage d'extractibles contenus dans la poudre de bois.

Figure 13 : Préparation des résidus pariétaux :



Colonne de refroidissement des vapeurs

Adaptateur entre le refroidissement et l'eren

erlen meyer de 2L contenant huit sachets thermo soudables

Plaque d'agitation chauffante

a). Principe :

La poudre de bois subit quatre bains d'extraction successifs qui se font à chaud afin d'augmenter la vitesse de réaction. La première extraction se fait dans de l'éthanol à 96% pour éliminer les acides phénoliques simples et les polyphénols ou les sucres non structuraux. La deuxième extraction se fait dans l'eau pour éliminer les composés hydrosolubles comme les protéines ou les tannins.

b). Mode opératoire :

La poudre est placée dans des sachets thermo-soudables, à raison de 0,8 g de poudre par sachet. Trois sachets sont préparés pour chaque échantillon. Les sachets sont ensuite placés deux heures à 105°C, afin d'éliminer l'eau présente dans la poudre. Après séchage, les sachets contenant la poudre sont pesés afin de déterminer la masse de poudre sèche sur laquelle seront réalisées les extractions.

Les huit sachets correctement annotés et pesés sont placés dans un erlen meyer de 2L. Ils sont ensuite installés sur une plaque chauffante à agitation puis l'extraction est lancée en commençant par l'éthanol (1L) puis l'eau (1L). Le système de condensation des vapeurs est installé (figure 13). Puis trente minutes sont comptées pour chaque bain après le début de l'ébullition. À la suite de ce traitement, les sachets sont de nouveau pesés après séchage au four à 105°C pendant deux heures. Le taux d'extractibles est obtenu en faisant la différence de masse entre la poudre avant et après extraction.

Les poudres extraites sont ensuite placées au dessiccateur afin d'empêcher la reprise de l'humidité pour les prochains dosages.

L'alcool utilisé est ensuite recyclé par distillation sur le site de l'INRA afin de réduire les coûts de la manipulation.

2.2) Dosage des lignines :

a). Principe :

Il y a hydrolyse du bois, dégradation et solubilisation de la cellulose et de l'hémicellulose par attaque acide (H_2SO_4) à différentes concentrations puis à chaud par passage à l'autoclave. La solution ainsi obtenue est ensuite filtrée. Le filtrat contient les lignines solubles qui sont dosées par spectrophotométrie dans le domaine de l'ultraviolet. Le résidu solide comporte les lignines insolubles dites « Klason », leur pourcentage est déterminé par gravimétrie.

Figure 14 : Rampe de filtration pour le dosage des lignines, de la cellulose et de l'hémicellulose :

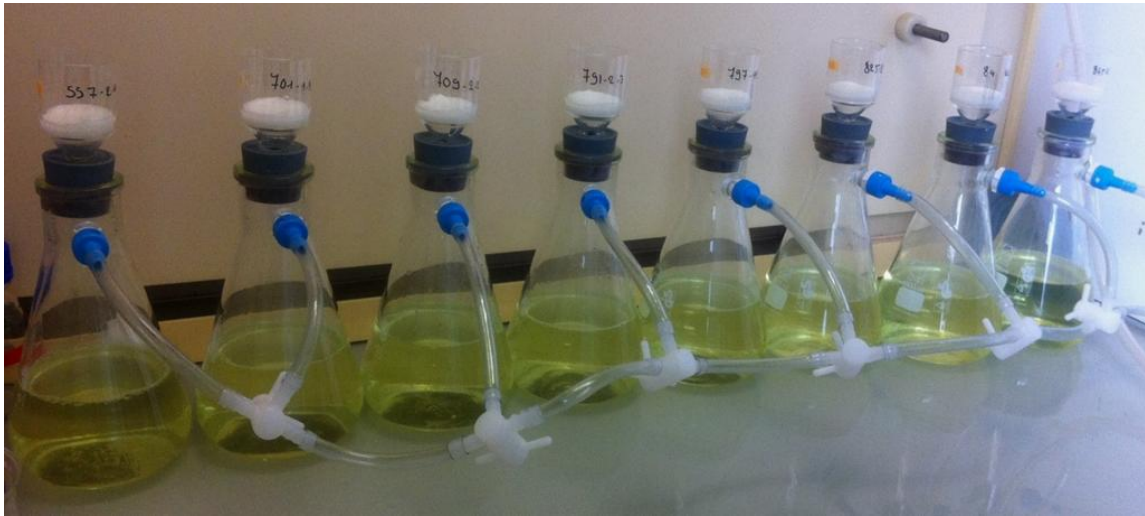


Figure 15 : Creuset-filtre contenant le résidu des lignines Klason après extraction :



b). Mode opératoire :

Ce dosage s'effectue en plusieurs étapes : la première consiste à hydrolyser les poudres extraites et la deuxième a pour but de séparer les deux types de lignines par filtration.

A partir des poudres précédemment extraites, 300 mg de poudre sont pesés dans des bouteilles « Schott ». Cinq millilitres d'acide sulfurique à 72% sont ajoutés dans les bouteilles en faisant attention que toute la poudre de bois soit bien en contact avec l'acide. Puis les bouteilles sont placées sous agitation (à 250 rpm) pendant deux heures.

Le mélange contenu dans les bouteilles est ensuite dilué pour que la concentration en acide soit de 3%. Pour cela 193,5 g d'eau ultra-pure sont ajoutés dans chaque bouteille.

Les bouteilles sont ensuite fermées hermétiquement à l'aide d'un film plastique résistant à la chaleur puis autoclavées à 120°C pendant une heure.

Une rampe de filtration, composée de huit fioles à vide chacune coiffée d'un creuset filtre possédant des membranes en fibre de verre de 16 à 40 µm, est mise en place (figure 14). Chaque échantillon est ensuite filtré (une aliquote de chaque filtrat est récupérée dans des béchers de 40 mL) puis rincé avec 500 mL d'eau ultra-pure jusqu'à neutralisation du dépôt. Les creusets sont ensuite récupérés et mis à sécher au four 2h à 105°C.

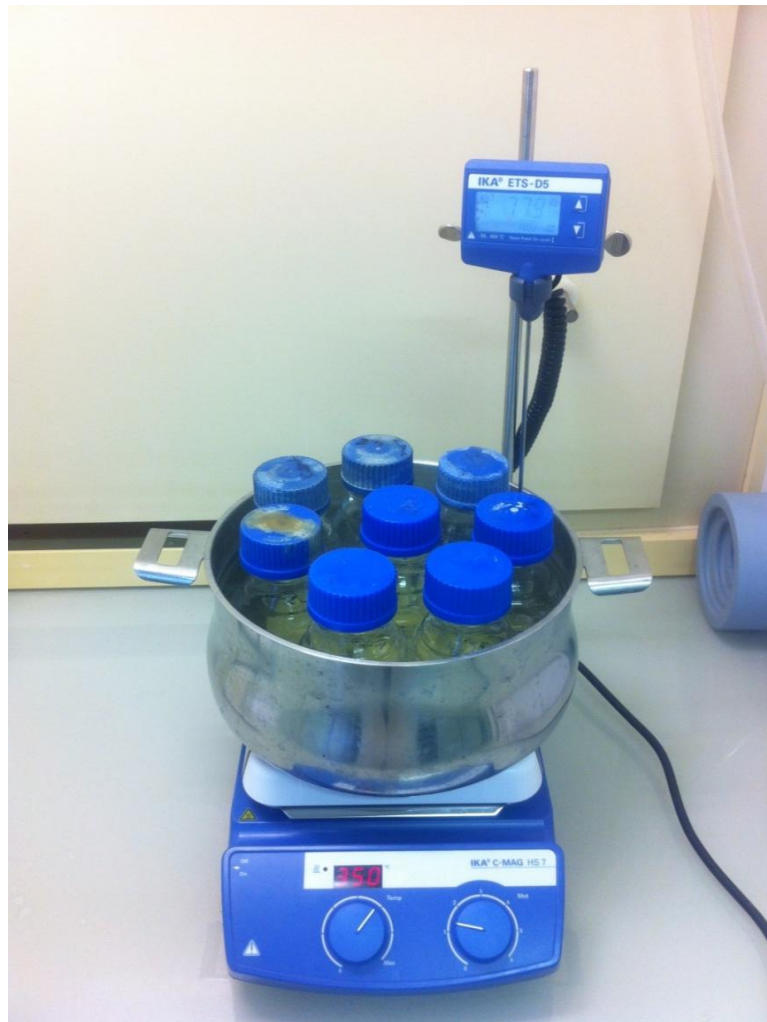
- **Mesure des lignines « Klason » :**

Après l'étape du séchage, les creusets sont placés au dessiccateur pour un refroidissement complet (figure 15). Puis ils sont à nouveau pesés en limitant au maximum le contact entre l'air ambiant et eux. Une fois la différence avec la masse initiale de creuset calculée, les résultats permettent de déterminer la quantité de lignines insolubles contenue dans 300 mg de poudre de bois. Cette quantité est exprimée en pourcentage par rapport à la poudre sèche de départ.

- **Dosage des lignines solubles :**

A partir de 1 mL de filtrat, une dilution au 1/20^{ème} est réalisée (1 mL de filtrat dans 19 mL d'eau ultra-pure). Puis les mesures d'absorbance des échantillons dilués sont effectuées contre un blanc à l'acide sulfurique à 3% (500 µL d'acide sulfurique à 72% dans 12 mL d'eau ultra-pure) également dilué au vingtième. Les mesures sont effectuées dans le domaine de l'ultraviolet avec des cuves en quartz. Celles-ci n'absorbent pas dans l'ultraviolet (mesures effectuées à 205 nm). Les échantillons sont mesurés en triple essais à partir de la même dilution.

Figure 16 : Délignification des poudres extraites :



2.3) Dosage de la cellulose :

a). Principe :

Le dosage de la cellulose dans la matière lignocellulosique se déroule en deux étapes correspondant à deux attaques différentes de la lignine.

La première étape est une dégradation à chaud qui se fait en présence de chlorite de sodium (NaClO_2) dans du tampon acétate. Cette première étape au cours de laquelle les lignines contenues dans la paroi cellulaire sont éliminées s'effectue sur de la poudre précédemment extraite. Le résidu obtenu après filtration est l'holocellulose (polysaccharide principalement constitué de cellulose et d'hémicellulose). Ce résidu est ensuite dosé par gravimétrie.

Puis la deuxième étape consiste à attaquer l'holocellulose précédemment obtenue par action de la soude (NaOH) afin de récupérer l' α -cellulose. Celle-ci sera à son tour dosée par gravimétrie.

b). Mode opératoire :

- Délicignification de la poudre extraite :

A partir de la poudre extraite, un gramme de poudre est pesé et introduit dans des bouteilles « Schott ». Quatre-vingt millilitres de tampon acétate et 2 mL de solution de chlorite de sodium (NaClO_2) sont ajoutés. Les bouteilles sont ensuite placées au bain marie à 76°C sous agitation. Puis 2 mL de solution de NaClO_2 sont ajoutés toutes les heures pendant trois heures (figure 16).

Durant cette étape il y a décoloration de la pâte qui correspond à la dégradation de la lignine.

- Récupération de l'holocellulose :

Une rampe de filtration est mise en place, la suspension est versée dans les creusets pendant que le vide est appliqué puis la pâte obtenue est lavée en y versant petit à petit 500 mL d'eau ultra-pure jusqu'à décoloration complète (figure 14). La pâte est de nouveau lavée avec deux fois 15 mL d'acétone pour la décolorer puis les creusets sont placés au four deux heures à 105°C afin de sécher les échantillons.

Après avoir laissé refroidir les échantillons au dessiccateur, les pesées se font en limitant au maximum le contact entre ceux-ci et l'air libre. Les résultats obtenus permettent alors, par différence avec la masse initiale et la masse obtenue, de déterminer la quantité d'holocellulose contenue dans un gramme de poudre d'échantillon. Cette quantité est exprimée en pourcentage par rapport à la poudre sèche de départ.

- Obtention de la fraction α -cellulose :

À partir de la poudre précédemment délicignifiée, 800 mg d'holocellulose sont pesés et introduits dans des bouteilles « Schott » de 100 mL. Ces dernières sont ensuite placées sur un agitateur orbital avec une bille en verre dans chaque bouteille. Cinq millilitres de solution de NaOH à 17,5% sont ajoutés, l'action dure 5 min avant que l'opération soit répétée deux fois avec 2,5 mL de soude. Un dernier ajout de 2,5 mL de NaOH est réalisé puis la fraction est agitée pendant 30 min (volume totale de la soude : 12,5 mL).

Une rampe de filtration est installée, puis 16,5 mL d'eau ultra-pure sont ajoutés dans les bouteilles. Le liquide est versé sur les creusets en appliquant un vide léger, puis 50 mL de NaOH à 8,3% sont progressivement transférés (figure 14). Le lavage de l' α -cellulose est poursuivi en lavant deux fois les creusets avec de l'eau ultra-pure. Pour finir 7,5 mL d'acide acétique (CH_3COOH) à 10% sont ajoutés à chaque échantillon en maximisant le contact entre l'acide et le résidu. Pour cela la pâte et l'acide sont mélangés et la pompe est arrêtée de façon à ce que le dépôt soit en contact avec l'acide pendant au moins 1 min afin de neutraliser le reste de NaOH. Le dépôt ainsi obtenu doit être bien blanc, si cela n'est pas le cas, le lavage est prolongé avec de l'eau ultra-pure. La neutralité du dépôt est vérifiée à l'aide de papier pH et si besoin ajustée avec de l'acide sulfurique.

Les creusets sont ensuite récupérés et placés au four une nuit à 105°C puis placés au dessiccateur 30 min jusqu'à un refroidissement complet. Les creusets sont pesés en évitant au maximum le contact avec l'air ambiant.

La quantité d' α -cellulose restante est estimée par différence de masse en comparaison avec le résidu d'holocellulose initialement pesé. Cette quantité est exprimée en pourcentage par rapport à la poudre sèche de départ.

Le pourcentage d'hémicellulose est estimé par différence entre le pourcentage d'holocellulose et le pourcentage d' α -cellulose.

Figure 17 : Spectrophotomètre infrarouge (Spectrum 400, *Perkin Elmer*) :



3) La Spectrométrie Proche Infrarouge :

La spectrométrie proche infra rouge aussi appelée SPIR (figure 17) est une technique analytique basée sur le principe d'absorption de la matière organique par des rayonnements électromagnétiques. Les mesures se font avec un spectromètre soit en transmission (mesure de l'énergie ayant traversé un échantillon) soit en réflexion (mesure de l'énergie réfléchi par un échantillon épais).

Les rayonnements utilisés se situent dans l'infrarouge, ils correspondent aux longueurs d'ondes après le visible et avant les micro-ondes soit comprises entre 780 nm et 1 000 000 nm. Plus précisément, les mesures sont effectuées dans le proche infra rouge qui se situe entre 800 et 2500 nm.

L'échantillon à analyser va être éclairé à différentes fréquences dans le domaine du proche infra rouge, ce qui va entraîner des vibrations dites harmoniques et de combinaisons au niveau des liaisons entre les atomes. Ces vibrations sont donc dues à un changement de niveau d'énergie entraîné par l'absorption de la lumière des liaisons telles que C-H, N-H, O-H, C-N dans le domaine du proche infra rouge. Pour chaque échantillon, on obtiendra donc un spectre différent regroupant de nombreuses informations permettant d'estimer la quantité et la qualité des liaisons et donc de déterminer indirectement la teneur en protéines, fibres ... par rapport à une calibration préalable.

Les spectres ainsi obtenus sont difficilement interprétables car chaque pic d'absorption obtenu ne correspond pas à une liaison particulière ou à une caractéristique donnée (pourcentage de cellulose ...). C'est pourquoi en parallèle sont réalisés des dosages sur un certain nombre d'échantillons caractéristiques d'une population donnée afin d'établir un modèle de calibration, de corrélation par des procédés mathématiques. Les spectres obtenus pourront par la suite directement être reliés à des analyses chimiques.

Cette technique est utilisée dans les laboratoires de recherches ou autres (industrie) même si un long travail sur l'établissement et la mise en place de la calibration doit être effectué car elle présente aussi de nombreux avantages. En effet, c'est une méthode rapide (30s par échantillon pour la prise de spectre), non destructive, l'échantillon peut donc être récupéré intact après l'analyse, elle nécessite peu de matière (4 à 5 grammes de poudre de bois par exemple suffisent par échantillon). Néanmoins, les mesures sur les substances minérales ne sont pas possibles car elles reposent sur l'absorption du rayonnement par les molécules organiques et les substances présentes à l'état de traces ne sont pas détectables car leur signal spectral est trop faible.

J'ai effectué les mesures sur mille quatre-cent échantillons de bois de peuplier DxT avec un spectromètre IR en mode réflexion.

Figure 18 : Pourcentage moyen d'extractible des échantillons :

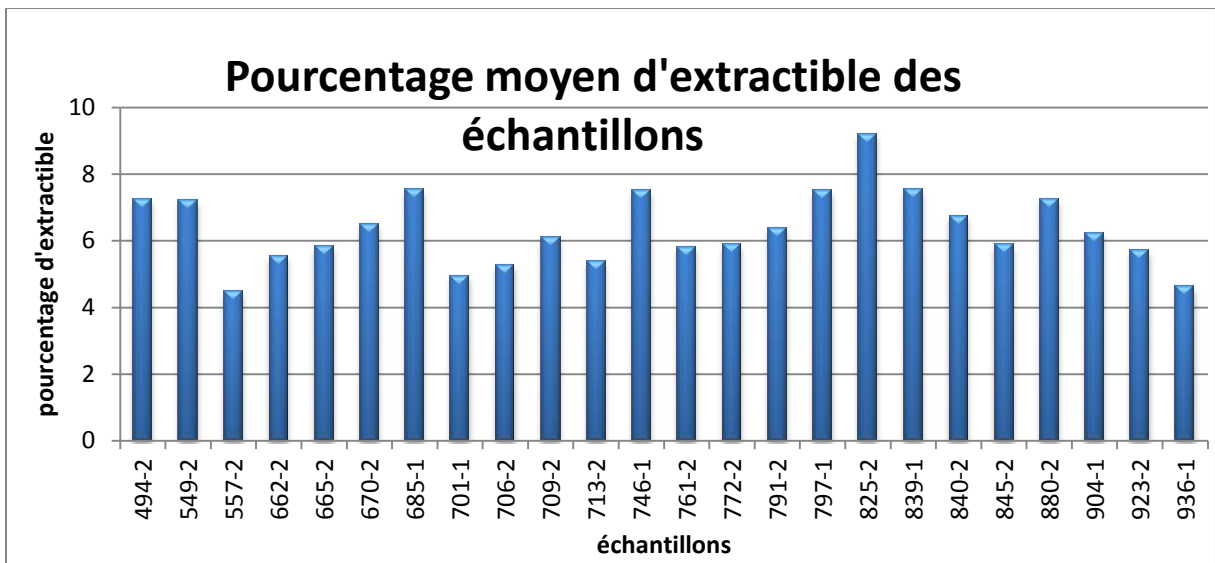
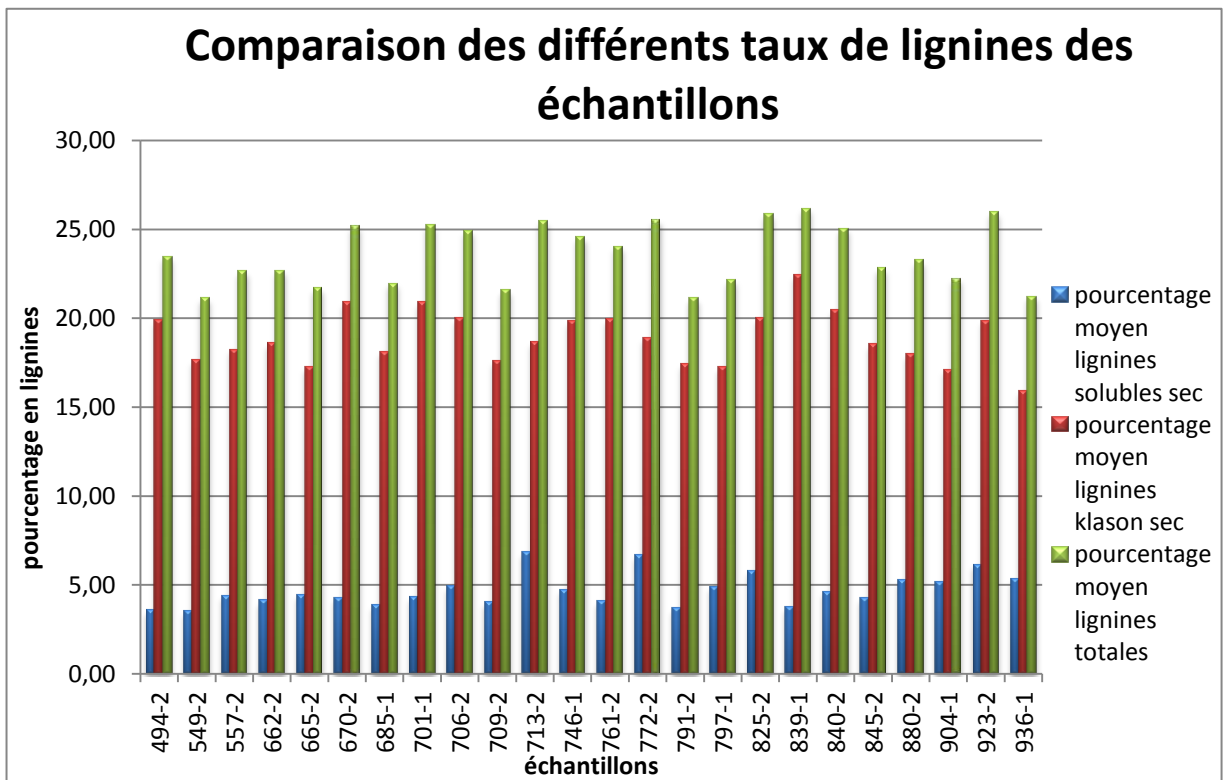


Figure 19 : Comparaison des différents taux de lignines des échantillons :



III. Résultats et discussions :

1) Répartition des constituants chimiques structuraux du bois de peuplier hybride :

1.1) Extractibles :

On peut observer que les résultats obtenus pour les teneurs en extractibles sont assez répétables entre les clones, les écarts types obtenus sont donc faibles (leur moyenne est de 0,39). Cependant, les coefficients de variation (CV%) acquis sont élevés (valeurs supérieures à 5%) car les moyennes d'extractibles obtenues pour chaque clone sont faibles (car le bois a préalablement été écorcé) nous obtenons donc de fort CV%.

Les échantillons extraits possèdent une moyenne d'extractibles de 6,35% avec comme maximum 9,21% (obtenu pour le clone 825_2) et comme minimum 4,47% (acquis par le clone 557_2) (figure 18).

1.2) Lignines :

- Les lignines solubles :

Les lignines solubles représentent en moyenne 4,68% du bois total. Les échantillons dosés couvrent une gamme allant de 6,82% et 3,51% de lignines solubles par rapport à la poudre de bois.

- Les lignines Klason :

Les lignines insolubles représentent en moyenne près de 19 % des composants du bois. Les échantillons dosés possèdent des teneurs en lignines variant entre 15,90% et 22,43%.

- Les lignines totales :

Les résultats obtenus sont suffisamment répétables entre chaque clone grâce à une moyenne d'écart type de 0,515. De même, les coefficients de variation acquis sont convenables (inférieur à 5%) avec la moyenne de 2,187%. Les lignines totales représentent 23,56%. (Figure 19)

Figure 20 : Comparaison des différents taux d'oses par échantillon :

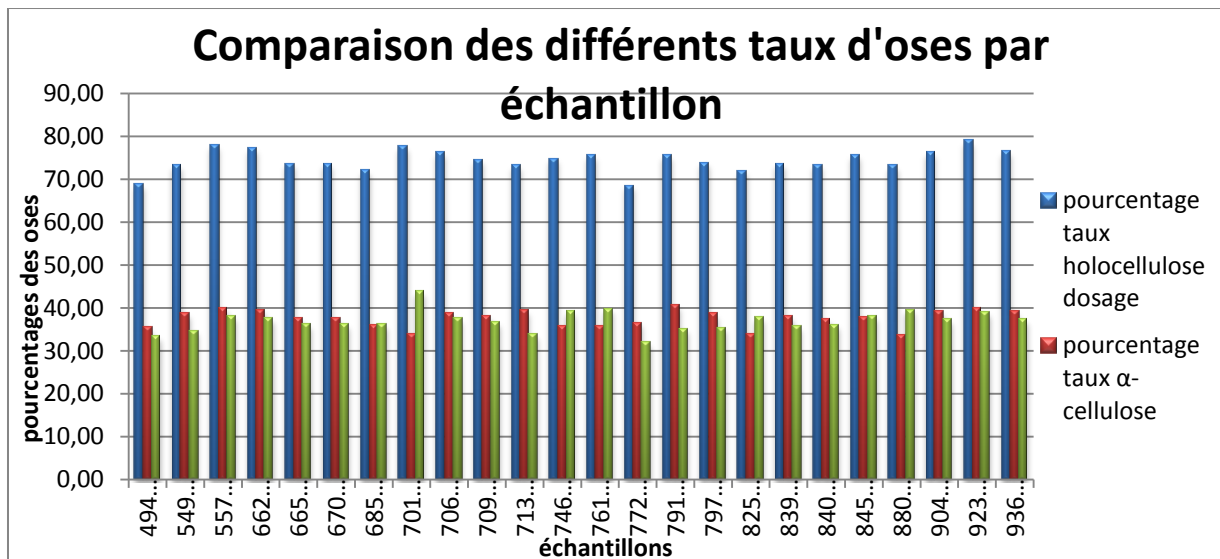


Figure 21 : Comparaison du taux d'holocellulose calculé et obtenu par échantillon :

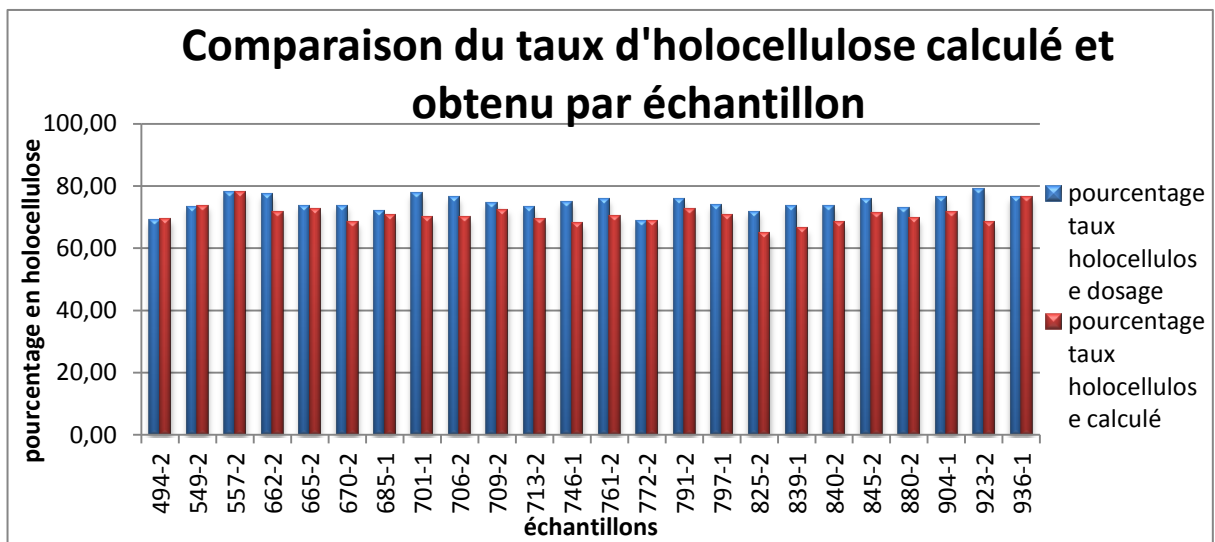
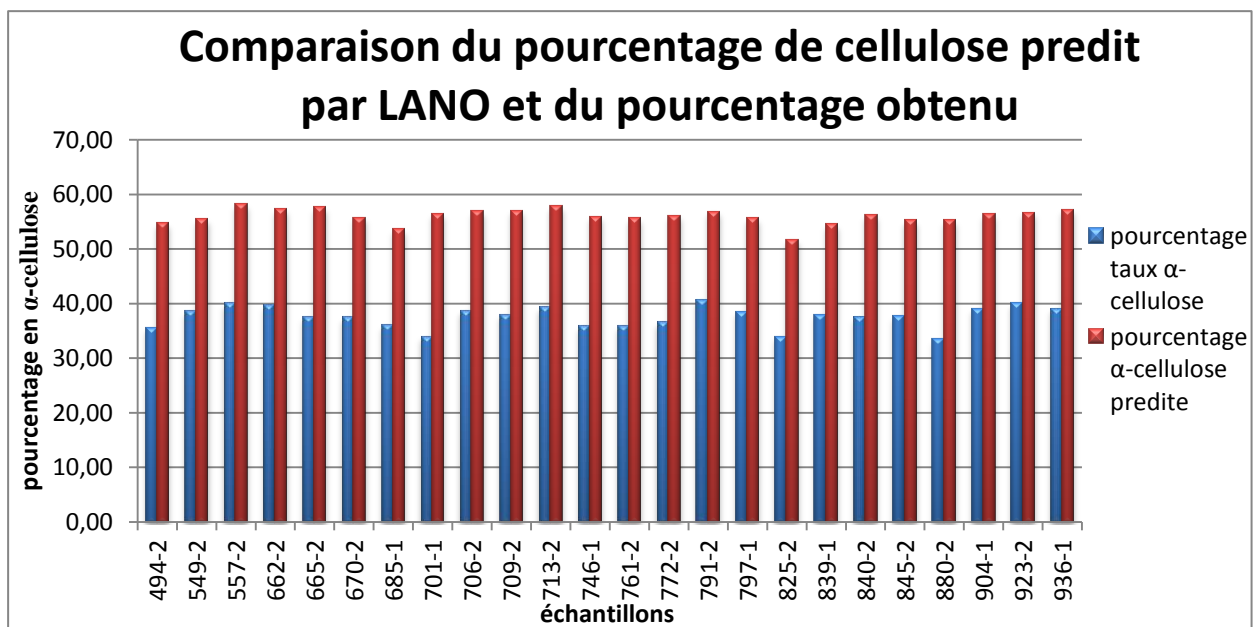


Figure 22 : Comparaison du pourcentage de cellulose prédit par LANO et obtenu :



1.3) La cellulose :

- **L'holocellulose :**

L'holocellulose représente environ 74% des constituants de la paroi végétale d'après les dosages effectués. Les échantillons possèdent des variations allant de 68,47% (pour l'échantillon 772-2) à 78,86% (obtenu par la poudre 923-2).

Cependant par le calcul, l'holocellulose devrait représenter 70,47% du bois se qui fait une variation de 3,91%. Le calcul pour estimer le pourcentage d'holocellulose prend en compte la somme des extractibles et celle des lignines totales par échantillons et la soustrait par cent. Il y a donc une surestimation du pourcentage des lignines et/ou des extractibles (qui peut être dûe à la perte de poudre dans les sachets thermo soudables) car si nous faisons la somme de chaque pourcentage obtenu par dosage, nous obtenons des valeurs supérieures à 100% (figures 20 et 21).

- **Hémicellulose :**

L'hémicellulose est présente à en moyenne 37 % dans le bois avec comme minimum de variation 31,94% pour l'échantillon 772-2 et comme maximum 43,75% pour la poudre 701-1.

- **Alpha-cellulose :**

Les échantillons possèdent une moyenne d'alpha-cellulose de 37,50% avec comme minimum 33,50% (obtenu pour le clone 880-2) et comme maximum 40,57% (acquis par le clone 791-2), d'après mes dosages.

Les échantillons ont aussi été dosés par le Laboratoire Agronomique de Normandie (LANO) qui utilise la méthode de Van Soest pour la réalisation de ces dosages (figure 22).

Cette méthode utilise le fractionnement de la matière organique basée sur des extractions successives. Elle permet de séparer quatre fractions constitutives de la paroi des végétaux : l'hémicellulose, la cellulose, la lignine, le résidu minéral. A chaque étape, les échantillons sont plongés dans des solutions (détergents ou acides) afin d'extraire les composés à doser. Il est possible de quantifier chaque fraction par différence de masse.

Entre les résultats obtenus par LANO et ceux acquis à l'INRA, il y a un écart moyen de 33,02%. En effet la valeur moyenne de l'alpha-cellulose, d'après le laboratoire Normand est de 55,98%. Cela s'explique par le fait que le laboratoire LANO à l'habitude de réaliser les dosages sur des matières plus simples que le bois tels que la paille, le foin... Leur étape d'extraction ne conviendrait donc pas pour la poudre de bois, ils sous estimerait ainsi la valeur des extractibles qui serait par la suite perçu comme étant de la cellulose. De plus, nous pouvons valider les résultats acquis à l'INRA car les échantillons ont par la suite été envoyés dans d'autres laboratoires plus spécialisés dans le bois, et il s'avère que nous sommes en harmonie avec les résultats des autres laboratoires européens.

Figure 23 : Modèle de calibration des extractibles obtenus sur 48 échantillons :

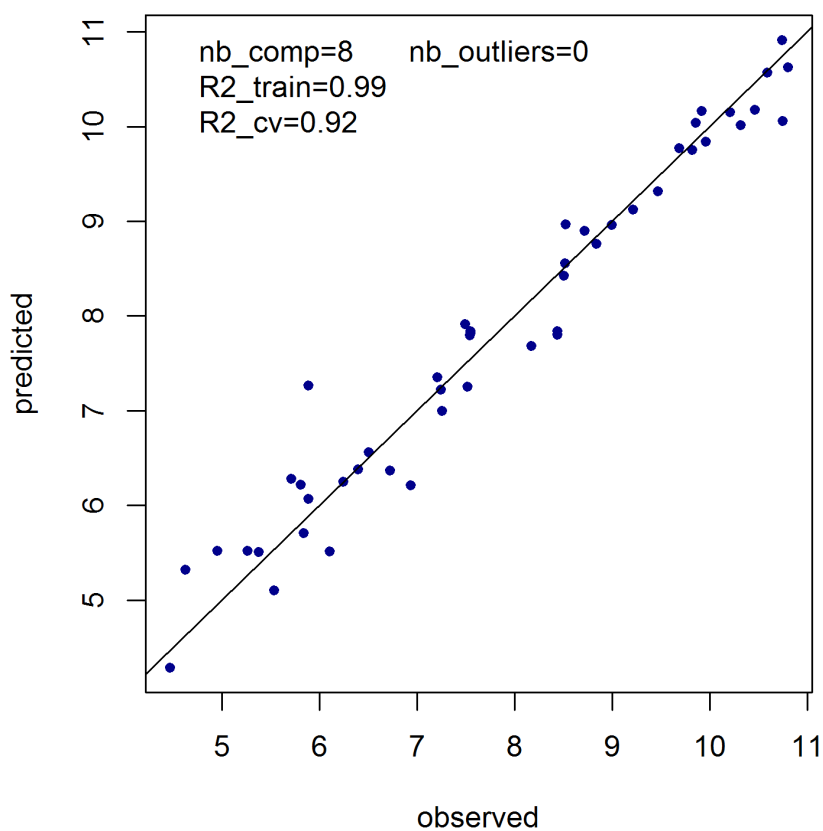
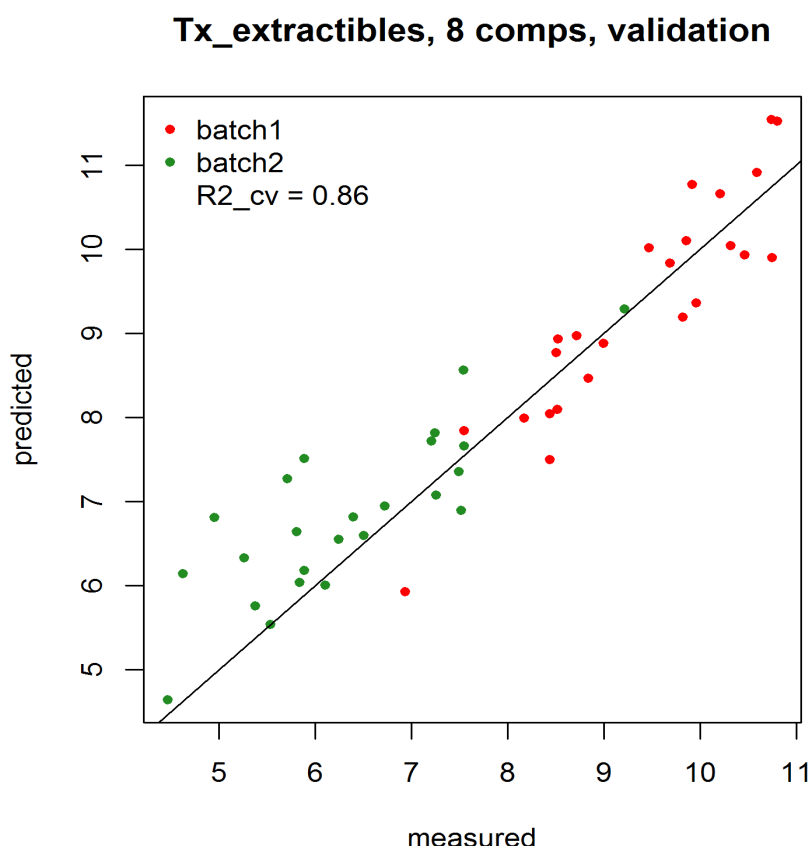


Figure 24 : Modèle de calibration des extractibles obtenus sur 48 échantillons :



2) Corrélation des données chimiques avec les spectres proches infra rouge dans le but de la construction de modèles de calibration :

2.1) Logiciel et méthode de corrélation :

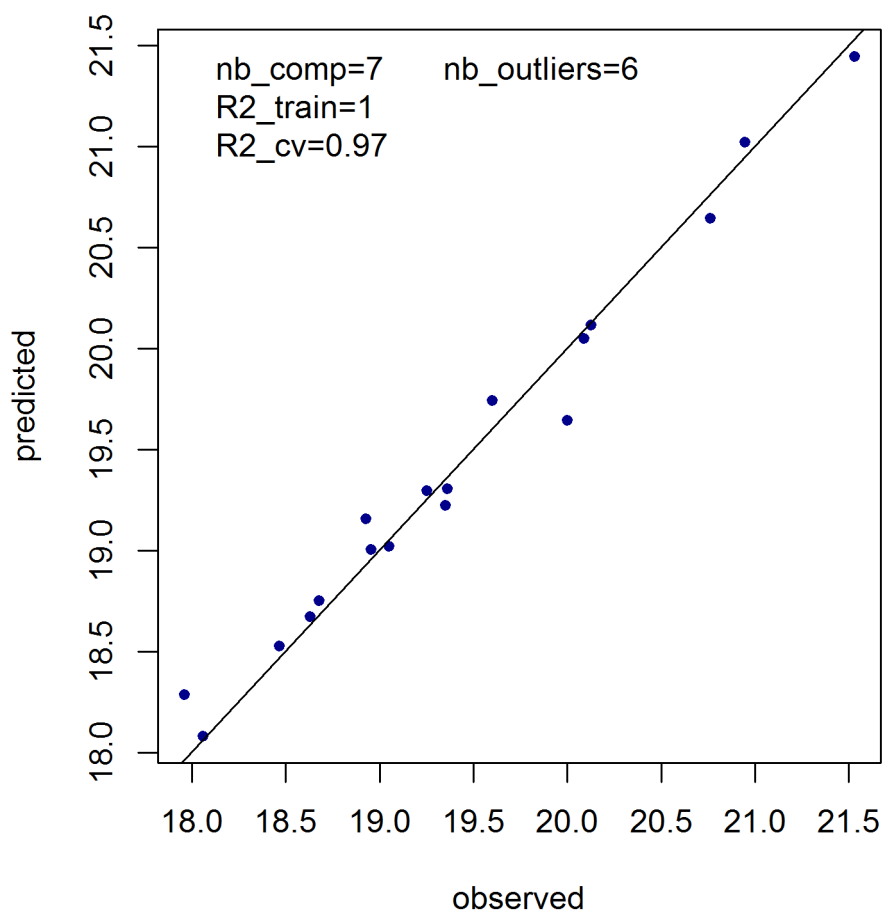
La calibration consiste à établir une relation mathématique, généralement en appliquant une régression linéaire sur chaque longueur d'onde du spectre, entre l'information des spectres dans le proche infrarouge et les données analytiques primaires ; les meilleures longueurs d'onde sont sélectionnées pour la calibration, générant une équation de calibration.

Les spectres sont acquis dans un intervalle de 10000 à 4000 cm^{-1} avec un pas de 2 cm^{-1} . Une découpe des spectres est réalisée, réduisant l'intervalle des longueurs d'onde étudiées de 8000 à 4000 cm^{-1} ceci afin de supprimer le bruit de fond obtenu en début de spectre. Les données sont ensuite soumises à une série de pré-traitements statistiques afin d'améliorer la qualité du signal : une normalisation des données permet de réduire les variations incontrôlées de l'intensité générale des spectres ; des dérivations premières et secondes par la méthode de Savitzky-Golay. Les combinaisons de ces différents traitements sont évaluées afin de sélectionner en dernier lieu un modèle grâce au coefficient de corrélation R^2 qui mesure l'ajustement du modèle et représente la part de variance des caractères de qualité du bois, expliquée par le modèle. Le meilleur modèle sera celui avec un R^2 le plus élevé et le moins d'« outliers » (échantillons, points à supprimer du modèle) possible.

Toutes ces opérations ont été réalisées sous le logiciel R (R Development Core Team, 2012)

Cette étude statistique a été réalisée en collaboration avec un chercheur statisticien de l'unité AGPF qui travaille avec l'ensemble du personnel de laboratoire de biochimie, et avec une étudiante en deuxième année de master.

Figure 25 : Modèle de calibration des lignines Klason obtenues sur 24 échantillons :



2.2) Etude des modèles :

A partir des quarante-huit échantillons (vingt-quatre dosés avant mon arrivé en stage et les autres que j'ai dosés) deux modèles de calibration exploitables ont pu être réalisés.

Les graphiques illustrés en verso représentent en abscisse, les valeurs chimiques mesurées et en ordonné, les valeurs prédites. Chaque échantillon est retiré une fois du jeu de données, avec remise, afin d'être prédit par le modèle obtenu grâce aux autres échantillons.

Le modèle d'extractibles pour lequel la prédiction s'est faite sur les quarante-sept échantillons, possède un très bon coefficient de corrélation ($R2_{train}$: 0,99) et un bon coefficient de corrélation de validation ($R2_{cv}$: 0,92), ceci est du à une bonne répétabilité des manipulations et à la correspondance des données spectrales et chimiques. De plus ce modèle ne présente aucun « outliers », les échantillons analysés rentrent tous dans la gamme d'étalonnage (figure 23).

Pour attester de la robustesse du modèle final, le modèle de calibration pour les extractibles ; réalisé à partir des données obtenues avant mon arrivée (batch 1) ; a permis la prédiction de mes valeurs (batch 2) et inversement. Celui-ci possède un moins bon coefficient de validation ($R2_{cv}$: 0,92) car les échantillons ont mal été repartit entre les deux séries de dosages (figure 24).

Le modèle sur les lignines Klason a seulement pu être édité à partir des vingt-quatre échantillons dosés avant mon arrivé en stage, car mes dosages ne permettent pas d'améliorer le modèle. Celui-ci possède un très bon coefficient de corrélation ($R2_{train}$: 1) et un bon coefficient de corrélation de validation ($R2_{cv}$: 0,97) même si pour sa réalisation, six outliers ont été détectés (figure 25).

Conclusion scientifique :

Deux modèles de calibration fiables ont pu être mis au point durant mon stage (le modèle pour les extractibles et le modèle pour la lignine Klason). Néanmoins, les valeurs obtenues à partir de mes analyses pour les lignines n'ont pu être ajoutées car elles dégradèrent le modèle existant, cela peut être dû à la différence d'âge des bois utilisés pour les deux séries d'analyses, en effet mes dosages furent réalisés deux ans après les premiers.

De plus, durant mes huit semaines de stage, j'ai rencontré quelques problèmes lors de mes manipulations, plus exactement lors des pesées des creusets utilisés pour les dosages. Même si les creusets filtrés étaient placés au four plusieurs heures avant d'être équilibrés au dessiccateur, leur masse diminuait et variait en fonction du positionnement des creusets sur la balance. Les balances étant régulièrement suivies et vérifiées régulièrement nous n'avons pas encore pu déterminer les causes de ce problème.

Malgré ces quelques aléas méthodologiques, il s'avère que les méthodes de dosage utilisées montrent une uniformité des résultats obtenus avec ceux de plusieurs autres laboratoires en Europe qui utilisent des méthodes plus ou moins différentes (des aliquotes d'échantillons furent envoyés à différents laboratoires participant au projet *Tree For Joules* pour des essais comparatifs).

Le peuplier hybride D x T contient beaucoup de cellulose (entre 60 % et 80 % de la poudre de bois extraite). Il faudra continuer les analyses sur d'autres clones de cette espèce, et également sur d'autres espèces de peuplier qui s'avèrent être intéressantes pour la fabrication de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique.

Conclusion personnelle :

Les huit semaines de stages réalisées à l'INRA d'Orléans ont été très enrichissantes, autant sur le plan professionnel que personnel. En effet, j'ai pu acquérir des connaissances et des techniques de laboratoire, j'ai aussi découvert le travail en équipe. J'ai été très bien accueillie au sein de l'unité AGPF, où règne une ambiance conviviale.

Mon travail m'a beaucoup intéressée car le projet de recherche est d'actualité. De plus les recherches dans le cadre du développement durable sont en plein essor et cela m'a permis de découvrir plusieurs techniques de laboratoire spécialisé sur le matériel végétal.

J'ai eu la chance de pouvoir effectuer mes deux stages dans deux laboratoires différents, l'un, spécialisé dans la recherche médicale, et l'autre orienté vers le végétal. Ainsi, j'ai pu effectuer différents types de manipulations telles que l'amplification, le séquençage d'ADN, l'interprétation de résultats obtenues par HRM (high melting resolution), des dosages de lignines, celluloses et extractibles et le travail sur un spectromètre proche infrarouge à partir de peupliers hybrides.

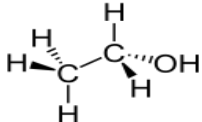

Cette année m'a aussi permis d'élargir la vision du travail de technicien de laboratoire. J'ai pu suivre l'organisation du laboratoire (les réunions scientifiques d'unité), voir l'importance du travail d'équipe (en prenant les résultats d'anciens travaux), mais aussi acquérir plus d'autonomie lors de mes manipulations.

J'ai côtoyé des chercheurs, des étudiants en master et en thèse ainsi que d'autres techniciens, ce qui m'a permis de consolider mon projet professionnel. A présent, je souhaiterais intégrer une licence générale et passer un master avant de travailler.

Je suis contente d'avoir pu effectuer ce stage entourée de personnes compétentes, passionnées qui m'ont encadrée tout en me laissant de l'autonomie. Je garde de cette expérience un excellent souvenir qui constitue désormais une expérience professionnelle valorisante.

Annexes

Fiche de danger et prévention des produits

Ethanol		
CH ₃ CH ₂ OH		

Phrases de danger

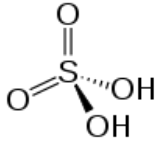

H225 Liquide et vapeur très inflammables.

Phrases de prévention

P210 Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/ des flammes nues/ des surfaces chaudes. Ne pas fumer.

P243 Pendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques.

P280 Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

acide sulfurique		
H ₂ SO ₄		

Phrases de danger

H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

H290 Peut être corrosif pour les métaux.


Phrases de prévention

P280 Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

P309+P310 En cas d'exposition ou d'un malaise: Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P301+P330+P331 EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir.

P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.



Hydroxyde de sodium (soude)	
NaOH	$\ominus \left \overset{\ominus}{\text{O}} - \text{H} \text{Na}^+ \right.$ 

Phrases de danger

H314 Consulter un médecin en cas de malaise.

Phrases de prévention

P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.
P309+P310	En cas d'exposition ou d'un malaise: Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P301+P330+P331	EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir.

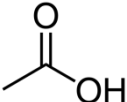

Chlorite de sodium	
NaClO ₂	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 20px;">Na⁺</div>  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;">     </div>

Phrases de danger

H272	Peut aggraver un incendie; comburant.
H301	Toxique en cas d'ingestion.
H314	Provoque des brûlures de la peau.
H400	Très toxique pour les organismes aquatiques.
H310+H330	Mortel par contact cutané. Mortel par inhalation.
EUH032	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

Phrases de prévention

P220	Tenir/stocker à l'écart des vêtements/.../matières combustibles
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.
P284	Porter un équipement de protection respiratoire.

Acide acétique glacial		
C ₂ H ₄ O ₂		


Phrases de danger

H314 Consulter un médecin en cas de malaise.

H226 Liquide et vapeurs inflammables.

Phrases de prévention

P210	Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/ des flammes nues/ des surfaces chaudes. Ne pas fumer.
P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.
P243	Pendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques.
P210	Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/ des flammes nues/ des surfaces chaudes. Ne pas fumer.
P309+P310	En cas d'exposition ou d'un malaise: Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P304+P340	EN CAS D'INHALATION: Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.
P301+P330+P331	EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir.

Acétone		
C ₅ H ₁₂ O ₂	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$	

Phrases de danger

H225	Liquide et vapeur très inflammables.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
EUH066	L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau.

Phrases de prévention

P210	Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/ des flammes nues/ des surfaces chaudes. Ne pas fumer.
P243	Pendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques.
P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.
P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

Tableau de résultat des dosages :

échantillons	pourcentage moyen extractibles	pourcentage moyen lignines solubles sec	pourcentage moyen lignines klason sec	pourcentage moyen lignines totales	pourcentage taux holocellulose dosage	pourcentage taux holocellulose calculé	pourcentage taux α -cellulose	pourcentage taux hemicellulose	pourcentage α -cellulose prédite	pourcentage de différence entre les deux α -cellulose
494-2	7,24	3,55	19,88	23,43	68,84	69,33	35,53	33,30	54,68622	35,0218248
549-2	7,21	3,51	17,62	21,13	73,33	73,66	38,59	34,73	55,37901	30,3122332
557-2	4,47	4,38	18,24	22,62	77,88	77,88	39,97	37,91	58,12605	31,2338387
662-2	5,53	4,09	18,57	22,66	77,11	71,81	39,62	37,50	57,32638	30,8953804
665-2	5,84	4,44	17,22	21,66	73,62	72,50	37,43	36,19	57,6288	35,0459078
670-2	6,5	4,29	20,89	25,18	73,60	68,32	37,45	36,15	55,78818	32,8757983
685-1	7,54	3,84	18,11	21,95	72,03	70,51	35,94	36,09	53,57884	32,9205002
701-1	4,95	4,30	20,92	25,22	77,64	69,83	33,89	43,75	56,47538	39,9910286
706-2	5,26	4,91	20,01	24,91	76,26	69,83	38,63	37,64	56,88528	32,097742
709-2	6,1	3,98	17,59	21,58	74,48	72,32	37,95	36,53	57,02296	33,4555418
713-2	5,37	6,82	18,63	25,45	73,15	69,18	39,34	33,81	57,77602	31,9139264
746-1	7,51	4,72	19,81	24,53	74,80	67,96	35,77	39,03	55,92568	36,0427971
761-2	5,81	4,07	19,93	24,01	75,61	70,18	35,85	39,75	55,65194	35,5766135
772-2	5,89	6,66	18,86	25,52	68,47	68,59	36,53	31,94	56,0624	34,8466241
791-2	6,39	3,70	17,41	21,11	75,63	72,50	40,57	35,06	56,7503	28,5119709
797-1	7,49	4,89	17,24	22,13	73,86	70,38	38,55	35,31	55,51576	30,5670271
825-2	9,21	5,81	20,02	25,83	71,76	64,96	33,92	37,84	51,7	34,3894705
839-1	7,55	3,73	22,43	26,16	73,57	66,29	37,92	35,65	54,54896	30,4820889
840-2	6,72	4,62	20,42	25,04	73,36	68,24	37,35	36,01	56,2	33,5421275
845-2	5,89	4,26	18,52	22,79	75,64	71,32	37,67	37,97	55,10246	31,6392828
880-2	7,25	5,25	17,98	23,23	73,03	69,52	33,50	39,53	55,23774	39,3530268
904-1	6,24	5,12	17,09	22,22	76,29	71,54	39,06	37,23	56,33685	30,6628111
923-2	5,71	6,13	19,85	25,98	78,86	68,31	40,02	38,84	56,61511	29,316432
936-1	4,63	5,31	15,90	21,20	76,43	76,43	39,05	37,38	57,17101	31,6998488

Bibliographie :

- Bruno Godin, Richard Agneessens, Sébastien Gofflot, Stéphane Lamandière, Georges Sinnaeve, Patrick A. Gerin, Jérôme Delcarte. Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 2011. 15(1), p165-182.
- Dominique Bertrand, Eric Dufour. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, 2^e édition. Paris : Lavoisier, 2006. 660 p.

Sitographie :

- fr.vwr.com : site de distribution de produit chimique
- tfj.lrsv.ups-tlse.fr : site du projet T4J
- www.val-de-loire.inra.fr : site officiel de l'Institut National de Recherche Agronomique du centre Val de Loire
- www.msds-europe.com : site répertoriant plusieurs fiches de risque et de sécurité des produits chimiques
- www.inra.fr : site officiel de l'Institut National de Recherche Agronomique.

Lays Audience Summary

I carried out my training course in a laboratory of breeding and forest physiology called AGPF at INRA. This unit is managed by Mr Gilles PILAT and studies physiological traits, genetic and genomic of forest species.

My training course was more exactly made within the group of Genobois which is directed by Mr Jean-Paul CHARPENTIER. This group works on second generation biofuel produced from different trees such as poplar. They seek to develop various skills such as physiological wood skills genomic, to better produce the raw wood and biomass without creating an ecological

During my training course I contributed to develop a calibration model to predict the amount of lignin and cellulose in the wood of hybrid poplar DxT (*deltoïdes* and *trichocarpa*) from their spectrum obtained by near-infrared spectrophotometry. I made spectra one thousand four hundred samples of poplars collected from different experiments. Then, I made twenty-four chemical dosing powder timbers for which there was much difference in the result for lignin and cellulose.

My training course helped me to confirm my wish to work in a research laboratory and to expand my vision on the professional world. I have now a better knowledge about scholar and professional opportunities after the BTS (two-year technical degree) in biotechnology. Moreover, during this training course, I could see an application of my theoretical knowledge, particularly thanks to the advanced material I used