



ETABLISSEMENT DE MODELES DE PREDICTION EN SPECTROMETRIE PROCHE INFRAROUGE POUR L'ETUDE DE LA COMPOSITION LIGNOCELLULOSIQUE DU BOIS DE PEUPLIER NOIR.

Institut Universitaire de Technologie de TOURS

Département Génie Biologique

Licence Professionnelle Santé - mention « Biologie Analytique et Expérimentale »

Session 2012-2013

MIGEON Mathieu

INRA Val-de-Loire, Centre d'Orléans, UAGPF UR0588

Plateau technique GENOBOIS

2163 Avenue de la pomme de pin, 45075 Ardon

Maitre d'apprentissage : Jean-Paul Charpentier



Photo de couverture : © Juteau M. (INRA)-Diversité d'architecture sur une jeune population de peuplier noir en rive droite de Loire à St Ay (Loiret).



ETABLISSEMENT DE MODELES DE PREDICTION EN SPECTROMETRIE PROCHE INFRAROUGE POUR L'ETUDE DE LA COMPOSITION LIGNOCELLULOSIQUE DU BOIS DE PEUPLIER NOIR.

Institut Universitaire de Technologie de TOURS

Département Génie Biologique

Licence Professionnelle Santé - mention « Biologie Analytique et Expérimentale »

Session 2012-2013

MIGEON Mathieu

INRA Val-de-Loire, Centre d'Orléans, UAGPF UR0588

Plateau technique GENOBOIS

2163 Avenue de la pomme de pin, 45075 Ardon

Maitre d'apprentissage : Jean-Paul Charpentier



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier M. Gilles PILATE, Directeur de l'unité de recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, d'avoir permis la réalisation de mon apprentissage au sein de son unité.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à M. Jean-Paul CHARPENTIER, responsable du plateau technique GENOBOIS, ingénieur de recherche et responsable de mon apprentissage, pour sa disponibilité, sa gentillesse ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée et d'autre part toutes les aides précieuses qu'il a pu m'apporter au cours de mon apprentissage.

Je remercie également M. Vincent SEGURA, chargé de recherche, Mme. Nathalie BOIZOT, assistante ingénieur, M. Kévin ADER, technicien de laboratoire, pour avoir répondu à mes différentes interrogations et pour l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de cette année.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : les permanents et les stagiaires de l'INRA d'Orléans.

ABREVIATIONS

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

HK : Hexokinase

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PLS : *Partial least square* soit « régression des moindres carrés partiels »

SMIR : Spectrométrie moyen infrarouge

SPIR : Spectrométrie proche infrarouge

QTL : *Quantitative trait loci* soit « locus de caractères quantitatifs »

TCR : Taillis à courte rotation

TTCR : Taillis à très courte rotation

RPD : *Ratio of standard deviation* soit « relation entre les écarts types »

RMSEP : *Root mean squared error of prediction* soit « erreur quadratique moyenne »

DNSA : Acide 3,5-dinitrosalicylique

GLOSSAIRE

Métapopulation : Groupe de populations d'individus d'une même espèce, séparées spatialement et qui réagissent réciproquement à un niveau quelconque.

TCR et TTCR : Les taillis à courte ou très courte rotation sont des cultures intensives d'arbres. Les TTCR présentent une densité très forte de 10 000 à 15 000 tiges/ha et ont des rotations de récolte de 2 à 3 ans.

Les TCR ont une densité de l'ordre de 1 000 à 4 000 tiges/ha et des rotations de récolte de 7 à 8 ans.

QTL : Un locus de caractères quantitatifs est une région plus ou moins grande d'ADN qui est étroitement associée à un caractère quantitatif, c'est-à-dire une région chromosomique où est localisé un ou plusieurs gènes à l'origine du caractère en question

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
1. LE PROJET <i>FUTUROL</i>	2
2. LE PEUPLIER : UNE SOURCE DE BIOMASSE IMPORTANTE.....	2
2.1 <i>Description botanique</i>	2
2.2 <i>Répartition et distribution géographique</i>	3
2.3 <i>Utilisation du bois et de la biomasse</i>	4
3. LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE.....	4
3.1 <i>Les constituants chimiques de la paroi végétale : les composés extractibles, la lignine, la cellulose, l'hémicellulose</i>	4
3.2 <i>Processus de conversion de la biomasse lignocellulosique</i>	5
4. MISSIONS ET OBJECTIFS DU STAGE.....	6
MATERIELS ET METHODES.....	7
1. MATERIEL VEGETAL : <i>POPULUS NIGRA</i>	7
1.1 <i>Origine de la population analysée et sélection d'individus représentatifs</i>	7
1.2 <i>Prélèvement et préparation du matériel : broyage</i>	8
2. ANALYSES CHIMIQUES EN VOIE HUMIDE DE LA COMPOSITION LIGNOCELLULOSIQUE	8
2.1 <i>Extraction des composés solubles par la méthode SOXTEC (Rubin, 2008)</i>	8
2.2 <i>Dosage de la lignine insoluble « Klason » et lignine soluble à partir de la poudre extraite</i>	9
2.3 <i>Dosage de la cellulose dans la poudre de bois extraite : holocellulose et α-cellulose</i>	9
3. DOSAGE BIOCHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES STRUCTURAUX	10
3.1 <i>Dosage des glucides par le réactif anthrone sur les filtrats de lignines solubles</i>	10
3.2 <i>Dosage enzymatique du glucose par hexokinase et glucose-6-phosphate déshydrogénase</i>	11
4. SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE (SPIR)	11
4.1 <i>Obtention des spectres</i>	11
4.2 <i>Traitement statistique des spectres par le logiciel R</i>	13
RESULTATS	14
1. CONSTITUANTS LIGNOCELLULOSIQUES DU BOIS DE PEUPLIER NOIR QUANTIFIES PAR METHODE CHIMIQUE.....	14
1.1 <i>Teneur en composés solubles extractibles (figure 10)</i>	14
1.2 <i>Teneur en lignines insolubles Klason et en lignines solubles</i>	14
1.3 <i>Vérification de la qualité de l'extraction des lignines par prise de spectre en moyen infrarouge</i>	16
1.4 <i>Teneurs en holocellulose et en α-cellulose (figure 14)</i>	17
2. ANALYSE DES SUCRES APRES HYDROLYSE LA POUDRE	17
3. REALISATION DE MODELES DE CALIBRATION PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE	20
4. CORRELATIONS DES RESULTATS CHIMIQUES AVEC LES SPECTRES INFRAROUGES : CONSTRUCTION DE MODELES DE CALIBRATION	21
4.1 <i>Modèles pour les lignines totales sur les 24 premiers individus de calibration</i>	21
4.2 <i>Modèles de calibrations avec les 40 échantillons sélectionnés</i>	22
DISCUSSION ET CONCLUSION	24
ANNEXES	26
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	28

INTRODUCTION

1. Le projet *FUTUROL*

Depuis quelques années, la société s'inquiète de la raréfaction et de la disparition progressive et certaine du pétrole et autres énergies fossiles dont la consommation n'a jamais été aussi importante. Une alternative avait été proposée avec la production de bioéthanol à partir de nombreux végétaux alimentaires comme le maïs ou encore la betterave. Cependant la production de ce bioéthanol de première génération pose maintenant problème puisque celle-ci empiète sur la production de denrées alimentaires et incite à la déforestation dans certaines zones du globe. C'est dans cette optique de trouver une autre alternative au pétrole grâce aux végétaux lignocellulosiques qu'est né le projet *FUTUROL*.

Le projet *FUTUROL* est un projet de grande envergure, doté d'un budget d'environ 76,4 millions d'euros, qui vise d'ici 2018 à mettre sur le marché un procédé, des technologies et des produits (enzymes et levures) pour assurer la production industrielle de bioéthanol de deuxième génération à partir de différentes sources de biomasses lignocellulosiques. La production de ce bioéthanol de deuxième génération se ferait par déstructuration de la cellulose et de l'hémicellulose contenues dans la biomasse lignocellulosique afin de libérer les sucres monomères simples (glucose principalement) qui seront ensuite transformés en alcool par des enzymes ou des bactéries compétentes.

Le Projet se déroule en trois étapes conduisant à l'industrialisation du procédé : une phase d'études, recherche, développement et expérimentation (laboratoire), une phase de mise en situation du procédé dans un site pilote (spécialement construit dans le cadre du Projet *FUTUROL*), une phase de mise en œuvre dans une unité prototype (unité industrielle de taille réduite). Les études réalisés à l'INRA d'Orléans se situe dans la première étape de ce projet et l'espèce étudiée pour mettre au point ce bioéthanol de deuxième génération se trouve être le peuplier noir.

2. Le peuplier : une source de biomasse importante

2.1 Description botanique

Le peuplier ou "*Populus*" en latin (qui signifie aussi peuple) fait partie de la famille des Salicacées qui sont eux-mêmes compris dans l'ordre des Salicales et qui font partie du sous-embranchement des Angiospermes (c'est-à-dire des arbres feuillus).

Le genre *Populus* est réparti sur six sections (espèces ayant des caractéristiques morphologiques et écologiques proches) et en 29 espèces. Le peuplier est un arbre dioïque, c'est-à-dire que les fleurs mâles et femelles se trouvent sur des pieds différents. Il est diploïde et possède 19 chromosomes ($2n=38$).

Le peuplier noir est de grande taille (de 25 à 30 m), sa croissance est très rapide, mais sa longévité est de l'ordre de 70 à 80 ans. Les feuilles des peupliers, qui sont généralement grandes et à long pétiole, sont des feuilles caduques, alternes et simples. Les fleurs, toujours dioïques, sont groupées en chatons pendants et

apparaissent au printemps, avant les feuilles. Les fruits sont des capsules arrondies laissant échapper à maturité des petites graines couvertes de poils blancs à l'aspect cotonneux (**figure 1**).



Figure 1 : Organes du peuplier noir (d'après Koehler's Medicinal Plants, 1887)

2.2 Répartition et distribution géographique

En France, la culture du peuplier occupe environ 250 000 ha, soit 1,6% des surfaces forestières et produit 1,5 millions de m³ de bois, soit 30% de la production de grumes feuillus, en seconde position après les chênes qui couvrent 4 220 000 ha avec 2,5 millions de m³ de volume de bois générés. (Berthelot et Chantre, 2004)

On retrouve principalement le peuplier dans les grandes vallées alluviales du Nord de la France, puis la populiculture s'est développée ces douze dernières années dans l'Ouest du Pays. C'est en France que cette sylviculture occupe la plus grande surface en comparaison avec les autres pays de l'Europe.

Les peupliers ont une nette préférence pour les sols frais, profonds et bien drainés. Ils poussent sur les terrains humides voire temporairement inondés et sont exigeants en lumière.

Sous nos latitudes et dans des conditions favorables, la productivité pour un hybride de peuplier peut atteindre jusqu'à 20 m³/ha/an (Berthelot et Chantre, 2004), soit quatre à cinq fois plus que les autres feuillus indigènes. Ceci s'explique par une très forte croissance juvénile, une très bonne réactivité aux soins et aux entretiens (le peuplier ne supporte pas la compétition) mais également par une sélection contrôlée (hybrides interspécifiques et variétés clonales).

Trois espèces endémiques se distinguent en France : le peuplier noir (*Populus nigra*) dont le peuplier d'Italie (clone exclusivement mâle qui sert d'ornement), le peuplier tremble (*Populus tremula*) et le peuplier blanc (*Populus alba*).

Deux espèces sont originaires d'Amérique du nord et sont populaires en Europe : *Populus deltoides* et *Populus trichocarpa* (Berthelot et Chantre, 2004) et servent très souvent à la création d'hybrides notamment avec le peuplier noir (Monclus *et al.*, 2005).

2.3 Utilisation du bois et de la biomasse

Le bois de peuplier présente des caractéristiques appréciées par l'industrie : il est clair, léger, tendre, assez résistant, se travaille facilement, et peut être directement en contact avec les aliments.

Depuis le lancement du projet *FUTUROL* en 2008 (décrit plus haut), l'INRA d'Orléans souhaite développer des variétés de peuplier pour la production de biomasse dédiée à la transformation en biocarburant et aptes à être cultivées en forte densité (Taillis à Courte Rotation, TCR ou Taillis à Très Courte Rotation, TTCR). Pour cela, il est question de travailler à partir d'échantillonnages très importants de croisements de *P. nigra* x *P. nigra* (Métapopulations) et de mettre au point et d'utiliser des techniques d'analyses haut débit des propriétés du bois issu de ces populations.

3. La biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est une source abondante de carbone naturel et la principale alternative au carbone fossile ; elle est présente chez un très grand nombre de végétaux en allant du simple brin d'herbe aux arbres comme le chêne en passant bien sûr par le peuplier dont il est question ici.

3.1 Les constituants chimiques de la paroi végétale : les composés extractibles, la lignine, la cellulose, l'hémicellulose

La biomasse lignocellulosique est composée de trois éléments principaux que sont la cellulose (40-50%), l'hémicellulose (25%) et la lignine (25-35%) en quantité variable après élimination des composés extractible du bois (10% par rapport à la biomasse sèche totale) selon les espèces végétales (**figure 2**). Les composés qui sont extraits avant analyse de la biomasse sont principalement des corps gras, des terpènes (responsables de l'odeur) ou bien des composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques ou les tanins qui jouent des rôles dans la répulsion des insectes, l'inhibition ou la diminution de la croissance fongique et confère des propriétés antioxydante à la plante. La cellulose (ou alpha-cellulose) est un polymère glucidique linéaire d'unités de cellobiose β 1-4, qui se trouve être elle-même un polymère de glucose β 1-4. L'association parallèle de ces chaînes polysaccharidiques de cellulose par des liaisons hydrogène forme des microfibrilles (5 à 12 nm de diamètre), constituants majeurs des parois primaires, qui confèrent à la fois la solidité et l'élasticité aux végétaux (Rubin, 2008). Dans les végétaux lignifiés, la cellulose est associée à deux autres constituants, l'hémicellulose et la lignine avec lesquelles elle forme des parois secondaires lignifiées (fibres et bois).

Les polymères d'hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides qui sont également des matériaux de support des parois. Par leurs configurations branchées ils assurent la liaison entre les fibres de celluloses. Les monomères constitutifs de l'hémicellulose peuvent être du glucose, du xylose, du mannose, du

galactose, du rhamnose ou de l'arabinose, des sucres à cinq ou six carbones (C5, C6). A cause de cette hétérogénéité de leurs constituants chimiques, les hémicelluloses, dans leur état natif, sont de nature amorphe non cristallisable et sont des polymères ramifiés de faible poids moléculaire ce qui rend leur hydrolyse par les acides relativement plus facile que celle de l' α -cellulose (Rubin, 2008). L'hémicellulose et la cellulose (soit l'holocellulose) forment la matrice pectocellulosique des parois secondaires des cellules végétales, dans laquelle s'enchevêtrent des polymères de monolignols : les lignines.

La lignine est un polymère complexe, non linéaire, composé de monomères eux-mêmes constitués d'un squelette phényl-propane (Rubin, 2008). Il y a trois principaux types de monomères différents : l'alcool para-coumarylique aussi appelé unité H (hydroxyphénile), l'alcool coniférylique appelé unité G (guaiacyl) et l'alcool sinapylique appelé unité S (syringile). Les lignines constituées d'unité G et S sont typiques des angiospermes et sont caractérisées par leur ratio S/G (Vanholme *et al.*, 2010).

La concentration en lignine chez le peuplier varie par ailleurs en fonction des espèces, des tissus et organes de la plante (Yin *et al.*, 2010), de l'âge de développement (Sykes *et al.*, 2008) et de facteurs environnementaux (Novaes *et al.*, 2009).

La présence de lignine dans la paroi secondaire de certaines cellules végétales apporte aux végétaux une meilleure solidité ainsi qu'un bon maintien car la lignine possède une bonne résistance à la compression. De plus, la lignine possède un pouvoir d'imperméabilisation des cellules, du fait de son hydrophobicité et offre une barrière naturelle contre les attaques microbiennes du végétal.

La lignine peut être séparée en deux groupes : les lignines solubles qui sont dégradables par attaque acide à chaud (tout comme la cellulose et l'hémicellulose) et les lignines insolubles dites lignines « Klason » qui elles sont insensibles à ce procédé.

Les différences structurelles entre ces éléments influencent directement leurs réactivités chimiques, c'est pourquoi la connaissance de la quantité totale de chaque composant est cruciale afin de prévoir l'efficacité d'un processus de conversion de la biomasse. Des recherches sont actuellement en cours sur différentes espèces comme le peuplier (nombreuses études au centre INRA d'Orléans), le miscanthus, le mélèze, le Switchgrass, le Sorgho et ces études visent à trouver des espèces OGM (Organisme Génétiquement Modifiés) ou hybrides qui produiraient moins de lignines car c'est un obstacle à la transformation de la biomasse (Chen et Dixon, 2007; Studer *et al.*, 2011).

3.2 Processus de conversion de la biomasse lignocellulosique

Pour réussir à produire du bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique un procédé spécifique est utilisé (**figure 3**), la biomasse subit un prétraitement permettant d'éliminer les composés pouvant empêcher la saccharification de la biomasse, c'est-à-dire la dégradation des polysaccharides pariétaux en sucres simples fermentescibles. Cette saccharification se déroule en bioréacteur en présence d'enzymes de type cellulase issus de bactéries ou de champignons comme *Trichoderma reesei* qui est la principale souche exploitée pour

l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique (Gusakov, 2011). Actuellement, seuls les hexoses contenus dans la biomasse sont exploités car le traitement des pentoses n'est pas encore réalisable puisqu'aucune souche n'a encore été déterminée comme assez productive pour la mise en place dans un procédé industriel. Suite à la saccharification, les sucres simples subissent une fermentation par des levures tel que *Saccharomyces cerevisiae* (Antoni *et al.*, 2007), puis une distillation qui permet d'obtenir de l'éthanol d'origine végétal.

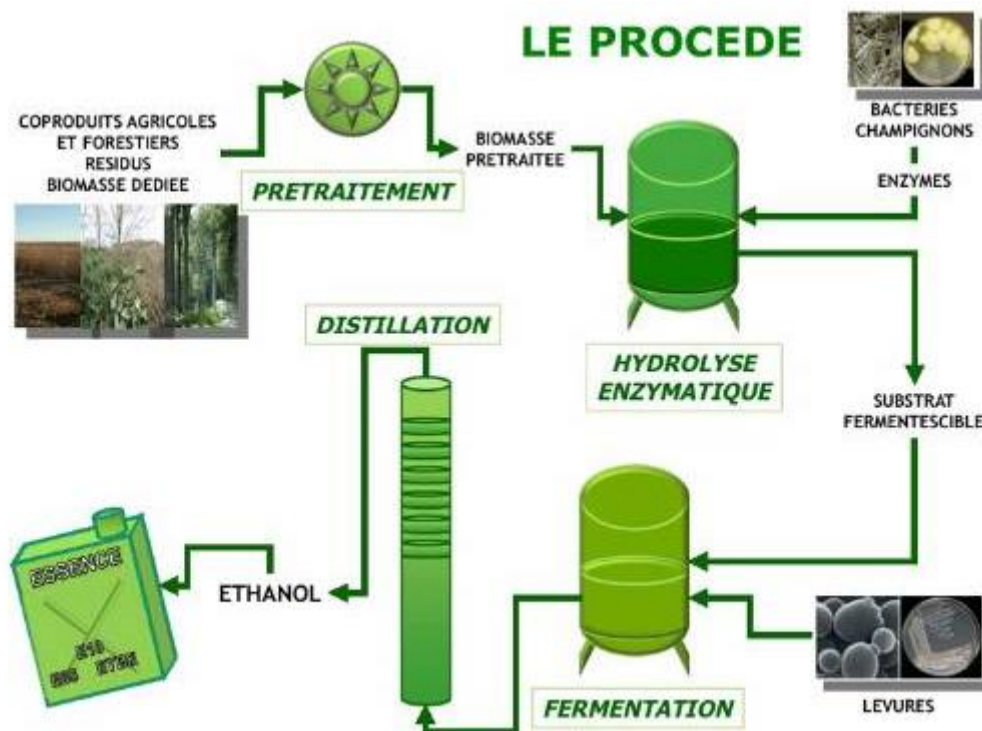


Figure 3 : Procédé de fabrication de bioéthanol de deuxième génération à partir de biomasse lignocellulosique (FUTUROL - M.Jolyot)

4. Missions et objectifs du stage

Au cours de mon apprentissage, les missions qui m'ont été confiées pour mener à bien l'étude réalisée ont été les suivantes :

- Réaliser des dosages chimiques des composés extractibles, de la lignine et de la cellulose sur un échantillonnage de 40 individus sélectionnés.
- Mettre en place des modèles de prédiction à partir de la corrélation des résultats de dosages avec des données de spectrométrie proche infrarouge, pour la prédiction à haut-débit des caractéristiques biochimiques du bois sur des populations importantes de peuplier noir.
- Déterminer la quantité de glucose potentiellement récupérable à partir du bois de peuplier noir par deux méthodes de dosages biochimiques différentes.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel végétal : *Populus nigra*

1.1 Origine de la population analysée et sélection d'individus représentatifs

Le matériel analysé provient d'une population totale de 791 plants de peupliers noirs issus de 288 clones de *Populus nigra* organisés en 7 métapopulations, avec des origines géographiques et des propriétés génétiques différentes (**figure 4**). Des échantillons ont été sélectionnés selon leur teneur en lignines prédites à l'aide d'un pré-modèle (pour être représentatifs de l'ensemble de l'échantillonnage) développé sur une autre population de peuplier noir (El Malki, 2013).

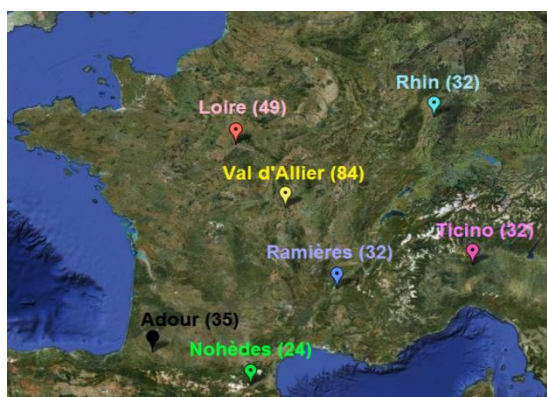


Figure 4 : Implantation géographique des clones de peuplier noir

(D'après la présentation INRA : Using Near Infrared Spectroscopy to explore geographical patterns of genetic diversity and predict quantitative phenotypes Application to natural populations of *P. nigra*, Segura V, 2013)

Dans un premier temps, la population entière (791 échantillons) est passée au Spectromètre Proche Infrarouge (SPIR), et la prédiction des teneurs en lignines a été faite pour l'ensemble des échantillons en utilisant un modèle de calibration préalablement établi sur peuplier noir (El Malki, 2013).

Par la suite, a été sélectionnée une première série de 24 échantillons comme les individus les plus représentatifs de la variation en lignines de l'ensemble de la population (**figure 5A**) et qui seront analysés chimiquement et constitueront l'échantillonnage de calibration. Grâce à ces nouvelles données de référence, un nouveau modèle a permis de prédire de nouveau la population entière parmi laquelle 16 nouveaux échantillons ont été sélectionnés plutôt vers des valeurs extrêmes pour élargir la gamme de variation de la teneur en lignines de l'échantillonnage (**figure 5B**). De nouveau, ces 16 échantillons sont analysés et serviront de validation pour le modèle de prédiction. Au total, ce sont donc 40 échantillons qui ont été analysés au cours de cette étude.

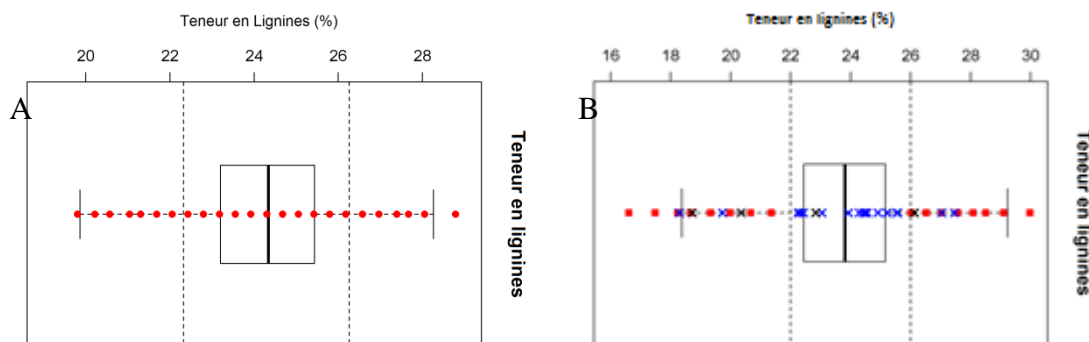


Figure 5 : Détermination des échantillons à analyser chimiquement et leur répartition par rapport à l'ensemble des échantillons prédits de la population pour leur teneur en lignines pour l'amélioration du modèle de calibration en SPIR

(A : les 24 premiers échantillons à analyser; B : 16 nouveaux échantillons déterminés à partir du modèle de calibration amélioré et les résultats obtenues chimiquement pour les 24 échantillons précédents)

Sur l'ensemble des 40 échantillons analysés, 6 espèces proviennent des bords de Loire, 5 de la vallée du Rhin, 11 du Val d'allier, un de la réserve naturelle des Ramières (Val de Drôme), 7 du canton du Tessin en Suisse (Ticino), 3 des bords de l'Adour (fleuve du bassin aquitain), 4 de la région de Nohèdes (Pyrénées-Orientales) ainsi qu'un individu des bords la rivières Sinni (sud de l'Italie) et un autre de l'arborétum de Cazebonne (Gard), ces deux derniers étant des parents (hors métapopulation) qui ont servi aux croisements pour obtenir les populations.

1.2 Prélèvement et préparation du matériel : broyage

Les échantillons ont été récoltés durant l'hiver 2009-2010, chaque plant de peuplier noir a permis d'obtenir trois sections de 50 cm de tronc. Tous les échantillons ont ensuite été broyés jusqu'à obtenir une poudre de granulométrie de 500-1000 μm d'abord à l'aide d'un broyeur à couteaux qui permet de broyer grossièrement les morceaux de bois puis grâce à un broyeur à bille qui permet l'obtention d'une poudre fine (figure 6).

2. Analyses chimiques en voie humide de la composition lignocellulosique

Pour les manipulations suivantes, les échantillons ont été traités par groupe de huit excepté pour les dosages des sucres.

2.1 Extraction des composés solubles par la méthode SOXTEC (Rubin, 2008)

Les échantillons sont d'abord placés en sachet thermosoudables F57 (ANKOM, New York, USA), de porosité 25 μm , à raison de 1,1 g par sachet (figure 6). Ceux-ci sont ensuite placés dans une étuve à 105°C pour être séchés puis pesés. Les sachets sont alors traités par extraction (8 sachets à la fois) en ballon de 2 L alternativement dans trois bains (1 L) d'eau ultra-pure et quatre bains (1 L) d'éthanol à 96% (VWR, Fontenay sous-bois, France) chauffés à ébullition pendant 30 minutes. Les sachets sont replacés à 105°C après extraction pendant une nuit afin de les sécher ; Il est possible de calculer la teneur en extractibles

contenus dans chaque échantillon par pesées différentielles des poudres avant et après extraction. Les poudres dites extraites sont conservées pour les dosages des lignines et de la cellulose.



Figure 6 : Différentes étapes suivies par la poudre de bois du broyage à la mise en sachet

2.2 Dosage de la lignine insoluble « Klason » et lignine soluble à partir de la poudre extraite

Pour déterminer les compositions en lignines de chaque échantillon précédemment extrait, environ exactement 300 mg de poudre sont placés en bouteille (*SCHOTT*, Sydney, Australie). Une attaque acide est effectuée avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 72% pendant 1 h à 20°C puis dilué à 3% suivi d'un passage à l'autoclave de paillasse (*TUTTNAUER*, Bréda, Pays-Bas) pour une hydrolyse à chaud 1h à 120°C. Les solutions sont filtrées à travers des creusets-filtres de 75 mL de porosité 16-40 μm (numérotés et préalablement pesés) sur une rampe de filtration à vide, les filtrats sont récupérés, puis les résidus solides de lignines Klason sont rincés avec 1 L d'eau ultra-pure. Les creusets contenant les résidus sont pesés, après une nuit à 105°C, pour déterminer la teneur en lignines Klason contenues dans un échantillon par pesées différentielles des poudres de chaque échantillon avant et après hydrolyse. Les filtrats recueillis précédemment sont analysés par spectrométrie UV à 205nm en cuve en quartz pour déterminer la teneur en lignines solubles dans les échantillons.

2.3 Dosage de la cellulose dans la poudre de bois extraite : holocellulose et α -cellulose

Pour ces dosages, des répétitions ont été réalisées pour les 24 premiers échantillons mais pas pour les 16 suivants

Dosage de l'holocellulose

Pour déterminer les compositions en holocellulose de chaque échantillon précédemment extrait, environ exactement 1 g de poudre est placé en bouteille de 250 mL (*SCHOTT*, Sydney, Australie). La poudre extraite subit une délignification à chaud (76°C pendant 4h) dans une solution de chlorite de sodium ($NaClO_2$) à 27% en tampon acétate pour obtenir le résidu holocellulose. La solution pâteuse formée se décolore, ce qui correspond à la dégradation de la lignine. Cette solution est ensuite filtrée au travers d'un creuset-filtre par filtration sous vide léger, les pâtes cellulosiques sont ensuite rincées avec 300 à 500 mL

d'eau ultra-pure jusqu'à décoloration complète puis lavées par 30 mL d'acétone pour éliminer tous les composés aromatiques issus de la dégradation de la lignine. Les creusets sont ensuite placés une nuit à 105°C pour les sécher puis pesés pour obtenir la teneur en holocellulose présent dans la poudre de bois extraite, les résidus d'holocellulose secs sont conservés en dessiccateur pour le dosage de l' α -cellulose.

Dosage de l' α -cellulose

La détermination de la teneur en α -cellulose se fait à partir d'environ 700 mg de résidu holocellulose placés en bouteille de 100 mL. Une attaque alcaline est réalisée sous agitation à température ambiante avec 12,5 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 17,5% ajoutés progressivement pendant 45 minutes. L'attaque est arrêtée par l'ajout d'eau ultra-pure dans les bouteilles, les solutions sont filtrées sous vide léger et 50 mL de NaOH à 8,3% sont ajoutés dans chaque creuset. Les résidus α -cellulose sont lavés à l'eau ultra-pure puis l'ajout de 7,5 mL d'acide acétique (CH_3COOH) à 10% permet de neutraliser le NaOH restant. Les creusets sont ensuite placés une nuit à 105°C pour les sécher puis pesés pour obtenir la teneur en α -cellulose présente dans les résidus d'holocellulose secs, ceci permet également de déterminer, par soustraction, la teneur en hémicellulose présente dans ces mêmes résidus.

3. Dosages biochimiques des polysaccharides structuraux

3.1 Dosage des glucides par le réactif anthrone sur les filtrats de lignines solubles

L'analyse des glucides solubles totaux est effectuée selon une méthode de dosage colorimétrique à l'anthrone (Updegraff, 1969; Yemm et Willis, 1954) qui repose sur la capacité des glucides solubles à se complexer en milieu sulfurique avec un composé (ici l'anthrone) pour former un chromophore absorbant dans le visible (Gomez *et al.*, 2003). L'ensemble des filtrats est testé, soit quarante échantillons à raison de deux filtrats par échantillon.

Les filtrats obtenus lors du dosage des lignines sont dilués au 1/50^{ème} en eau ultra-pure. Le réactif anthrone à 2 mg/mL est préparé à partir d'anthrone solide dilué dans 30 mL d'acide sulfurique à 95%. La réaction a lieu en plaque 96 puits contre une gamme de glucose allant de 0 à 50 $\mu\text{g/mL}$. En tube *Eppendorf*, 400 μL de filtrat dilué sont mis en contact avec 800 μL de réactif à l'anthrone ; le mélange prend alors une couleur bleu-vert correspondant à la réaction du glucose avec l'anthrone. Les tubes sont ensuite chauffés pendant 10 minutes à 90°C au bain-marie, puis refroidi dans la glace afin d'arrêter la réaction. Une fois refroidis, les échantillons et la gamme de glucose sont déposés en *triplicata* en plaque 96 puits à raison de 250 μL par puits, la densité optique (DO) est lue à 630 nm par un spectrophotomètre *Multiskan Spectrum* (*THERMOFISHER Scientific*, Finlande). A partir de l'équation obtenue avec la gamme étalon de glucose, les concentrations en mg/L d'équivalent glucose au sein des extraits peuvent être calculées. Ces concentrations en mg/mL sont ensuite ramener en milligrammes de glucose par gramme de matière sèche initiale pour chaque échantillon.

3.2 Dosage enzymatique du glucose par hexokinase et glucose-6-phosphate déshydrogénase

L'hexokinase permet, en présence d'ATP, d'obtenir du glucose-6-phosphate à partir de glucose, l'oxydation de ce glucose-6-phosphate en gluconate-6-phosphate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est couplée à la réduction du NADP^+ en NADPH, H^+ (Gomez *et al.*, 2003).

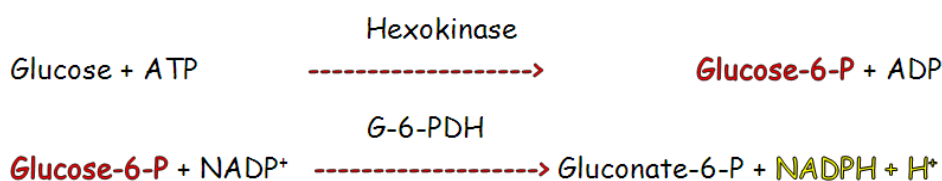


Figure 7 : Equation de dosage du glucose par réduction du NADP en NADPH^+

La quantité de NADPH, H^+ formée est proportionnelle à la concentration du glucose de l'échantillon (**figure 7**) et peut être mesurée par l'augmentation de l'absorbance des solutions à 340nm. Les filtrats les plus représentatifs de la variation obtenue avec le dosage à l'anthrone (seulement dix-huit filtrats sur les quatre-vingt) sont dosés par la méthode enzymatique en double pour chaque échantillon.

Les filtrats obtenus lors du dosage de la lignine ont été traités en conditions très acides ainsi la mesure du pH de ces filtrats a permis de mettre en évidence un pH compris entre 0 et 1. Les enzymes utilisées pour le dosage possédant un pH d'activité optimal de 7,8, il est nécessaire de réajuster le pH des filtrats par ajout de NaOH à 5 M et de façon plus fine avec du NaOH à 0,1 M. Les enzymes sont reprises avec une solution de sulfate d'ammonium à 2,5 M (pH 6) à raison de 300 U/mL d'hexokinase et 133 U/mL de G6PDH. Des solutions de glucose témoins sont préparées à 0,1 mg/mL et 0,4mg/mL pour vérifier l'efficacité du dosage.

Pour le dosage, 50 μL de chaque échantillon sont distribués en cuve spectrométrique avec 770 μL de tampon réactionnel. Un premier relevé d'absorbance est effectué à 340 nm (A_1), les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à 30°C après ajout de 10 μL HK-G6PDH une seconde mesure d'absorbance est réalisée (A_2). La différence d'absorbance entre les deux mesures (ΔA) est calculée et la concentration en mg/g de matière sèche peut ainsi être déterminée (voir détail du dosage en **annexe I**).

4. Spectroscopie proche infrarouge (SPIR)

4.1 Obtention des spectres

Le plateau technique GéoBois est équipé d'un spectromètre proche infrarouge (SPIR) *Perkin Elmer Spectrum 400* (**figure 8**). Il s'agit d'un appareil d'analyse, qui par une méthode basée sur l'absorption énergétique du rayonnement proche infrarouge par la matière organique selon les liaisons chimiques qui la constituent, permet de donner des résultats quantitatifs (intensité des bandes d'absorption) et qualitatifs (absorbance à une longueur d'onde spécifique d'un matériau) sur la composition de la matière analysée. Les principales liaisons moléculaires pouvant être mise en évidence suite à leur entrée en vibration sont les liaisons C-H, N-H, O-H, C-N.



Figure 8 : Spectrophotomètre infrarouge *Spectrum 400* (Perkin Elmer, Courtabœuf, France)

Les résultats donnés par l'appareil se présentent sous forme de spectres PIR sur lesquels on retrouve des bandes dites harmoniques et des bandes traduisant la combinaison des vibrations fondamentales au niveau des liaisons (**figure 9**). Elle nécessite par contre l'établissement préalable d'un modèle de calibration.

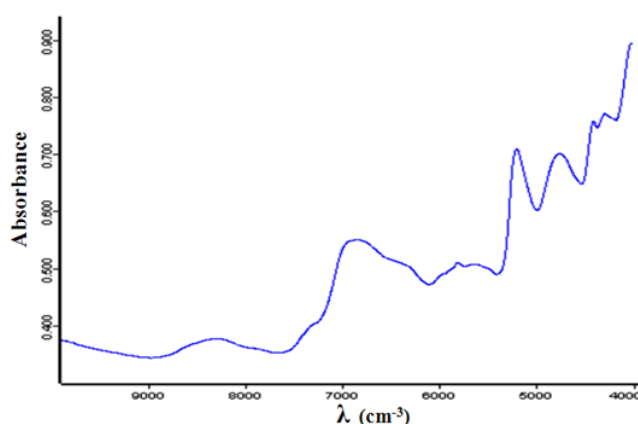


Figure 9 : Exemple d'un spectre obtenu en proche infrarouge sur de la poudre de bois de peuplier (échantillon n°3591).

La SPIR est une technique possédant de nombreux avantages, elle est:

- Rapide : il suffit de quelques minutes pour obtenir un spectre d'absorption, permettant de prédire la composition exact du matériau. Ce qui contraste avec la très longue durée d'une analyse chimique qui peut prendre plusieurs jours.
- Non destructive : l'échantillon est récupéré intact après analyse. Cette propriété est particulièrement importante pour des échantillons que l'on possède en quantité restreinte ou que l'on souhaite réutiliser ultérieurement.
- Peu onéreuse : une fois l'appareil acquis, l'analyse des échantillons en SPIR ne représente aucun coût de fonctionnement.

Cependant, l'utilisation de la SPIR pour des analyses quantitatives nécessite l'établissement d'un modèle de calibration et de prédiction qui demande l'analyse par des méthodes de référence d'un sous-échantillonnage bien choisi.

Les échantillons bruts (poudre non extraite) sont analysés en flacons en verre contenant environ 1 g de poudre au proche infrarouge (PIR ; 12 500-4000 cm^{-1}) (Segura *et al.*, 2013) alors que les résidus de lignines

insolubles « Klason » sont analysés en moyen infrarouge (MIR ; $4000-400\text{ cm}^{-1}$) avec un accessoire ATR (Réflectance Total Atténuée) qui permet de résoudre le problème d'humidité des échantillons (Bertrand et Dufour, 2000) et d'analyser les résidus à partir de seulement quelques milligrammes d'échantillons en appliquant une pression sur ceux-ci.

Les valeurs d'intérêts conservées sont de $8000-4000\text{ cm}^{-1}$ pour la SPIR et de $1800-900\text{ cm}^{-1}$ pour la SMIR.

4.2 Traitement statistique des spectres par le logiciel R

Les spectres obtenus présentent des variations indépendantes de la variabilité des échantillons liées à l'environnement (température et humidité de l'air, tassement de la poudre, homogénéité de la taille des particules...), il convient donc de les traiter mathématiquement pour supprimer l'influence de ces variations externes ; ils subissent une normalisation permettant d'uniformiser les variations. Les données subissent ensuite deux calculs de dérivées successives permettant de rendre les spectres interprétables, comparables et amplifiant des différences entre spectres (Hruschka, 1987). Ainsi, huit combinaisons différentes de traitement sont utilisées pour la construction des modèles, seules les combinaisons qui donnent les meilleures qualités de modèle sont conservées. Les spectres ainsi traités sont mis en corrélation avec les résultats chimiques (obtenus par le biais des dosages) grâce à la méthode de régression des moindres carrés partiels (PLS = *Partial Least Squares*) pour obtenir des modèles de corrélation et de prédiction (Tenenhaus, 1998). La recherche de « outliers », valeurs aberrantes permet d'améliorer les modèles.

Les modèles sont validés par validation croisée au sein de l'échantillonnage par la méthode dite de Monte Carlo (Metropolis, 1985; Metropolis et Ulam, 1949). L'échantillonnage est partagé en quatre groupes égaux, 3 servent à construire le modèle et à prédire le 4^{ème}. Les groupes sont tirés au hasard et ceci est réitéré 500 fois. De plus, une sélection de bandes sur la totalité des spectres peut être utilisée selon une méthode statistique permettant la meilleure corrélation possible entre les données spectrales et les valeurs de référence (Li *et al.*, 2009)

La qualité des modèles est déterminée grâce au coefficient de régression en validation croisée R^2 qui doit être proche de 1 et au nombre de composantes du modèle de régression utilisées (PLS) qui doit être le plus faible possible.

En outre, au cours de la validation croisée, diverses statistiques sont estimées afin d'évaluer la qualité du modèle sélectionné, comme le coefficient de détermination de validation croisée (R^2_{cv}), l'erreur moyenne de prédiction en validation croisée (RMSEP_{cv}) et le critère RPD (ratio entre écart-type de la variable de référence à calibrer et RMSEP_{cv}).

RESULTATS

1. Constituants lignocellulosiques du bois de peuplier noir quantifiés par méthode chimique

Tous les résultats de ces dosages sont présentés en **annexe II**.

1.1 Teneur en composés solubles extractibles (figure 10)

Le dosage des composés extractibles des différents clones a donné une gamme assez large de pourcentages allant de 6% à 19,5% de la matière sèche, pour une moyenne de 10,7% et une médiane de 9,82% (représentée en rouge) par rapport à la matière sèche. Aux extrêmes quatre échantillons possèdent une teneur très forte en extractibles (3427, 4074, 4031, 3957) entre 15% et 20% et quatre autres échantillons avec des teneurs faibles en extractibles (3610, 3768, 3857, 3862) entre 6% et 7%. Les dosages suivants seront réalisés à partir des poudres de peuplier sans composés extractibles nommées poudres « extraites ».

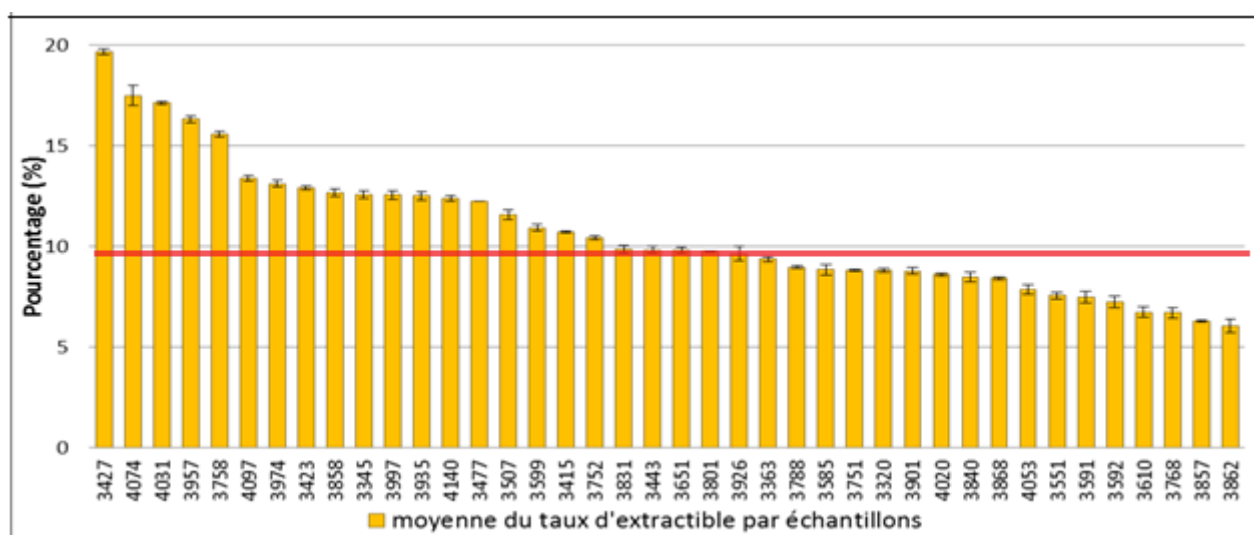


Figure 10 : Teneur en composés extractibles du bois de peuplier noir après extraction par le système *SOXTEC* (médiane des valeurs représentée en rouge)

1.2 Teneur en lignines insolubles Klason et en lignines solubles

Le dosage des lignines solubles donnent des résultats assez proches pour l'ensemble des échantillons, entre 3% et 5% (**figure 11**) de lignines solubles par rapport à la matière sèche extraite. C'est donc la teneur en lignines insolubles obtenu par la méthode Klason qui est responsable de la variabilité de la teneur en lignines totales au sein des échantillons (excepté pour l'échantillon 3997), ces concentrations en lignines Klason varient de 13,6% à 24,8% par rapport à la poudre de peuplier extraite dans notre échantillonnage (**figure 11**) avec une moyenne de 19,52% de lignine Klason. La variation de lignines totales calculées à partir de l'addition des teneurs en lignines solubles et en lignines Klason, s'étend de 17% à 29% avec des extrêmes fort pour les échantillons 3585 et 4020 ; et des extrêmes faibles pour les échantillons 3758 et 3427

(figure 11). La moyenne de teneur en lignines totale pour l'échantillonnage est de 23,36% par rapport à la poudre extraite et la médiane (représentée en rouge) se trouve être de 23,20%.

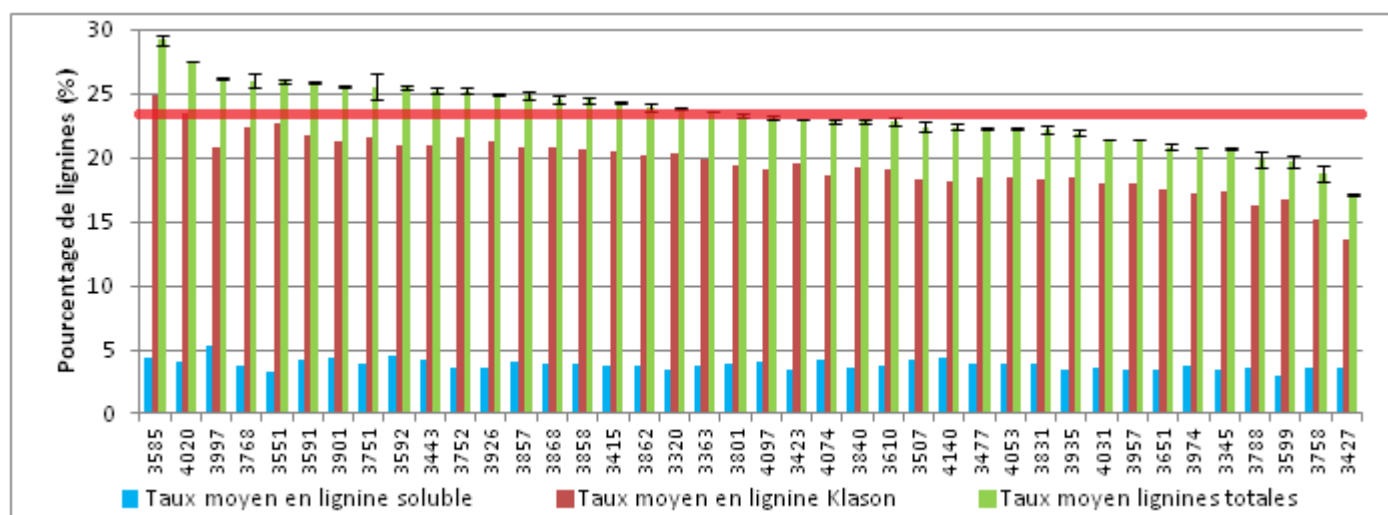


Figure 11 : Teneurs en lignine solubles, insolubles Klason et totales déterminées suite aux dosages chimiques sur les échantillons de bois de peuplier (médiane des valeurs pour les lignines totales représentée en rouge)

La distribution des teneurs en lignines observées dans la population des 40 échantillons analysés est présentée **figure 12**. Ce qui ressort de cette répartition est le nombre important d'individus (26 soit 65% de la population) qui possèdent une concentration en lignines totales entre 22% et 26% (**figure 12A**), ceci est dû au fait que la composition des 24 premiers individus sélectionnés a été mal estimée et que 17 d'entre eux possédaient une concentration en lignines totales comprise entre 22% et 26% (**figure 12B**). Le dosage des lignines Klason montre une répartition semblable à celle des teneurs en lignines totales avec 27 individus (soit 67,5% de la population) compris entre 18% et 22% (**figure 12B**). Concernant les lignines solubles la quasi-totalité des individus (95%) présente une concentration comprise entre 3% et 4,5% (**figure 12C**), ce qui confirme la faible variation de ce paramètre selon les individus. Néanmoins, ces distributions d'allure « normale » donnent de bonnes chances d'espérer l'établissement d'un bon modèle de calibration SPIR pour les lignines.

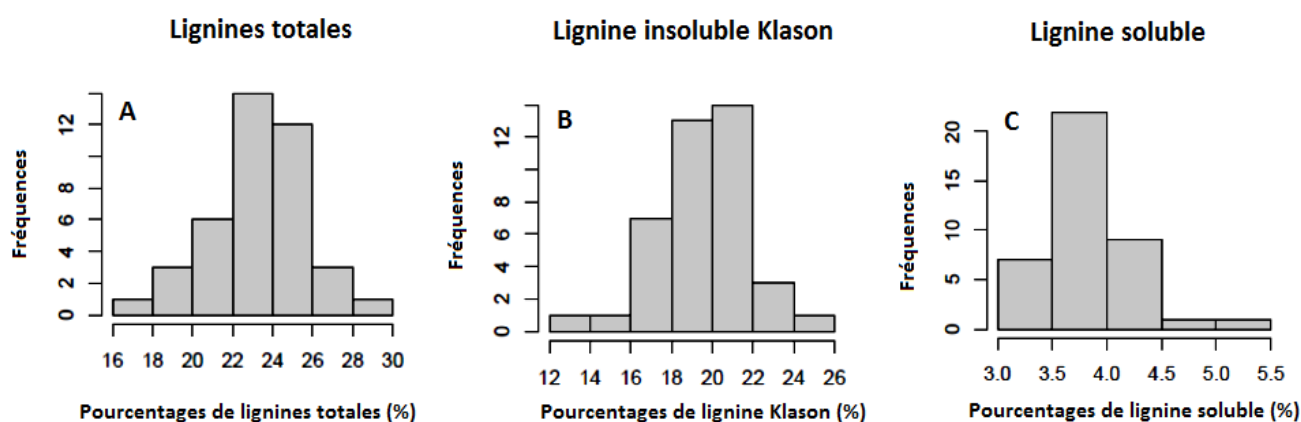


Figure 12 : Répartitions des échantillons en fonction de leur pourcentage en lignines totales (A), en lignines insolubles Klason (B) et en lignines solubles (C)

1.3 Vérification de la qualité de l'extraction des lignines par prise de spectre en moyen infrarouge

Le passage des 80 résidus de lignines Klason observés en SMIR a permis d'obtenir les spectres présentés en **(figure 13A)**. La mesure d'absorbance des rayonnements infrarouges a été relevée entre 1800 cm^{-1} et 900 cm^{-1} ce qui a permis de vérifier l'intégrité du résidu lignines obtenu après attaque acide et de faire ressortir certaines extractions de mauvaise qualité dans le lot des extractions : soit des extractions incomplètes avec la présence de structures carbohydrates (issues de la cellulose ou de l'hémicellulose) ou des échantillons encore contaminés par des réactifs issus des dosages par un mauvais rinçage. Mais la très grande majorité des échantillons est bien hydrolysée **(figure 13B)**. Cette vérification spectrale en MIR permet de vérifier l'efficacité des hydrolyses réalisées et de notre méthode mise en place au laboratoire.

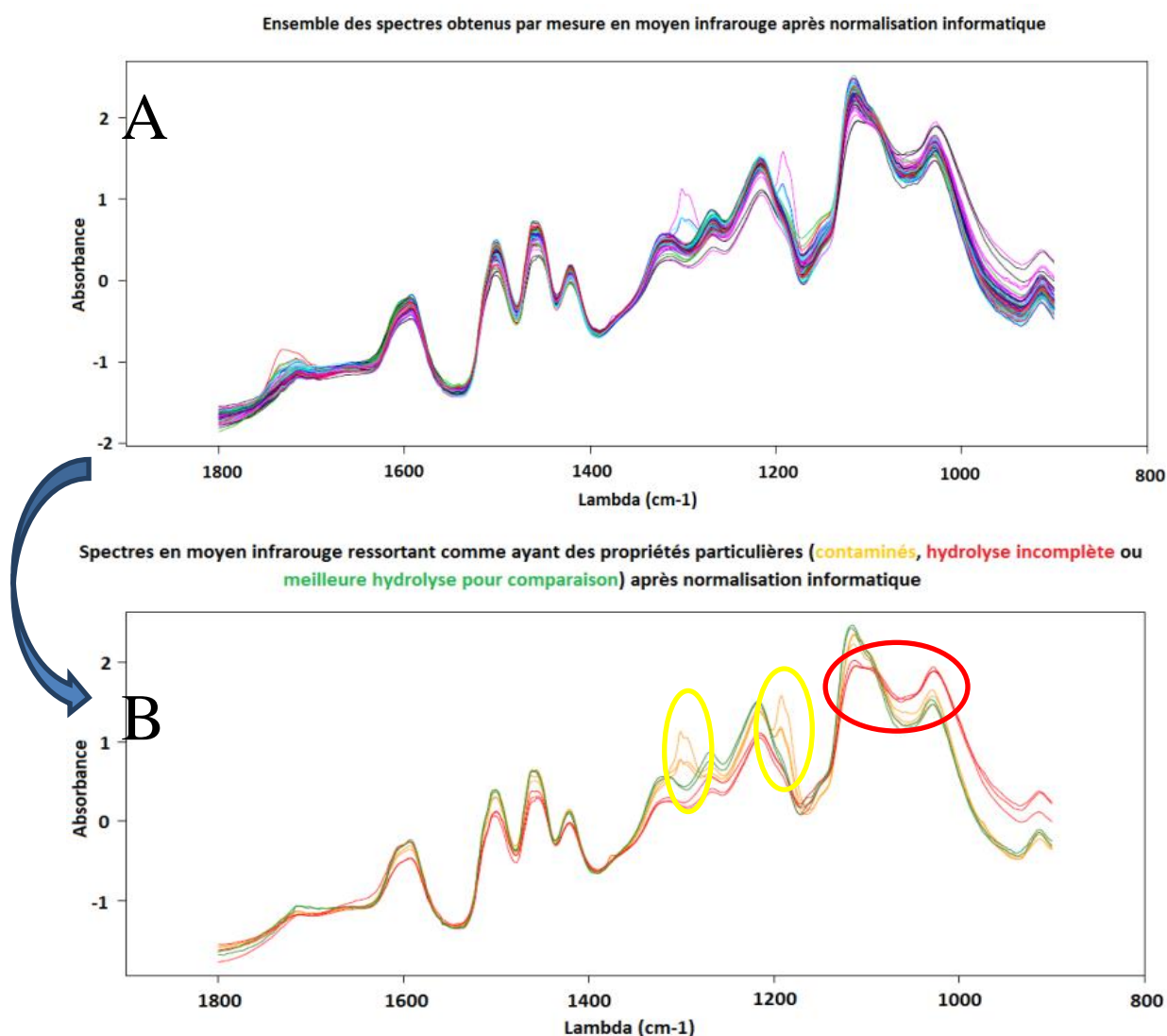


Figure 13 : Spectres MIR des résidus de lignines Klason de 1800 cm^{-1} à 900 cm^{-1} (A : Totalité des spectres réalisés ; B : Spectres caractéristiques mis en évidence)

Les échantillons ressortant comme contaminés sont les échantillons 3443, 3477 et 3507 ; cette contamination serait à priori liée à l'étape de rinçage qui n'aurait pas permis d'éliminer en totalité l'acide

sulfurique utilisé pour dégrader les carbohydrates de la poudre de bois. La présence de ce réactif restant influe sur la prise de spectre vers 1200 cm^{-1} et 1300 cm^{-1} (figure 13B).

Les échantillons qui présentent une hydrolyse incomplète sont les échantillons 4020, 3320 et 3599 ; l'hydrolyse procédée n'a pas permis l'élimination complète des carbohydrates présents dans la poudre de bois ce qui fausse la prise de spectres entre 1000 cm^{-1} et 1100 cm^{-1} (figure 13B).

Ces échantillons sont repris pour une nouvelle attaque acide ou répétés à partir d'une nouvelle prise de poudre de bois extraite.

1.4 Teneurs en holocellulose et en α -cellulose (figure 14)

Le dosage de l'holocellulose sur les 24 premiers individus avec 2 répétitions et celui des 16 individus de confirmation avec une seule répétition a permis d'obtenir des résultats allant de 71,3% à 82,8% en holocellulose par rapport à la matière sèche extraite, la valeur moyenne obtenue est de 77,58% d'holocellulose. Concernant l' α -cellulose contenue dans les résidus holocellulose, les résultats obtenus varient de 50,5% à 57,5%. On remarque des individus avec des valeurs extrêmes aux alentours de 57,5% (3423) pour le plus fort et de 50,5% (4097, 3320, 3427, 3507, 3585) pour les plus faibles.

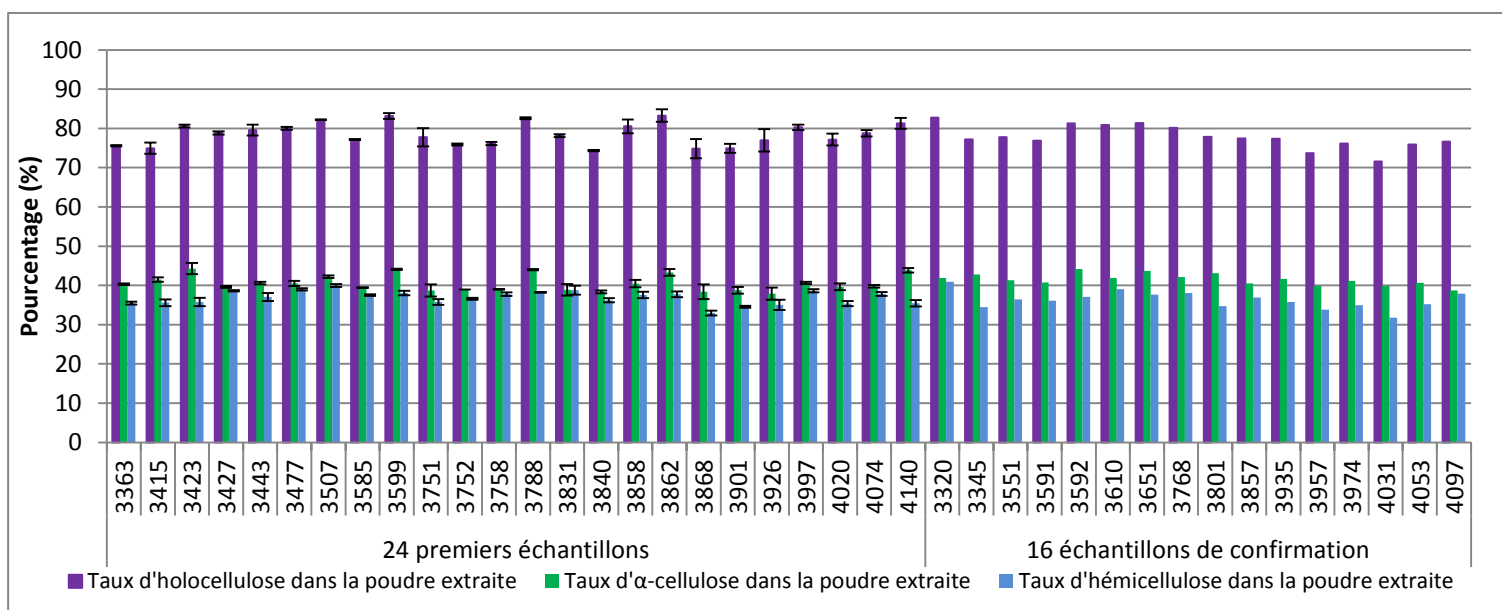


Figure 14 : Teneurs en holocellulose, α -cellulose et en hémicellulose par rapport à la poudre extraite des échantillons de bois de peuplier noir

A partir de ces deux dosages, la teneur en hémicellulose contenue dans les échantillons peut être calculée par soustraction de la teneur en α -cellulose sur la teneur en holocellulose. En plus d'avoir été estimé par le biais de ce dosage, la teneur en holocellulose a été prédite par soustraction des teneurs en lignines totales sur la totalité de la matière extraite (voir résultats annexe I).

2. Analyse des sucres après hydrolyse la poudre

L'analyse des filtrats issus du dosage des lignines insolubles « Klason » d'abord réalisée par une méthode biochimique par le réactif à l'antrone en conditions acides a permis de déterminer les

concentrations en équivalent glucose ; dans les filtrats puis dans la poudre extraite (**figure 15**). Les résultats indiquent que certains résidus ont des concentrations fortes de l'ordre de 230 mg de glucose par g de matière sèche extraite (échantillons 3788, 3997, 3751) et d'autres résidus moins concentrés en glucose avec des résultats aux alentours de 180 mg de glucose par g de matière sèche extraite (échantillons 3415, 4020, 4031, 3858, 3926). A la suite de ce dosage, 18 individus représentatifs de la population ont été sélectionnés afin de leur faire subir un dosage enzymatique par de l'hexokinase couplé à de la G6PDH, ils sont représentés en rouge **figure 15**.

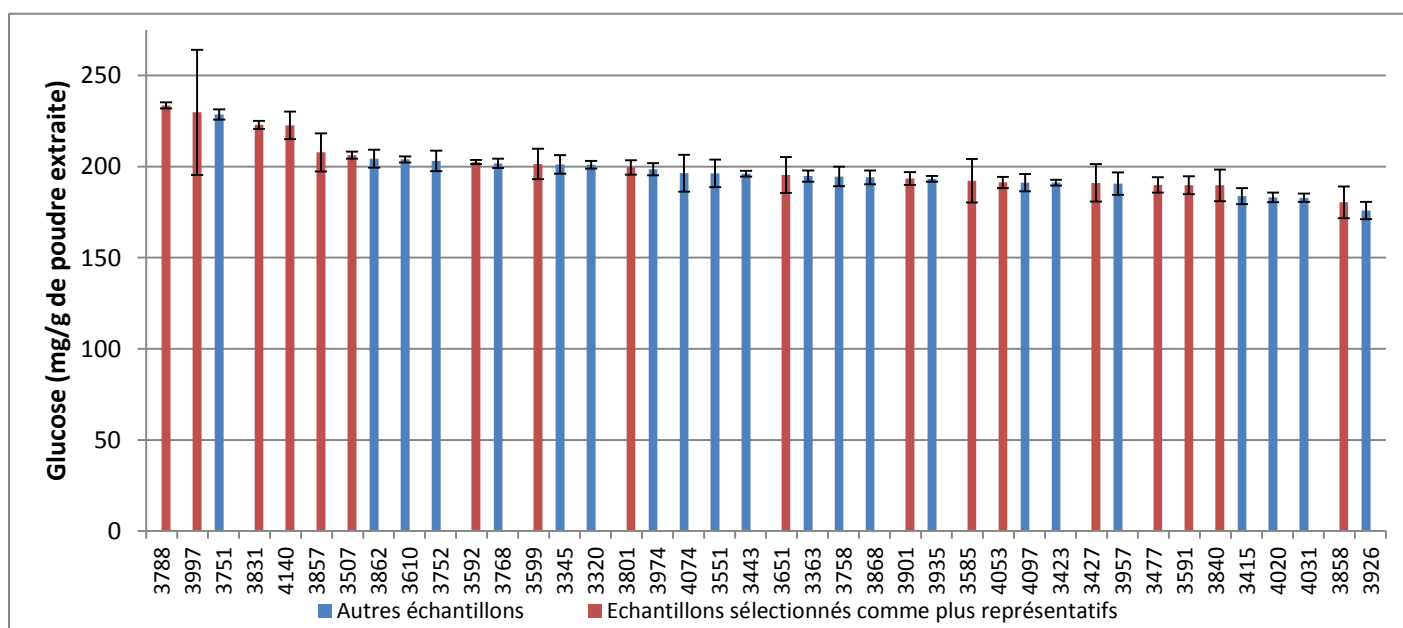


Figure 15 : Teneurs en glucose dans la poudre extraite déterminées par méthode biochimique à l'anthrone en condition acide et mise en évidence d'échantillons représentatifs de l'échantillonnage

Le dosage enzymatique du glucose par l'hexokinase et la G6PDH donne des résultats différents du dosage à l'anthrone, ce sont des échantillons différents (3788 et 3997) qui possèdent les concentrations en glucose les plus fortes avec respectivement 578 et 493 mg de glucose. L'échantillon 3858 présente également une concentration attendue avec l'une des moins des moins fortes pour 349 mg de glucose par g de matière sèche extraite (**figure 16**). Les échantillons présentent *a priori* des valeurs cohérentes par rapport au dosage précédent car les résidus jugés les plus ou les moins concentrés par la méthode à l'anthrone le sont aussi avec la méthode enzymatique.

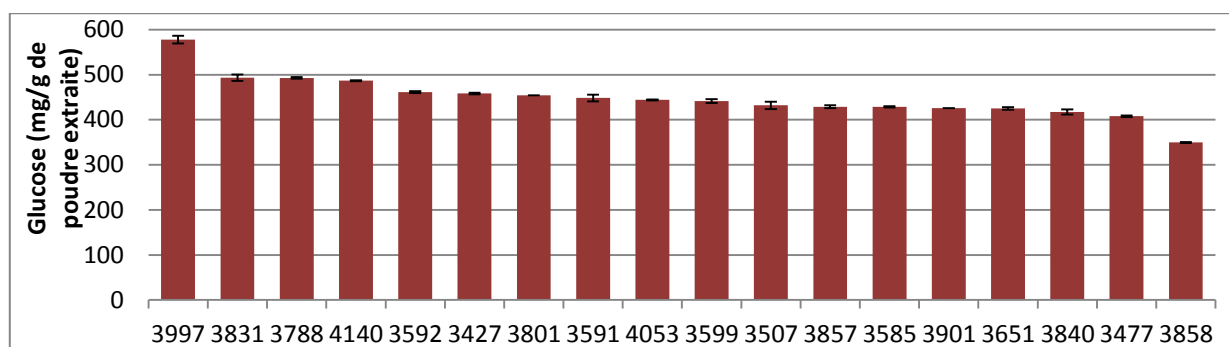


Figure 16 : Teneurs en glucose dans la matière sèche extraite déterminées par méthode enzymatique via HK et G6PDH sur les 18 échantillons les plus représentatifs

L'utilisation de la méthode enzymatique pour la détermination du glucose donne des résultats beaucoup plus importants qu'avec la méthode précédente, pour l'échantillon 3997, qui était l'un des échantillons les plus concentrés en glucose, la concentration mesurée est de 578 mg de glucose par g de matière sèche contre 229 mg avec la méthode à l'anthrone (**figure 17**). Il y a donc un facteur 2 entre les résultats des deux dosages qui pourraient être dû à l'ajustement du pH réalisé pour le dosage enzymatique ou alors de la méthode de détermination de la concentration en glucose qui est réalisé contre un gradient en glucose avec l'anthrone et par calcul pour le dosage enzymatique.

Un écart était attendu entre les deux valeurs de dosage, mais celui-ci est beaucoup plus important que prévu. Les résultats obtenus avec le dosage à l'anthrone semblent un peu faibles car ce réactif peut réagir aussi avec d'autres sucres comme le xylose issu de la dégradation de l'hémicellulose, ceux obtenus par voie enzymatique bien qu'un peu forts (plus de 50% de la poudre de bois analysée pour certains) semblent plus réalistes. La réalité pourrait se situer entre les deux selon les données de la littérature (Foster *et al.*, 2010).

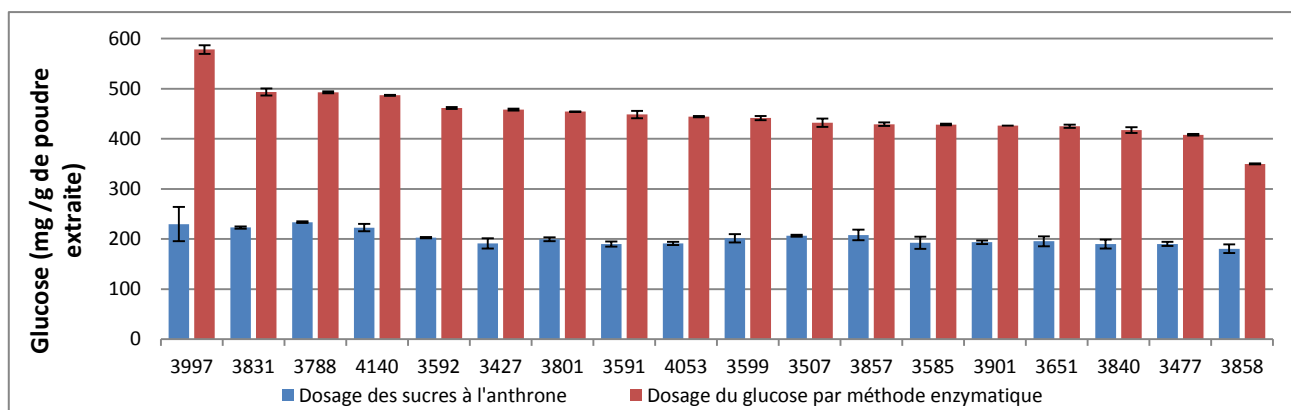


Figure 17 : Comparaison des résultats de deux méthodes de dosage pour les 18 individus jugés les plus représentatifs de l'échantillonnage étudié pour leur teneurs en glucose dans la poudre de bois extraite

La corrélation obtenue entre les résultats des différents dosages du glucose n'est pas optimal avec un coefficient de 0,70 (**figure 18**), de plus ces résultats ne sont pas corrélés avec les teneurs en alpha-cellulose déterminées dans la poudre extraite (résultats non présentés).

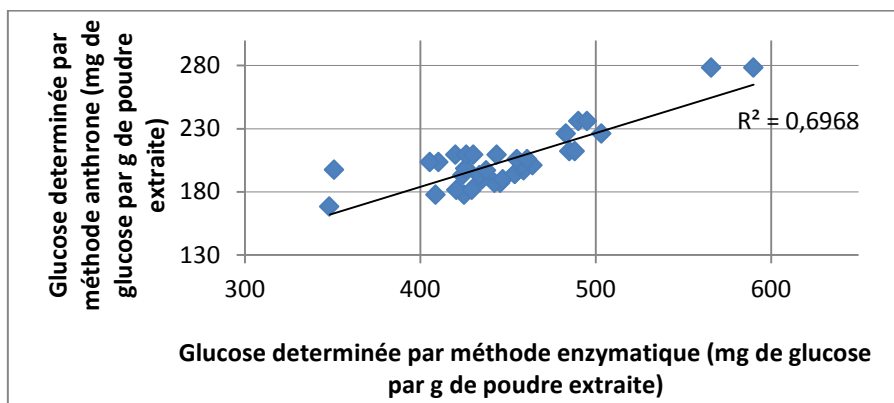


Figure 18 : Mise en relation des données de concentration en glucose obtenues suite au dosage enzymatique et au dosage par le réactif à l'anthrone

3. Réalisation de modèles de calibration par spectroscopie infrarouge

Après traitement mathématique et analyse statistique, seul trois combinaisons ont permis l'établissement de modèles de calibrations. Ces combinaisons sont présentées **figure 19** accompagnés des spectres bruts obtenus de 8000 à 4000 cm^{-1} .

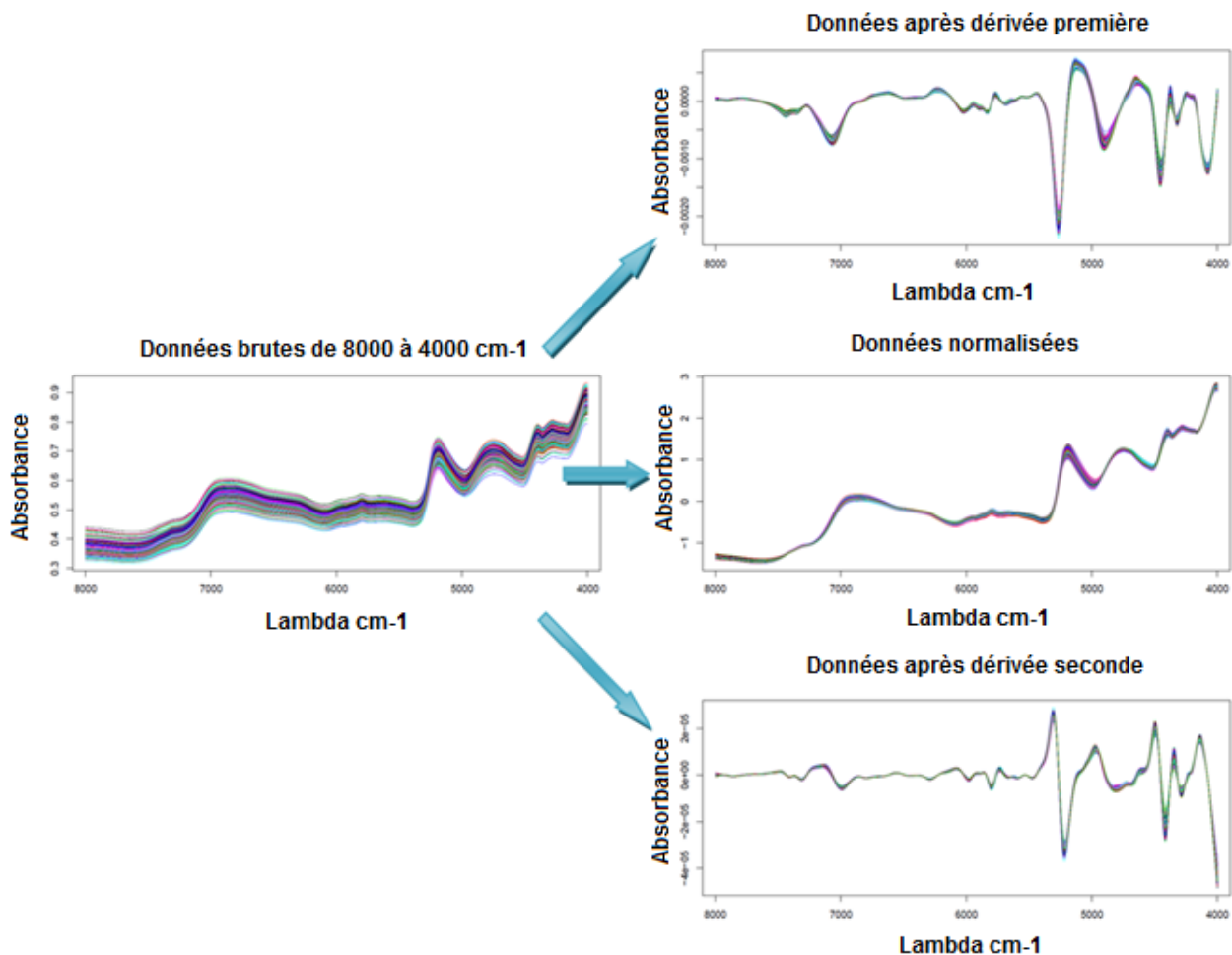


Figure 19 : Spectres SPIR enregistrés pour les 40 échantillons testés chimiquement, avant (données brutes) et après traitements statistiques (normalisation, dérivée première et dérivée seconde)

Les modèles ont été obtenus à partir de la dérivée première des spectres pour les dosages des lignines insolubles « Klason » et de l'holocellulose calculée (masse poudre moins les extractibles et les lignines totales), à partir de la dérivée seconde pour les dosages de l'alpha-cellulose, des composés extractibles et des lignines totales et uniquement à partir d'une normalisation pour le dosage de l'holocellulose dosée (**tableau 1**).

Tableau 1 : Caractéristiques des meilleurs modèles de calibration en SPIR obtenus

	Transformation	Nombre de composantes utilisées	R ² Calibration	R ² cv Monte Carlo Cross Validation	RMSEPcv Monte Carlo Cross Validation	RPDcv Monte Carlo Cross Validation	Nombre d'outliers	Pourcentage d'outliers	Nombre d'onde sélectionné
Composés extractibles	Dérivée seconde	4	0,9554	0,9215 (±0,0118)	0,8783 (±0,0654)	3,6479 (±0,2654)	3	7,5	300
Lignine soluble	pas de bon modèle								
Lignine Klason	Dérivée première	3	0,9072	0,8675 (±0,0166)	0,5788 (±0,0352)	2,8049 (±0,1626)	7	17,5	25
Lignines totales	Dérivée seconde	3	0,8916	0,8411 (±0,0210)	0,6968 (±0,0451)	2,5661 (±0,1601)	9	22,5	21
Holocellulose calculée	Dérivée première	4	0,8594	0,7208 (±0,0485)	1,0741 (±0,0916)	1,9467 (±0,1622)	11	27,5	326
Holocellulose dosée	normalisée	4	0,9125	0,8687 (±0,0166)	0,9789 (±0,0609)	2,8181 (±0,1704)	7	17,5	280
Alpha-cellulose	Dérivée seconde	4	0,9015	0,8281 (±0,0251)	0,5707 (±0,0410)	2,4718 (±0,1727)	10	25	12

4. Corrélations des résultats chimiques avec les spectres infrarouges : construction de modèles de calibration

4.1 Modèles pour les lignines totales sur les 24 premiers individus de calibration

Les dosages des lignines effectués sur les 24 premiers individus ont permis d'obtenir le modèle de calibration présenté **figure 20**, celui-ci permet de distinguer que les teneurs en lignines totales des 24 échantillons testés ne sont pas très représentatives de l'ensemble de la population. En effet, les teneur en lignines dosées sont principalement localisés entre 22% et 26%.

Le modèle est obtenu avec le retrait de 4 « outliers » (valeurs aberrantes) ce qui permet d'améliorer le coefficient de régression du modèle qui est de $R^2 = 0,88$ en validation croisée.

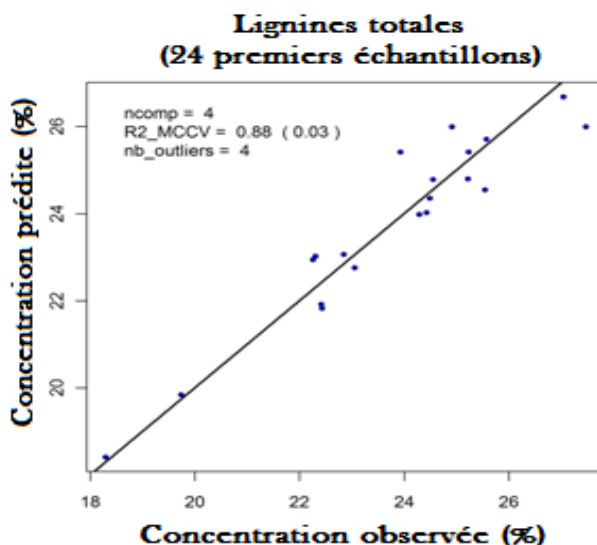


Figure 20 : Modèle de calibration obtenu après traitement statistique des résultats de dosage des teneurs en lignines totales des 24 premiers échantillons et de leurs spectres PIR

4.2 Modèles de calibrations avec les 40 échantillons sélectionnés

Modèles pour les composés extractibles

L'évaluation de la teneur en composés extractibles sur l'ensemble de l'échantillonnage a permis de mettre en place le modèle de calibration présenté **figure 21**. Ce modèle possède un coefficient de régression $R^2=0,92$ en validation croisée et a été obtenu avec le retrait de 3 « *outliers* » ; ce qui en fait un bon modèle avec une assez bonne répartition des échantillons le long de la droite de calibration. Quatre composantes ont été utilisées pour la réalisation de ce modèle de régression.

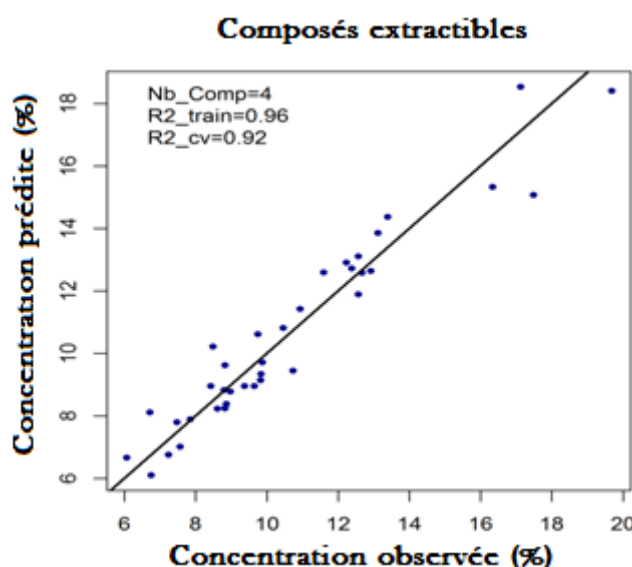


Figure 21 : Modèle de calibration obtenu après traitement statistique des résultats de dosage des teneurs en composés extractibles des échantillons et des spectre PIR

Modèles pour les lignines

Les dosages des lignines « Klason » ainsi que le calcul de la quantité de lignines totales (Klason et soluble) dans chaque échantillon ont permis l'établissement de modèles de calibration, à contrario, à partir des données de lignines solubles il n'a pas été possible de construire un modèle satisfaisant car le meilleur coefficient de régression obtenu a été de $R^2=0,5824$ en appliquant 2 composantes et en écartant 20% d'outliers, ce qui est insuffisant.

Les deux modèles qui ont pu être réalisés pour les lignines Klason et lignines totales, l'ont été avec l'utilisation de 3 composantes et les coefficients de régression obtenus pour les lignines Klason (avec 7 *outliers*) et les lignines totales (avec 9 *outliers*) sont respectivement de $R^2 = 0,87$ et $R^2 = 0,84$ (**figure 22**). Nous pouvons considérer que ces modèles sont encore de qualité moyenne et devront être améliorés en incluant de nouveaux échantillons dans l'échantillonnage de calibration.

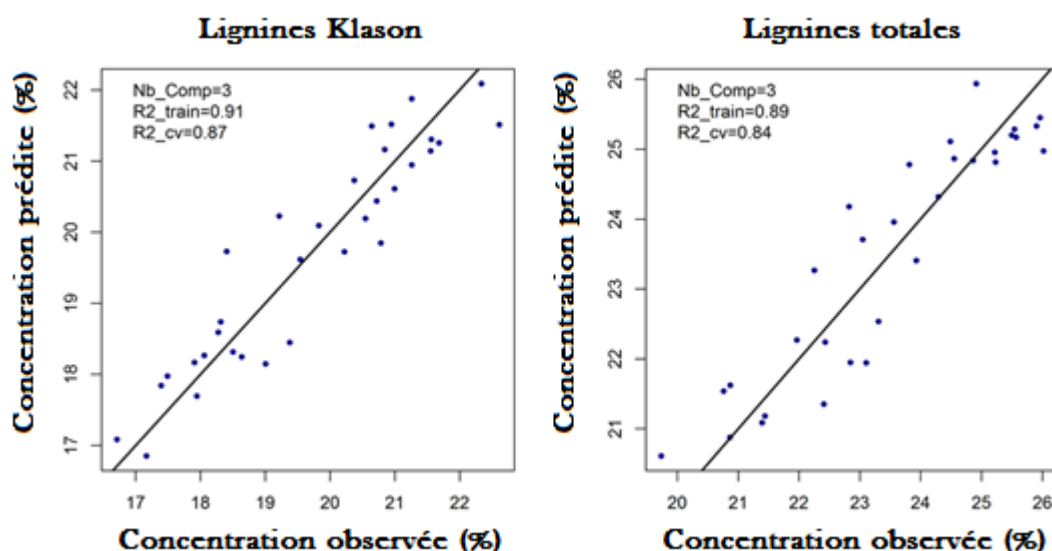


Figure 22 : Modèles de calibration obtenus après traitement statistique des résultats de dosage des teneurs en lignines des échantillons et des spectre PIR

Modèles pour la cellulose

Les dosages de l'alpha-cellulose, de l'holocellulose ainsi que le calcul de la quantité d'holocellulose à partir de la soustraction de la teneur en lignines sur la poudre sèche extraite de chaque échantillons ont permis l'établissement de modèles de calibration,

Les modèles ont été réalisés avec l'utilisation de 4 composantes, les coefficients de régression obtenus pour l'alpha-cellulose dosée (avec 10 *outliers*), l'holocellulose dosée (avec 7 *outliers*) et l'holocellulose calculée (avec 11 *outliers*) sont respectivement de $R^2 = 0,8281$, $R^2 = 0,8687$ et $R^2 = 0,7208$ (**figure 23**).

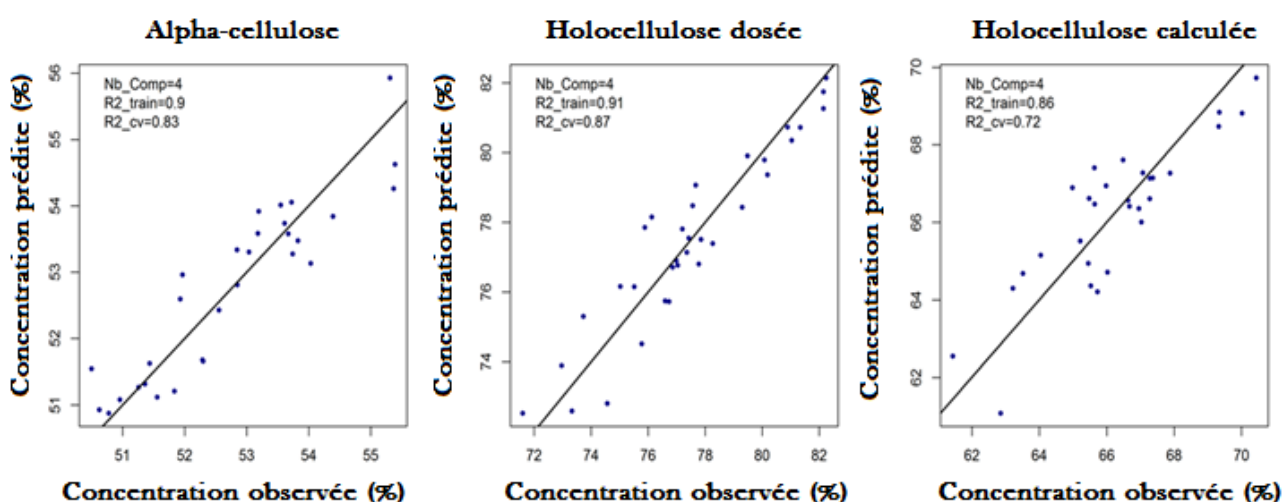


Figure 23 : Modèles de calibration obtenus après traitement statistique des résultats de dosage des teneurs en cellulose des échantillons et des spectre PIR

DISCUSSION ET CONCLUSION

Pour l'industrie de la transformation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol, la connaissance précise de la composition chimique du bois jouera un rôle important pour son utilisation dans les procédés industriels utilisés ou en cours d'élaboration (Ragauskas *et al.*, 2006) comme dans le projet de recherche et développement *FUTUROL*.

Dans cette optique, la qualité de la biomasse lignocellulosique devient un critère à prendre en compte à part entière dans les programmes d'amélioration génétique pour le peuplier surtout dans une politique de mise en place de types de culture dédiée à la production de biomasse (TCR, TTCR).

L'évaluation des caractères qui composent la qualité de la biomasse nécessitent comme pour tout programme de génétique, l'étude de leur variation sur un très grand nombre d'individus. Pour cela, les méthodes classiques de la chimie et de la biochimie pour l'analyse des constituants structuraux du bois (cellulose et lignines) ne sont plus adaptées pour l'analyse d'échantillonnages de grandes tailles, étant trop lourdes à mettre en œuvre, longues et coûteuses.

La technique de phénotypage indirecte à haut débit par Spectrométrie Proche Infra Rouge (SPIR) associée au développement des méthodes statistiques de chimiométrie représente une alternative très intéressante et maintenant couramment utilisée dans les laboratoires (Tsuchikawa, 2007).

Pour le peuplier noir, cette méthodologie a déjà été mise en œuvre sur une population particulière avec une variabilité génétique restreinte (pedigree, famille de plein frères) au sein du laboratoire GénoBois de l'Unité AGPF de l'INRA Orléans. Elle a permis d'analyser la variabilité génétique pour les propriétés chimiques et technologiques du bois de peuplier noir en vue de sa conversion en bioéthanol et d'identifier des régions génomiques qui contrôlent la variabilité de ces caractères (QTL) (El Malki, 2013; El Malki *et al.*, soumise).

Concernant nos analyses des constituants chimiques du bois de peuplier noir qui ont servi de données de référence pour bâtir nos modèles de calibration, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par nous-même sur une autre population (El Malki *et al.*, soumise) ou par un autre laboratoire (Guerra *et al.*, 2013)

Les résultats obtenus au cours de cette étude sur une autre population de peuplier noir, avec une génétique plus large, confirme de nouveau qu'il est possible de prédire les quantités des constituants chimiques structuraux contenus dans la biomasse lignocellulosique de peuplier noir à l'aide de la SPIR. L'amélioration des prises de spectres, de la préparation et du conditionnement des échantillons, de la précision des méthodes d'analyses de référence pour les constituants chimiques qui ont été mises en place au laboratoire, a permis d'améliorer les modèles de prédiction précédemment obtenus pour le peuplier noir. La validation des modèles de prédiction a été effectuée à la fois par une validation croisée par la méthode de

Monte Carlo et aussi complémentée par l'analyse d'échantillons complémentaires à l'aide des méthodes de référence.

Avec 3 à 4 variables latentes en PLS (composantes du modèle de régression) et des R^2_{cv} qui varient entre 0,72 et 0,92, nos modèles de calibration sont de qualité comparable à celle des modèles présentés dans la littérature (Sheng *et al.*, 2011; Yeh *et al.*, 2005). Les modèles à meilleur pouvoir de prédiction concernent dans l'ordre les teneurs en extractibles, en lignines Klason et en holocellulose puis en alpha-cellulose.

Ces modèles de prédiction pour le phénotypage indirect à haut débit par SPIR établis lors de notre étude sont suffisamment robustes pour mener une détection de QTL pour cette population et va permettre aux généticiens de cribler un nombre important de génotypes pour en sélectionner les plus intéressants.

Nos méthodes de dosage du glucose après hydrolyse de la matière ne sont pas encore assez performantes et fiables pour permettre de construire des modèles de calibration. Les résultats obtenus sont très divergents entre les méthodes utilisées et bien que présentant une certaine corrélation entre eux, ils ne sont pas corrélés avec la quantité de cellulose, dont est issu le glucose, contenue dans la matière analysée. Il faudra certainement améliorer ces méthodes de dosage pour pouvoir construire des modèles robuste et utilisables ou bien même utiliser une méthode chromatographique (HPLC avec détecteur spécifique) pour analyser spécifiquement et individuellement les différents sucres issus de la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose.

Ces mêmes échantillons seront prochainement analysés pour déterminer leur potentiel glucose après saccharification avec un complexe enzymatique issu de champignons (collaboration avec une unité de Marseille) à l'aide d'un autre dosage chimique au DNSA et en chromatographie liquide ionique (système *DIONEX*, Sunnyvale, California). Ces nouveaux dosages pourront vérifier ou invalider nos propres dosages de glucose (Navarro *et al.*, 2010).

ANNEXES

ANNEXE I : Dosage du glucose par méthode enzymatique par un mélange HK-G6PDH

1. Compositions des réactifs utilisés pour le dosage du glucose par méthode enzymatique

► Tampon réactionnel

250 µL de tampon triéthanolamine

50 µl de NADP

50 µL d'ATP

420 µL d'eau ultra-pure

- NADP $6,4.10^{-3}$ M

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

- ATP $41,3.10^{-3}$ M

300 mg ATP

300 mg NaHCO₃ (bicarbonate de sodium)

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

- Tampon triéthanolamine

14 g triéthanolamine

250 mg MgSO₄, 7H₂O

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

Dissolution dans l'eau ultra-pure qsp 100 mL

► HK-G6PDH

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

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

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

2. Calcul des concentrations en glucose dans la poudre de bois de peuplier extraite

$$\Delta A_{\text{glucose}} = A_2 - A_1$$

$$C(\text{mg/mL}) = \frac{V \times PM \times \Delta A}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \quad C\left(\frac{\text{mg de glucose}}{\text{g de poudre}}\right) = \frac{C(\text{mg/mL}) \times V_{\text{dil}} \times V_{\text{hyd}}}{V_r \times MS}$$

V : Volume réactionnel (µL)

PM : Masse moléculaire (180,16 g/mol → glucose)

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

Vdil : Volume dilué pour le réajustement du pH (mL)

d : Trajet optique soit 1 cm

v : volume d'extrait utilisé pour le dosage (µL)

Vr : Volume de reprise du résidu sec (mL)

MS : Masse de matière sèche utilisée (mg)

ANNEXE II : Résultats des dosages chimiques réalisés sur les clones de *Populus nigra*

N° SPIR	Echantillon	N°	Taux de composés extractibles (%)	Taux de lignines totales (%)	Taux d'holocellulose (%)	Taux de lignines soluble (%)	Taux de lignines klason (%)	Taux d'α-cellulose (%)	Taux d'hémicellulose calculé (%)
3363	OLO-01-47-40-5	1	9,37	23,56	75,77	3,73	19,83	40,30	35,47
3415	BSL-37-29-34-3	2	10,73	24,29	77,03	3,74	20,55	41,45	35,57
3423	GLY-03-10-67-2	3	12,91	23,05	80,07	3,51	19,54	44,29	35,78
3427	GLY-09-32-27-3	4	19,68	17,11	78,26	3,54	13,58	39,62	38,64
3443	GLY-28-52-83-5	5	9,83	25,23	77,62	4,24	20,99	40,58	37,04
3477	SPM-41-16-82-2	6	12,23	22,30	79,48	3,89	18,41	40,50	38,98
3507	VDL-34-35-62-3	7	11,60	22,43	82,14	4,15	18,28	42,19	39,96
3585	NOH-37-55-78-5	8	8,85	29,19	76,99	4,38	24,81	39,44	37,55
3599	Poli-23-47-3	9	10,93	19,74	82,14	3,02	16,71	44,08	38,06
3751	RHN-22-46-77-5	10	8,82	25,54	74,48	3,98	21,56	38,73	35,75
3752	RHN-26-13-87-2	11	10,45	25,22	75,51	3,67	21,55	38,93	36,58
3758	RHN-28-12-78-2	12	15,56	18,72	76,73	3,60	15,13	38,96	37,77
3788	RHN-41-23-59-3	13	8,97	19,82	82,24	3,57	16,25	44,04	38,20
3831	N-2-5-91-2	14	9,87	22,25	77,67	3,94	18,32	38,87	38,80
3840	N-28-16-99-2	15	8,48	22,84	74,56	3,63	19,21	38,35	36,21
3858	N-38-3-87-2	16	12,67	24,49	78,06	3,84	20,64	40,46	37,60
3862	N-39-24-54-3	17	6,06	23,93	81,03	3,71	20,22	43,28	37,74
3868	N-45-29-80-3	18	8,42	24,55	71,34	3,83	20,72	38,38	32,97
3901	N-66-7-65-2	19	8,79	25,57	73,32	4,31	21,26	38,75	34,57
3926	ALL-10-45-57-5	20	9,64	24,91	72,96	3,65	21,26	37,89	35,07
3997	ALL-149-37-44-3	21	12,56	26,13	79,25	5,34	20,78	40,62	38,63
4020	ALL-168-46-80-5	22	8,61	27,47	75,02	3,99	23,48	39,65	35,37
4074	ALL-25-52-65-5	23	17,49	22,84	77,55	4,20	18,64	39,75	37,81
4140	ALL-98-56-59-5	24	12,38	22,41	79,30	4,35	18,06	43,85	35,45
3320	BDX-09-39-23-3	25	8,82	23,81	82,78	3,44	20,37	41,88	40,90
3345	SSN-11-33-60-3	26	12,57	20,76	77,20	3,37	17,39	42,76	34,44
3551	NOH-19-30-74-3	27	7,56	25,96	77,77	3,35	22,61	41,36	36,42
3591	NOH-40-55-81-5	28	7,47	25,90	76,85	4,22	21,68	40,76	36,09
3592	NOH-41-16-71-2	29	7,24	25,49	81,27	4,55	20,95	44,20	37,07
3610	DIV-3-5-95-2	30	6,74	22,83	80,89	3,81	19,02	41,88	39,00
3651	1-J29-24-45-3	31	9,81	20,87	81,33	3,38	17,49	43,69	37,64
3768	RHN-34-31-76-3	32	6,71	26,02	80,18	3,69	22,33	42,14	38,04
3801	STR-13-21-77-2	33	9,75	23,30	77,85	3,93	19,38	43,10	34,74
3857	N-36-52-64-5	34	6,30	24,86	77,42	4,01	20,85	40,48	36,94
3935	ALL-107-8-107-2	35	12,51	21,96	77,36	3,46	18,50	41,61	35,75
3957	ALL-12-48-37-5	36	16,33	21,40	73,72	3,45	17,95	39,87	33,85
3974	ALL-130-31-81-3	37	13,12	20,87	76,13	3,70	17,17	41,13	34,99
4031	ALL-180-32-22-3	38	17,13	21,44	71,60	3,54	17,91	39,85	31,75
4053	ALL-200-56-63-5	39	7,85	22,27	75,88	3,89	18,38	40,68	35,20
4097	ALL-39-47-88-5	40	13,39	23,10	76,60	4,10	19,01	38,68	37,92

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Antoni, D., Zverlov, V.V., et Schwarz, W.H. (2007). Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 23–35.
- Berthelot, A., et Chantre, G. (2004). La peupleraie française : un maillon essentiel de la filière bois : Le peuplier à l'ère génomique. *Biofutur* 247, 20–23.
- Bertrand, D., et Dufour, É. (2000). *La Spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques* (Editions Tec & Doc Lavoisier).
- Chen, F., et Dixon, R.A. (2007). Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat Biotech* 25, 759–761.
- El Malki, R. (2013). Architecture génétique des caractères cibles pour la culture du peuplier en taillis à courte rotation. Thèse de doctorat de l'Université d'Orléans.
- El Malki, R., Charpentier, J.-P., Jorge, V., Ader, K., Navarro, D., Berrin, J.-G., Bastien, J.-C., Bastien, C., et Segura, V. (soumise). QTL mapping for wood chemical properties and saccharification potential in black poplar (*Populus nigra*). *soumise à Biotechnology for Biofuels*.
- Foster, C.E., Martin, T.M., et Pauly, M. (2010). Comprehensive Compositional Analysis of Plant Cell Walls (Lignocellulosic biomass) Part II: Carbohydrates. *Journal of Visualized Experiments* 37, <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1837>, doi: 10.3791/1837.
- Gomez, L., Jordan, M.-O., Adamowicz, S., Leiser, H., et Pagès, L. (2003). Du prélèvement au dosage : réflexions sur les problèmes posés par la mesure des glucides non structuraux chez les végétaux ligneux. *Cahiers d'Etudes et de Recherches Francophones Agricultures* 12, 369–386.
- Guerra, F.P., Wegrzyn, J.L., Sykes, R., Davis, M.F., Stanton, B.J., et Neale, D.B. (2013). Association genetics of chemical wood properties in black poplar (*Populus nigra*). *New Phytol.* 197, 162–176.
- Gusakov, A.V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology* 29, 419–425.
- Hruschka, W.R. (1987). Data analysis: wavelength selection methods. In Williams P. C., Norris K. H., *Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries* 2, 35–55.
- Li, H., Liang, Y., Xu, Q., et Cao, D. (2009). Key wavelengths screening using competitive adaptive reweighted sampling method for multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta* 648, 77–84.
- Metropolis, N. (1985). Monte Carlo: In the Beginning and Some Great Expectations. *Monte-Carlo Methods and Applications in Neurotonics, Photonics and Statistical Physics* 240, 62–70.
- Metropolis, N., et Ulam, S. (1949). The Monte Carlo Method. *Journal of the American Statistical Association* 44, 335–341.
- Monclus, R., Dreyer, E., Delmotte, F.M., Villar, M., Delay, D., Boudouresque, E., Petit, J.-M., Marron, N., Bréchet, C., et Brignolas, F. (2005). Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* × *P. nigra* clones. *New Phytologist* 167, 53–62.

- Navarro, D., Couturier, M., da Silva, G.G.D., Berrin, J.-G., Rouau, X., Asther, M., et Bignon, C. (2010). Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. *Microb. Cell Fact.* 9, 58.
- Novaes, E., Osorio, L., Drost, D.R., Miles, B.L., Boaventura-Novaes, C.R.D., Benedict, C., Dervinis, C., Yu, Q., Sykes, R., Davis, M., *et al.* (2009). Quantitative genetic analysis of biomass and wood chemistry of *Populus* under different nitrogen levels. *New Phytologist* 182, 878–890.
- Rubin, E.M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841–845.
- Segura, V., Ader, K., El Malki, R., Murciano, V., et Charpentier, J.-P. (2013). A comparison of various infrared (IR) spectroscopy techniques for calibrating poplar wood. *proceeding colloque IC NIRS (La Grande Motte)*.
- Sheng, Y., Mian, X., Jiang, Y.-F., Wu, G.-F., et Pu, J.-W. (2011). Determination of Holocellulose and Alpha-cellulose Contents in triploid clones of *Populus tomentosa*. using NIRS. *Materials Science Forum* 675-77, 329–332.
- Studer, M.H., DeMartini, J.D., Davis, M.F., Sykes, R.W., Davison, B., Keller, M., Tuskan, G.A., et Wyman, C.E. (2011). Lignin content in natural *Populus* variants affects sugar release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6300–6305.
- Sykes, R., Kodrzycki, B., Tuskan, G., Foutz, K., et Davis, M. (2008). Within tree variability of lignin composition in *Populus*. *Wood Science and Technology* 42, 649–661.
- Tenenhaus, M. (1998). *La régression PLS: Théorie et pratique* (Editions TECHNIP).
- Updegraff, D.M. (1969). Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.* 32, 420–424.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., et Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol.* 153, 895–905.
- Yeh, T.-F., Yamada, T., Capanema, E., Chang, H.-M., Chiang, V., et Kadla, J.F. (2005). Rapid Screening of Wood Chemical Component Variations Using Transmittance Near-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3328–3332.
- Yemm, E.W., et Willis, A.J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J* 57, 508–514.
- Yin, T., Zhang, X., Gunter, L., Priya, R., Sykes, R., Davis, M., Wullschleger, S.D., et Tuskan, G.A. (2010). Differential Detection of Genetic Loci Underlying Stem and Root Lignin Content in *Populus*. *PLoS ONE* 5, e14021.

Résumé :

Le projet *FUTUROL* a pour objectif la commercialisation d'ici 2015 de procédés de production de biocarburants à partir de biomasse lignocellulosique de toutes origines. Pour ce projet de recherche, l'INRA d'Orléans s'intéresse à différentes espèces de bois dont le peuplier noir (*Populus nigra*) qui est capable de produire une quantité importante de biomasse. La biomasse est constituée de trois composants majeurs : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Leurs différences de structures conduisent à des réactivités chimiques différentes ce qui fait de la concentration relative de ces composés dans la biomasse un facteur primordial pour la mise en place de procédé de conversion en bioéthanol.

L'étude réalisée durant mon année d'apprentissage avait pour but de mettre en relation des analyses biochimiques sur le bois de peuplier noir pour évaluer ses constituants structuraux avec des mesures spectrales en proche infrarouge. Ceci afin d'établir des modèles de prédiction permettant le phénotypage à haut-débit de populations importantes de peuplier noir pour la sélection d'individus performants.

Les compositions en cellulose, en hémicellulose et en lignine ont été déterminées par des méthodes de dosages biochimiques sur une population de 40 individus sélectionnés à partir de populations avec des origines géographiques différentes. Ces mêmes individus ont subi une prise de spectres en proche infrarouge (SPIR) et ainsi de bons modèles de prédiction ont pu être obtenus permettant d'évaluer ces caractères de composition chimique du bois dans toute la population. Ces modèles peuvent encore être améliorés avec le dosage de nouveaux individus.

La quantité de glucose potentiellement récupérable à partir de la matière cellulosique a été déterminée par deux méthodes biochimiques distinctes à l'issue de l'extraction des lignines. Cependant les méthodes utilisées ne semblent pas totalement adaptées aux conditions dans lesquelles les échantillons sont traités et il serait préférable par la suite d'analyser individuellement les sucres libérés par HPLC pour permettre la construction de modèles de prédiction pour ce paramètre.

Mots-clefs : *Populus nigra*, bioéthanol, biomasse lignocellulosique, SPIR, modèles de calibration.

Abstract:

The *FUTUROL* project wants to market around 2015 processes for producing biofuels from all origin lignocellulosic biomass. For this research, Orléans' INRA is interested in different kinds of wood, whose black poplar (*Populus nigra*) able to produce biomass. Biomass is composed of three major components: cellulose, hemicellulose, and lignin. Their differences in chemical structures lead to different chemical reactivities, making the relative composition in cellulose, hemicelluloses and lignin in the biomass a crucial factor for process design.

The study processed during my apprenticeship aims to relate the levels of chemical components of black poplar wood with near infrared spectra. This is to make predictive models which allow doing high-throughput phenotyping on great populations of black poplar for the efficient individuals' selection.

The cellulose, hemicellulose, and lignin composition was determined by biochemical methods on a population of 40 selected individuals with different geographical origins. Near infrared spectra (NIRS) have been taken from these individuals, so efficient predictive models were obtained of sufficient quality to undertake wood chemical composition estimation on the entire population. These models also can be improved with individuals' new assay.

The potentially recoverable amount of glucose from cellulosic biomass was determined by two distinct biochemical methods after lignin assessment. However, used methods don't seem to be suitable to samples' treatment conditions and it will be better to analyzed individual sugars with a HPLC methodology to have good results.

Keywords: *Populus nigra*, biofuels, lignocellulosic biomass, NIRS, calibration models'.