

Caractérisation biochimique et phénotypage haut-débit de la collection nationale de robinier par spectrométrie proche infrarouge

BELMOKHTAR Nassim^{1,2}, TOUZET Orlane¹, BOIZOT Nathalie^{1,2}, BERNIER Frédéric³,
BRETON Christian¹

¹ UMR BioForA, INRAE, ONF, 45075 Orléans, France

² Plateforme Phenobois, INRAE, 45075 Orléans, France

³ UEFP, INRAE, 33610 Cestas, France

nassim.belmokhtar@inrae.fr

Mots clefs : dihydrorobinétine (DHR) ; robinétine (ROB) ; robinier ; SPIR ; HPLC ; calibration ; qualité du bois ; durabilité.

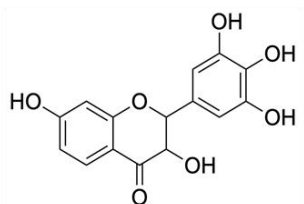
Contexte et objectifs

Le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia*) est une légumineuse originaire d'Amérique du Nord introduite en France au début du XVII^{ème} siècle par Jean Robin. A ce jour, elle est présente sur l'ensemble du territoire français et européen et représente de fait la deuxième espèce d'arbre plantée dans le monde après l'eucalyptus (Wang, Zhang et al. 2023). Au niveau français, elle représente environ 28 millions m³ de bois sur pied répartis sur environ 200000 hectares (IGN 2022). Considérée comme une espèce invasive, le robinier n'a suscité jusqu'à récemment que très peu d'intérêt. Il présente toutefois de grands intérêts du fait de sa croissance rapide et de l'excellente durabilité naturelle de son bois (classe 1 dans la norme EN350). A ce jour, le bois de robinier est essentiellement utilisé pour le chauffage, la fabrication de piquets et de meubles extérieurs en remplacement des bois tropicaux. Une démarche de sélection rigoureuse d'individus élites échantillonnés sur l'ensemble du territoire français et basée sur des critères de croissance (vigueur, rectitude du tronc et droit fil) a permis récemment de constituer une première collection nationale de robinier (CNR) incluant environ 300 arbres (Barbier, Merzeau et al. 2016).

Des travaux menés préalablement au sein de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence la production et l'accumulation de grandes quantités de molécules d'intérêt dans le bois de cœur du robinier. Il s'agit de la dihydrorobinétine (DHR, 35 à 40 % des extractibles) et de la robinétine (ROB, 5 à 10 % des extractibles) qui sont respectivement dotées de propriétés antimicrobiennes et de fluorescence (Fig. 1). Ces deux molécules suscitent actuellement de grands intérêts chez nos partenaires industriels que ce soit pour la production d'actifs antimicrobiens ou de pigments fluorescents (applications cosmétiques, sanitaires, phytosanitaires, Projet IR-VDL ValRob, 2012-2016) mais aussi pour une utilisation directe du bois sous la forme de paillages bio-actifs antimicrobien (projet IR-VDL WoodProActif, 2020-2024).

Les travaux que nous présentons ici entrent dans le cadre de ce dernier projet et ont pour objectif d'affiner la sélection phénotypique déjà réalisée sur les individus de la CNR en y ajoutant des critères de production de molécules d'intérêt (DHR et ROB). Notre étude a ainsi pour objectif de faire appel à la spectrométrie proche infrarouge pour développer des courbes de calibration capables de prédire les teneurs en DHR et en ROB pour l'ensemble des individus de la CNR. Cet outil de phénotypage indirect à haut-débit devrait nous permettre à terme de sélectionner les génotypes les plus producteurs de biomolécules pour la production industrielle d'extraits.

DHR



ROB

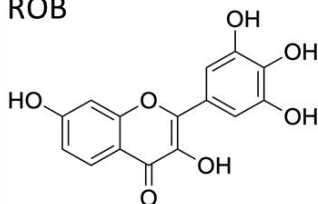


Fig. 1 : structures chimiques de la DHR et de la ROB
D'après (Bostyn et al. 2018).

Matériel et méthodes

Préparation de la biomasse lignocellulosique

Les 300 échantillons biologiques proviennent de la collection nationale de robinier située à l'Unité Expérimentale Forêt Pierroton (UEFP) d'INRAE à Cestas (sud-ouest de Bordeaux). Des rejets de souche de différents diamètres (quelques mm à plus de 30 mm) ont été collectés lors de la taille hivernale sur chaque individu. Après séchage à l'étuve (48 h – 40 °C), les stipules (épines) de chaque branche ont été éliminées. Ensuite, chaque branche référencée a été découpée au sécateur, finement broyée et stockée individuellement jusqu'à analyse au sein du site Orléanais de la plateforme Phénobois.

Acquisition de spectres proche infrarouge

Les spectres ont été acquis par réflexion diffuse sur la poudre de bois de chaque échantillon dans des tubes en verre déposés sur la sphère d'intégration de l'accessoire NIRA du spectromètre infrarouge Frontier (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Tous les spectres ont été pris entre 10000 et 4000 cm^{-1} (1000 et 2500 nm) avec un intervalle de 2 cm^{-1} . Chaque spectre résulte de la moyenne de 64 scans successifs.

Prétraitement des spectres

L'acquisition des spectres dans le proche infrarouge s'accompagne par la présence de bruits qu'il est nécessaire d'atténuer afin d'accéder à l'information en lien avec la présence des molécules d'intérêt dans l'échantillon. Sept prétraitements couramment utilisés en chimiométrie ont été appliqués à l'ensemble des spectres (Rinnan et al. 2009, Engel et al. 2013). Pour ce faire, nous avons fait appel à des fonctions mathématiques implémentés dans des bibliothèques disponibles dans R.

Dosages biochimiques

Le développement des modèles de prédiction passe par l'utilisation d'un jeu d'étalonnage constitué de 120 échantillons présentant un diamètre supérieur à 10 mm, sélectionnés aléatoirement parmi la collection nationale de robinier. Leurs teneurs en DHR et en RB ont été déterminées par une chaîne de chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) VWR-HITACHI® Chromaster couplée à un détecteur DAD. La colonne utilisée est une

LiChrospher® RP-18 EC 250/4.6 5µm 100 Å MERCK à 40 °C. Le gradient de phases mobiles est le suivant : eau ultrapure et méthanol/Acétonitrile 50/50 avec un débit de mL/min. Les données ont été acquises et traitées avec le logiciel OpenLAB CDS version EZChrom.

Développement de modèles prédictifs

Nous avons fait appel à une méthode de régression des moindres carrés partiels (PLS-R) (Wold et al. 2001) afin de relier les données spectrales aux teneurs en DHR et en ROB mesurées au laboratoire.

Nous mettons plus précisément en œuvre une méthode de validation croisée répétée 50 fois sur des segments provenant de la subdivision du jeu de calibration en 4 blocs aléatoires dans le but d'identifier le meilleur modèle en termes de prétraitement et de variables latentes (Anderssen et al. 2006). Ce dernier est enfin appliqué aux autres individus de la collection afin de les caractériser dans leur totalité. L'algorithme pls utilisé est fourni par la librairie rchemo disponible dans (Lesnoff 2021).

Résultats

Teneurs en DHR et ROB

Les dosages biochimiques ont mis en évidence des teneurs en DHR comprises entre 0,03 et 3,37 mg/g de matière sèche, supérieures à celles de la ROB comprises entre 0,16 et 0,66 mg/g de matière sèche (fig. 2).

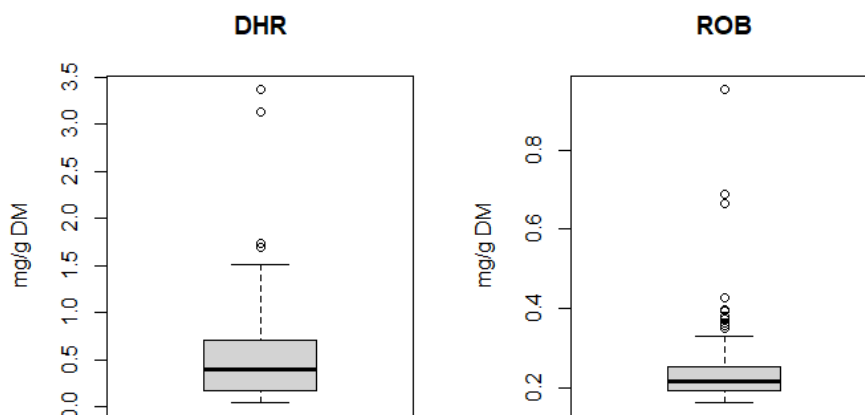


Fig. 2 : teneurs en DHR et en ROB déterminées par dosage HPLC.

Prétraitement des spectres

Les prétraitements que nous avons appliqués ont permis de réduire considérablement le bruit présent dans les spectres bruts (Fig. 3A). Il en résulte une information plus précise sur les bandes spectrales où réside le plus de variabilité (5500 à 4000 cm⁻¹) entre individus (Fig. 3B).

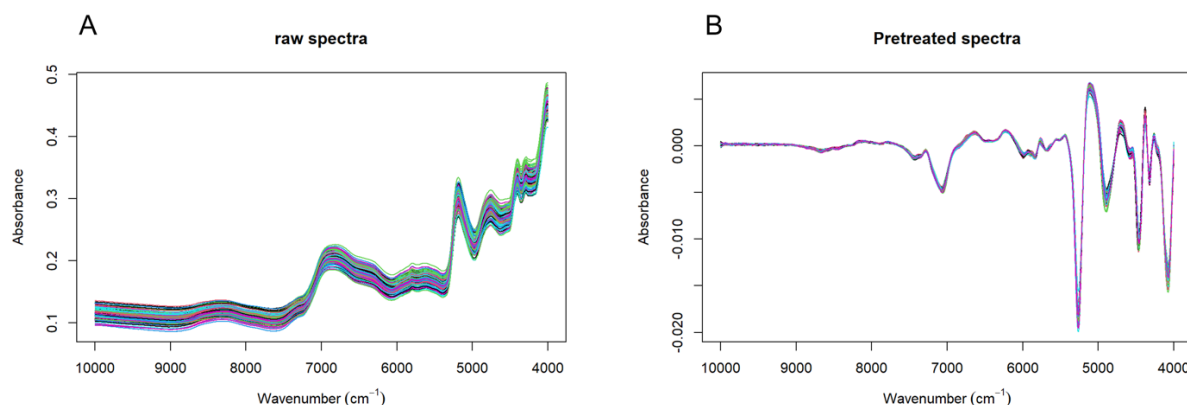


Fig. 3 : représentation graphique des spectres proche infrarouge de robinier avant (A) et après prétraitement(B).

Courbe de calibration

La validation croisée répétée, réalisée sur le jeu de calibration constitué de 120 individus, nous a permis d'identifier le meilleur prétraitement qui consiste à normaliser puis lisser par dérivée première de Savitzky & Golay les spectres proche infrarouge pour obtenir la plus faible erreur quadratique moyenne (RMSE), et ce avec 11 variables latentes calculées par la pls (Savitzky and Golay 1964).

Pour la DHR, l'application du modèle PLSR retenu sur le jeu de calibration indique un modèle atteignant un coefficient de détermination $R^2 = 0,80$ alors que l'erreur de prédiction mesurée sur ce jeu de calibration est de 0,237 (Fig. 4). Le modèle de prédiction de la teneur en ROB est en cours de développement.

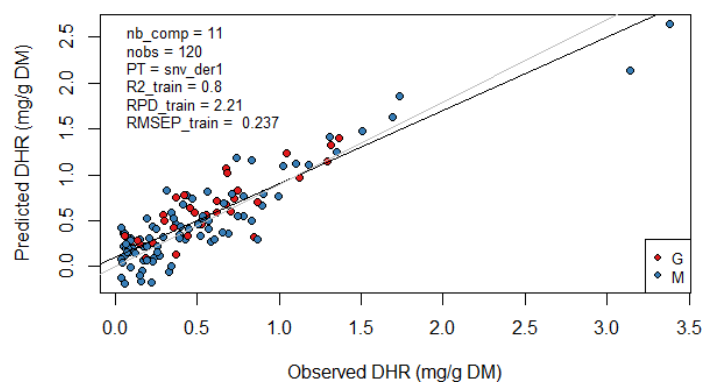


Fig. 4 : Courbe de calibration de la teneur DHR

Conclusions et perspectives

Ces premiers résultats de prédiction de la teneur DHR à partir de 120 individus sélectionnés parmi les 300 clones de la collection nationale de robinier ouvre la voie à un déploiement de la spectrométrie proche infrarouge comme outil de phénotypage haut débit de l'ensemble des géotypes de robinier présentant potentiellement un intérêt pour la recherche ou l'industrie.

Nous poursuivons actuellement nos travaux pour prédire les teneurs en robinétine qui suscite également l'intérêt de l'industrie cosmétique. A terme, il nous semble toutefois intéressant de compléter les modèles actuels (obtenus à partir de rejets de souche) par l'analyse d'échantillons de bois (tronc) qui pourront être obtenus lors du renouvellement de la CNR prévu en 2024.

Remerciements

Nous remercions la région Centre Val de Loire qui a financé ces travaux dans le cadre du projet WoodProActif (convention régionale N° 2020-00138879).

Références

- Anderssen E., Dyrstad K., Westad F., Martens H. (2006) Reducing over-optimism in variable selection by cross-model validation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 84(1): 69-74.
- Barbier C., Merzeau D., Pastuszka P., Charpentier J.-P. (2016) Une première collection nationale de robiniers. *Forêt Entreprise* (226):10-19.
- Bostyn S., Destandau E., Charpentier J.-P., Serrano V., Seigneuret J.-M., Breton C. (2018) Optimization and kinetic modelling of robinetin and dihydrorobinetin extraction from *Robinia pseudoacacia* wood. *Industrial Crops and Products* 126: 22-30.
- Engel J., Gerretzen J., Szymańska E., Jansen J.J., Downey G., Blanchet L., Buydens L.M.C. (2013) Breaking with trends in pre-processing? *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 50: 96-106.
- IGN I.N.d.I.I.G.e.F. (2022) Chiffres nationaux pour le robinier Faux acacia. from <https://inventaire-forestier.ign.fr/?article1035>.
- Lesnoff M. (2021) R Package Rchemo: Dimension Reduction, Regression and Discrimination for Chemometrics. <https://github.com/mlesnoff/rchemo>.
- Rinnan Å., v. d. Berg F., Engelsen S.B. (2009) Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(10): 1201-1222.
- Savitzky A., Golay M.J. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry* 36(8): 1627-1639.
- Wang Z., Zhang X., Lei W., Zhu H., Wu S., Liu B., Ru D. (2023) Chromosome-level genome assembly and population genomics of *Robinia pseudoacacia* reveal the genetic basis for its wide cultivation. *Communications Biology* 6(1):797.
- Wold S., Sjöström M., Eriksson L. (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58(2): 109-130.