Plateforme Phénobois

Utilisation de la spectrométrie proche infrarouge *in situ* pour la discrimination de frênes résistants et sensibles à la chalarose

Nathalie Boizot

Nassim Belmokhtar

https://www6.inrae.fr/phenobois

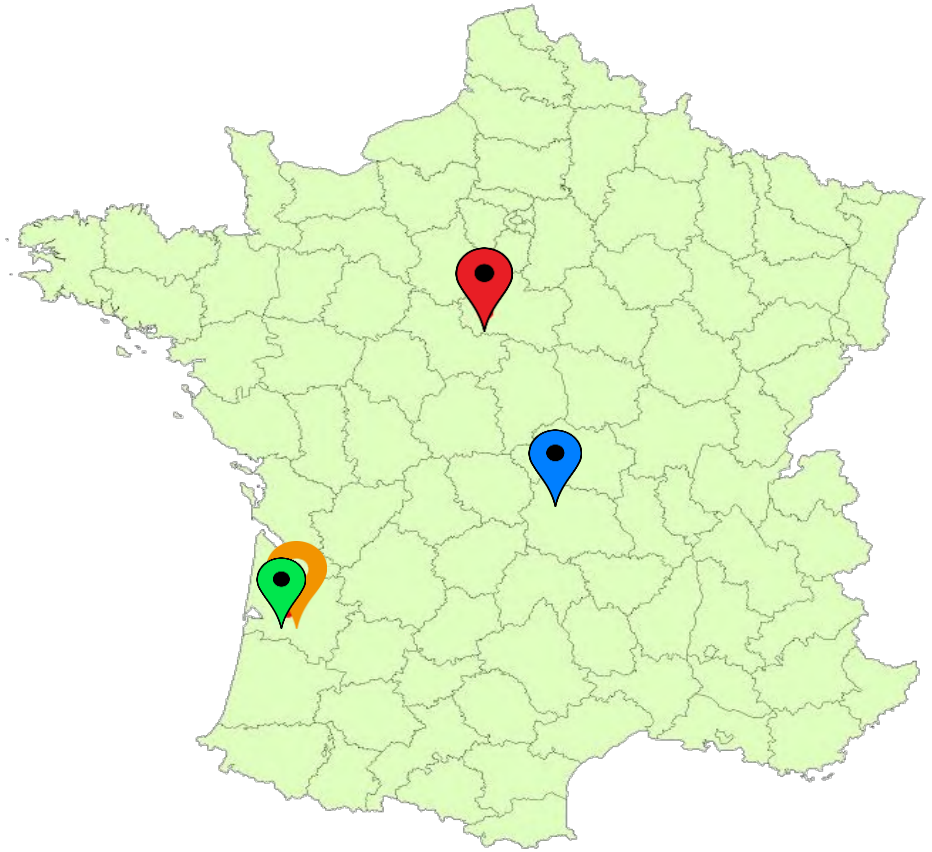
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

INRAE

PHENOBOIS

Présentation générale de Phénobois – Nathalie Boizot

- ✓ **Plateforme de phénotypage des propriétés physico-chimiques du bois et hydrauliques des arbres, créée en 2008**
- ✓ **14 agents permanents (8,47 ETP)**
- ✓ **3 UMR de rattachement**
  - BIOFORA – Orléans
  - BIOGECO – Bordeaux
  - PIAF - Clermont
- ✓ **4 sites**
  - INRAE Orléans
  - INRAE Clermont-Crouël
  - INRAE Bordeaux-Cestas
  - Université Bordeaux 1 –Talence
- ✓ **Labellisations**
  - 2008 et 2013 : Outil collectif CNOC
  - 2018 : Infrastructure Scientifique Collective INRAE
  - 2019 : Plateforme de l'Université de Bordeaux
- ✓ **Compétences au service de l'IR In-Sylva France**

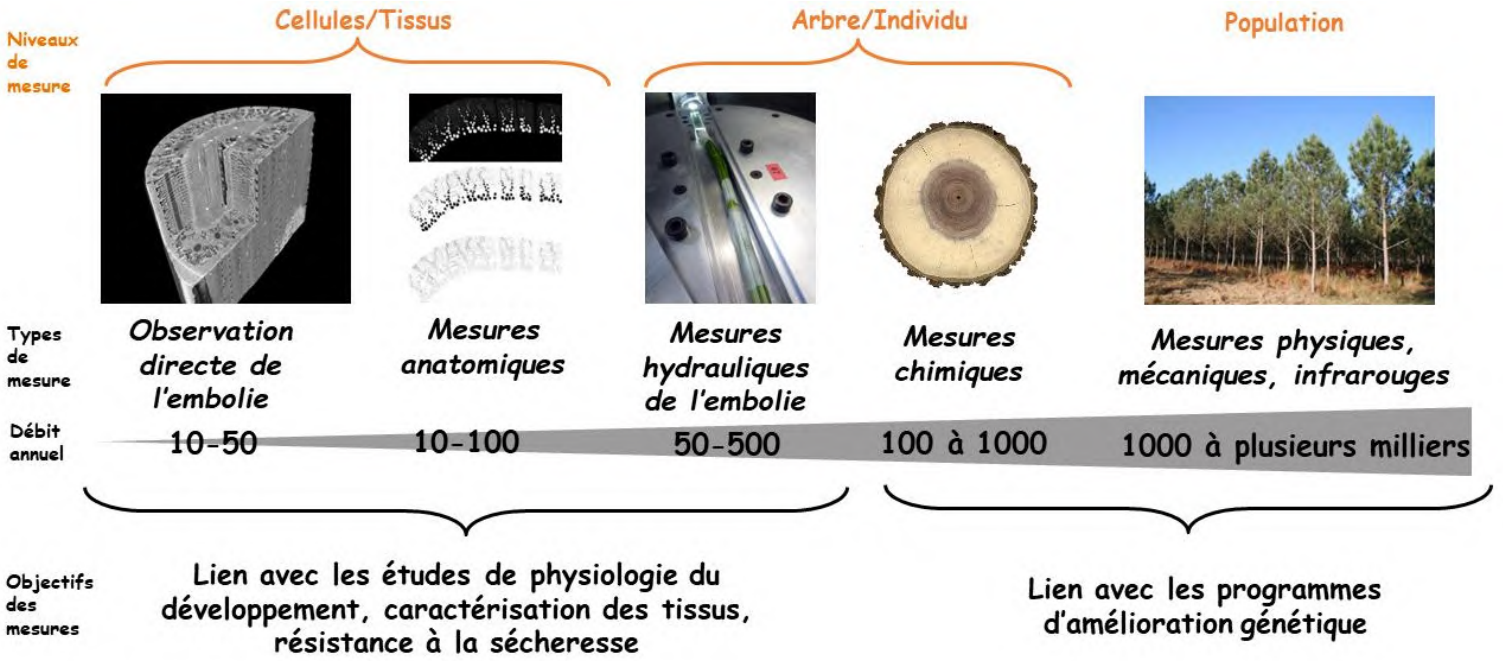


Caractéristiques des mesures phénotypiques proposées par Phénobois

- Diversité de **mesures d'évaluation directe ou indirecte des paramètres phénotypiques du bois** pour
  - caractériser le bois et comprendre les processus d'élaboration de ce tissu
  - étudier l'adaptation et la réponse des arbres au stress hydrique
  - identifier les ressources génétiques forestières capables de s'adapter aux climats changeants de demain tout en produisant du bois de qualité et en quantité

- **Approche multi-échelle** : de cellule jusqu'à la caractérisation du bois des arbres issus de populations naturelles ou des programmes d'amélioration génétique

- Selon les technologies, **capacités d'analyses à haut débit** => plusieurs milliers d'échantillons par an



Broyage à haut débit

- Broyages simultanés dans 24 pots 50 mL en polyacétal ou inox avec bille ∅ 32mm
- 2-3 g de matière / pot
- Granulométrie <75 µm
- Echauffement réduit de la poudre (<41°C)
- Jusqu'à 120 échantillons/jour
- Adapté à tout type de matériel : bois, feuilles, graines, …

ssim BEL

NOV'Ae
ingénierie & savoir-faire innovants

Accueil • Les articles parus • Les N° réguliers • 2019 • Cahier N°98 • Art2-ct98 (2019)

Broyage en série de matériel végétal (0.5-5 gr) pour analyses chimiques, physiologiques et génétiques à l'aide d'un agitateur de peinture

Broyage en série de matériel végétal (0.5-5 gr) pour analyses chimiques, physiologiques et génétiques à l'aide d'un agitateur de peinture

Auteur(s)

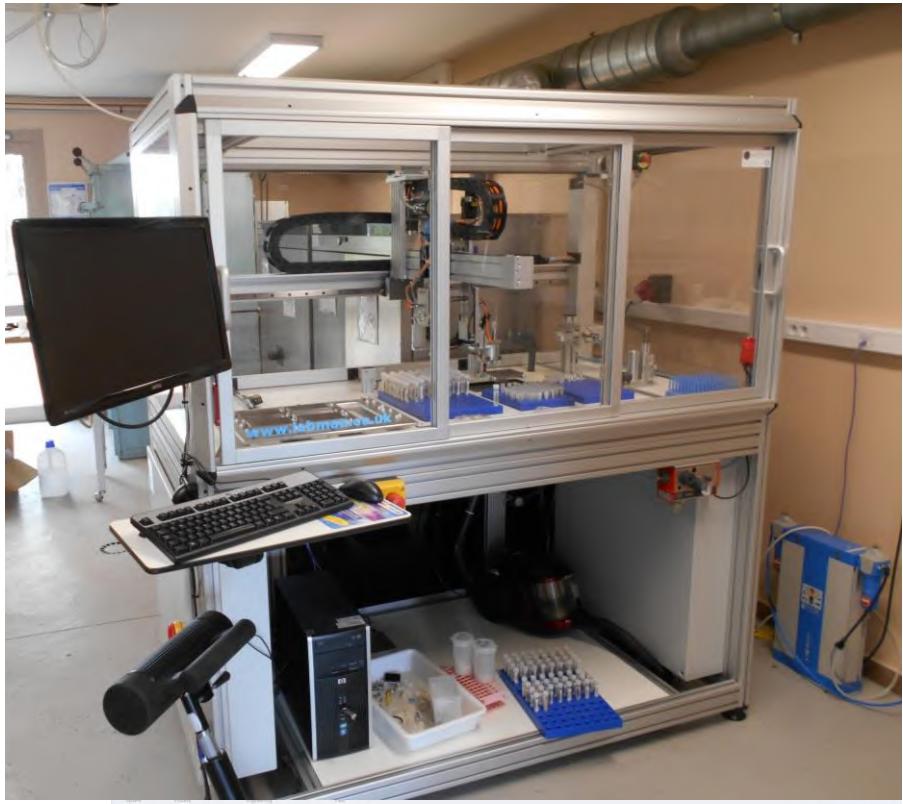
Patrick Leger[1]

Préparation des échantillons de bois

Lyophilisateur grande capacité

Broyeur à couteaux

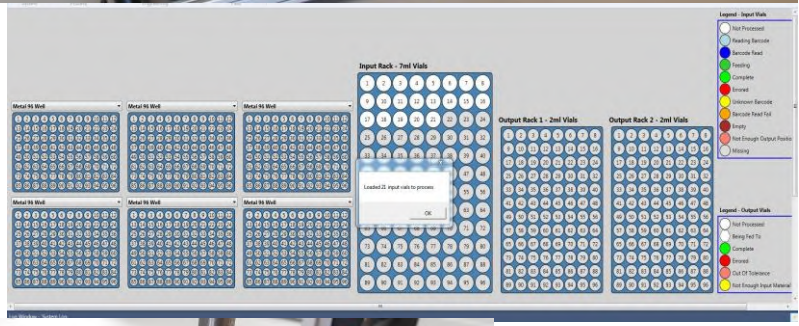
Tamiseuse

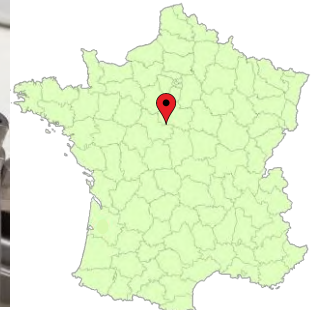


Distribution robotisée de poudre
- en tubes à centrifuger
- en plaques 96 puits (5mg/puits)

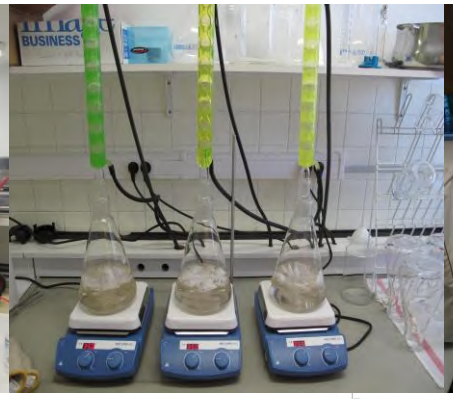
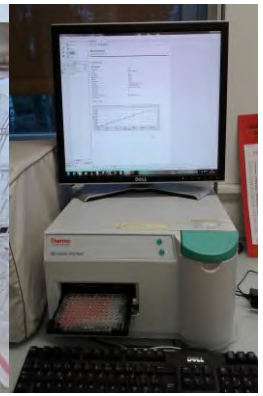
Broyeur à billes

Broyeur ultracentrifuge



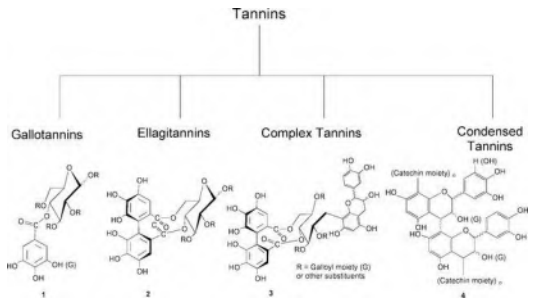


Propriétés chimiques du bois : durabilité, qualité de la biomasse

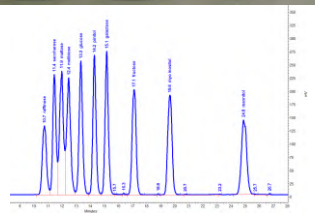
Extractibles

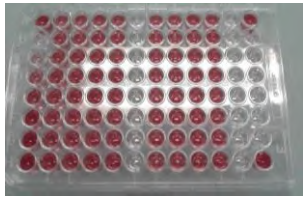
- ✓ Composés phénoliques -Tannins
- ✓ Sucres solubles et amidon
- ✓ Lipides totaux



Méthodologies

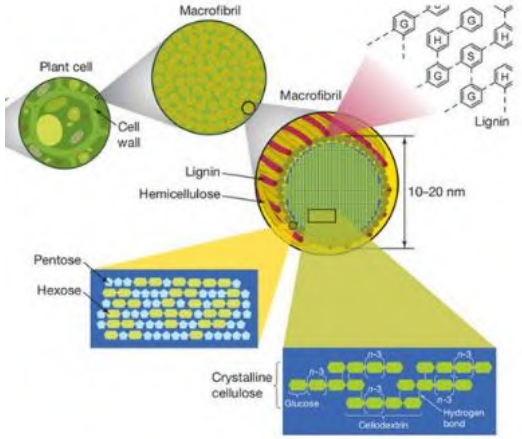
- ✓ CLHP
- ✓ Gravimétrie
- ✓ Spectrophotométrie colorimétrique
- ✓ Spectrophotométrie UV
- ✓ Réacteur de prétraitement hydrothermique





Constituants chimiques structuraux

- ✓ Lignines
- ✓ Cellulose, Hémicelluloses
- ✓ Sucres pariétaux après hydrolyse
- ✓ Cendres
- ✓ Potentiel de saccharification de la biomasse



⇒ **Composition chimique de tout type de tissu de l'arbre : bois, feuilles, racines, graines**

Mesure de la couleur …

Spectrocolorimètre Konica-Minolta modèle CM 2600d (360-740 nm)

… et de l'infradensité du bois

Saturation des échantillons dans l'eau et sous vide

Balance de précision Mettler équipée d'un kit infradensité

Echantillon saturé en eau et pesé dans l'air

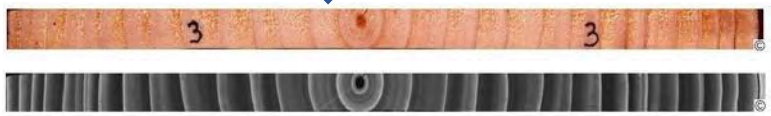
Echantillon plongé dans l'eau et pesé

Microdensitométrie : étude de l'adaptation des arbres aux changements environnementaux par analyse rétrospective de cernes

Prélèvement de carottes

Prélèvement de barreaux sur rondelles

Scie-fraise à lames jumelles



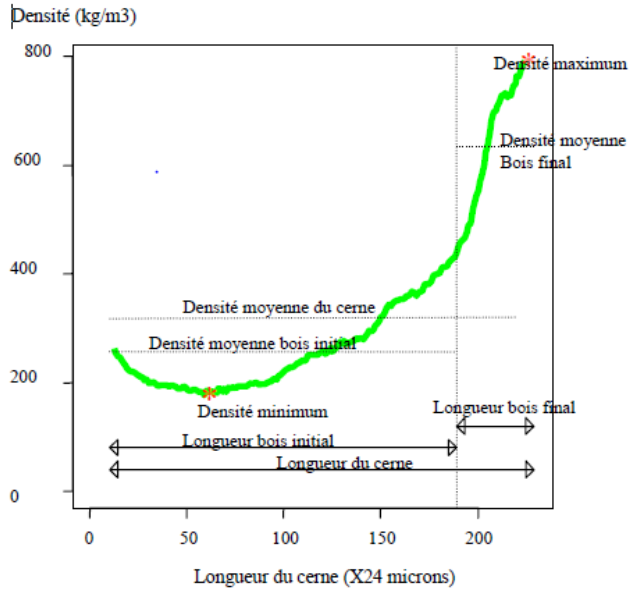
Planchette 2 mm d'épaisseur

Radiographie des planchettes et numérisation des radios

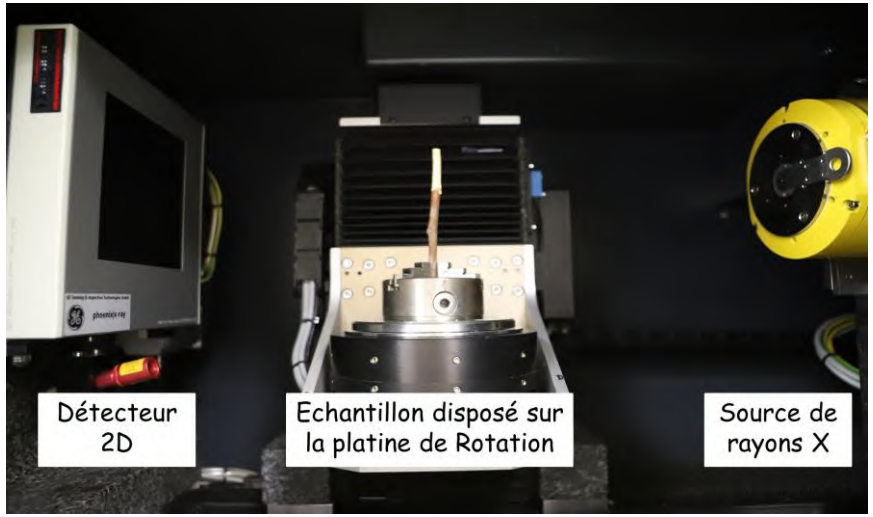
Analyse d'images sous ***Windendro:***

- acquisition des profils microdensitométriques

- calculs variables de cernes (densité, largeur, …)

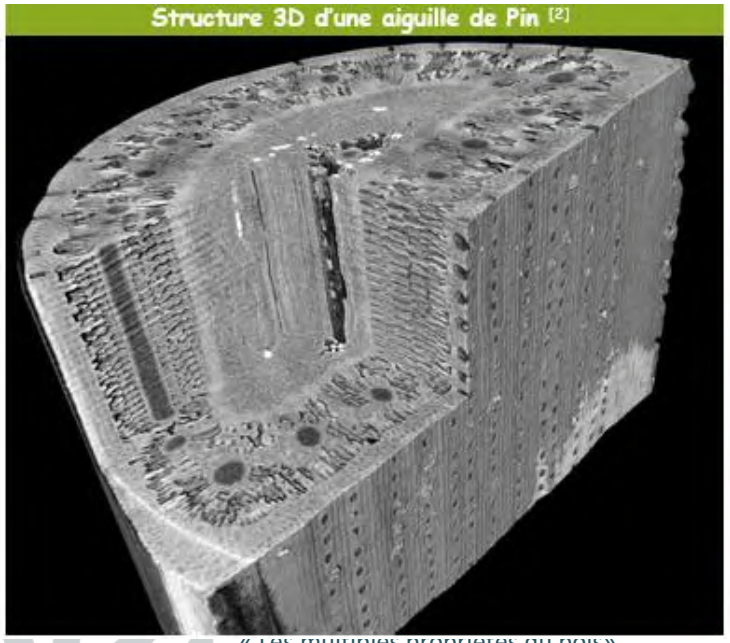


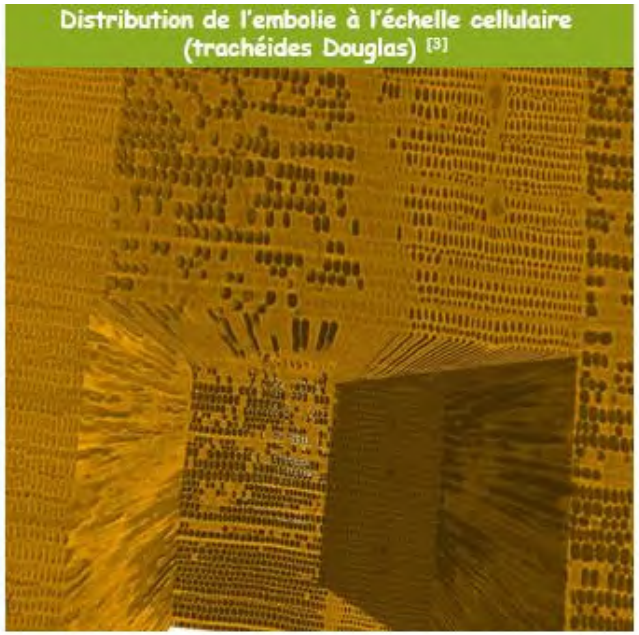
Microtomographie à rayons X

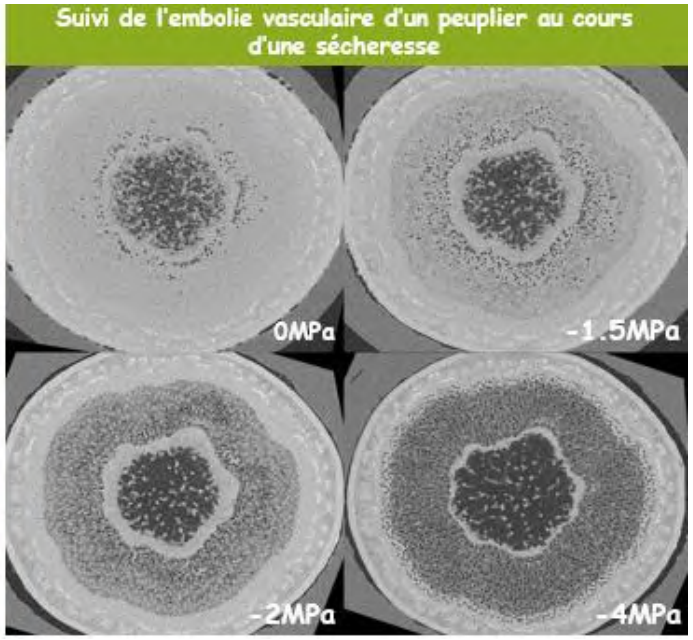


Méthode d'imagerie non destructive permettant de visualiser l'intérieur d'un objet en 3 dimensions

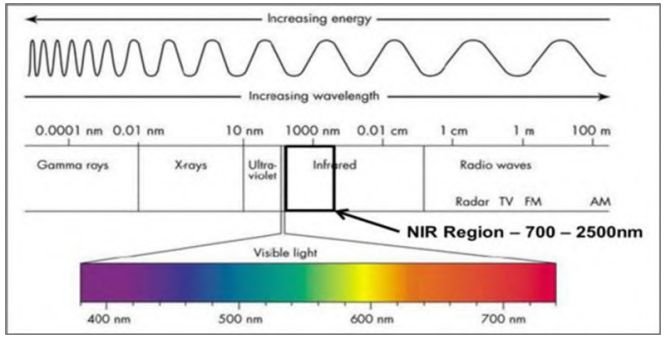
- Echantillon est placé sur une platine de rotation, entre la source de rayons X et le détecteur 2D.
- Rotation de l'échantillon sur 360°C
- Radiographié à différentes positions angulaires
- Opération mathématique dite de « reconstruction » : l'image numérique 3D est réalisée à partir de l'ensemble de ces clichés 2D





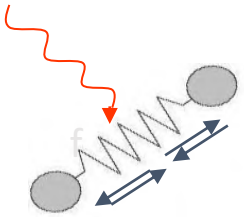


Spectrométrie proche infra-rouge (Nassim Belmokhtar)



La lumière est une énergie électromagnétique définie par sa fréquence et son **énergie**

NIR light

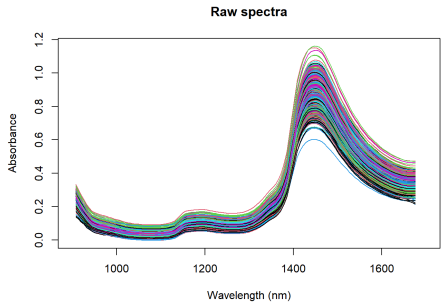


Interaction des ondes électromagnétiques avec la matière
⇒ **Transition énergétique**
⇒ **Obtention d'un spectre (absorbances)**

Développement de modèles prédictifs à l'aide de méthodes chimiométriques

Données **quantitatives** ou **qualitatives**

&



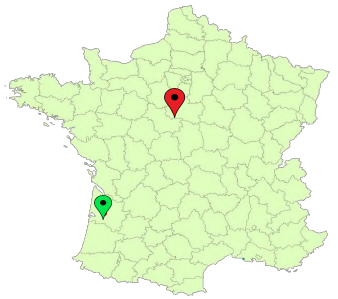
Les besoins

- Alternatives à certaines méthodes analytiques classiques
- Méthodes rapides et économiques pour le haut-débit
- Eviter la destruction des individus phénotypés

Mise en œuvre depuis une douzaine d'années

- Propriétés chimiques
  - cellulose, hémicelluloses, lignine, extractibles…
- Propriétés physiques
  - densité, bois de tension, résistance à cavitation...
- Discrimination d'espèces et de provenances géographiques
  - chêne, mélèze, peuplier…
- Discrimination en fonction de la résistance à des pathogènes
  - **Résistance/sensibilité à la chalarose du frêne**

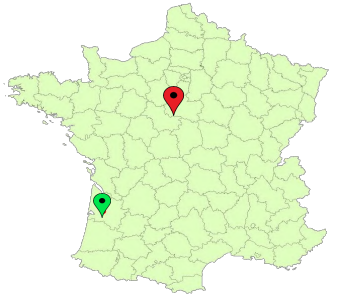
Karl Norris (1921 – 2019) – USDA (agro-industrie)



Spectrométrie proche infra-rouge

Laboratoire (Orléans et Bordeaux)

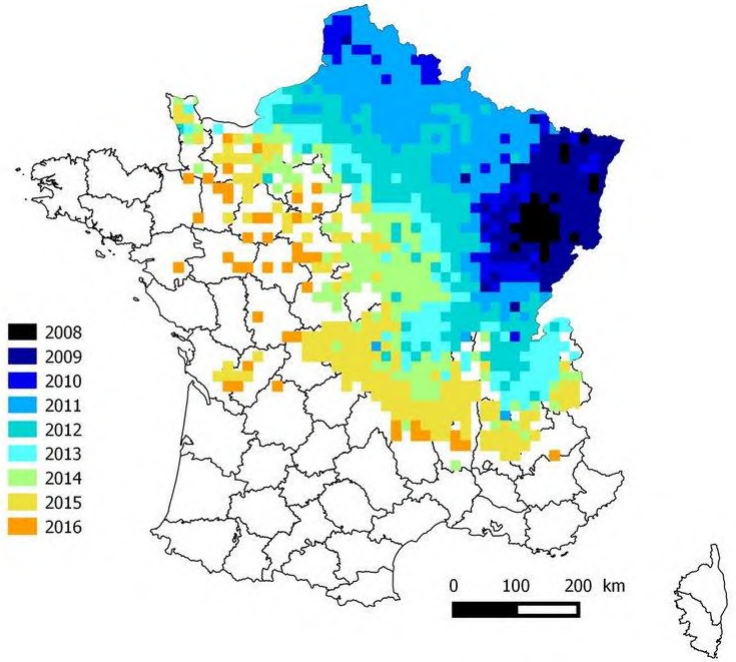
Terrain (Orléans)



Utilisation de la spectrométrie proche infrarouge *in situ* pour la discrimination de frênes résistants et sensibles à la chalarose – Nassim Belmokhtar

Pathogène envahissant :

- Ascomycète originaire d'Asie de l'Est, *Hymenoscyphus fraxineus*
- Premières observation en 1990 en Pologne
- Dissémination rapide, atteint la France en 2008 (dispersion aérienne)



Carte des premiers signalements de chalarose en France depuis 2008

Utilisation du phénotypage par spectroscopie vibrationnelle

Faire un lien entre la chimie de l'hôte et sa résistance à la maladie

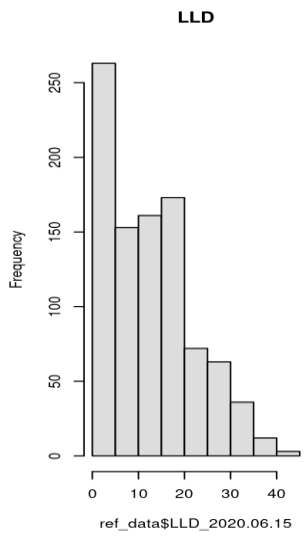
in situ

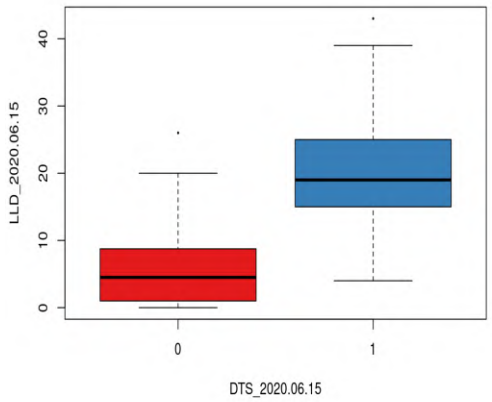
Dommages irréversibles et menace sérieuse sur la biodiversité et les écosystème forestiers

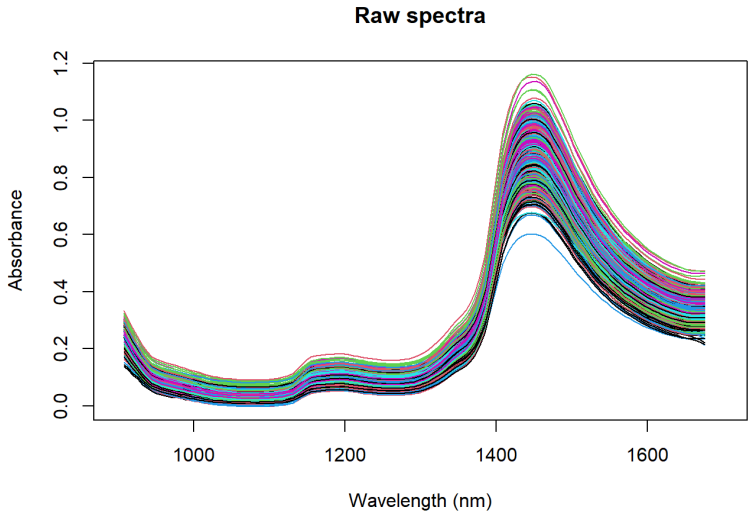
Travail réalisé dans le cadre du projet B4EST :

Arnaud DOWKIW (INRAE Orléans), Paul COPINI et al., (WUR, Pays bas)

- 102 *Fraxinus excelsior* clones plantés dans 4 placettes
- Spectres MicroNIR collectés sur 3 hauteurs (5, 7 and 9):
  - **Leaves (2019)**
  - Leaves (2020)
  - Wood (2019)
- 410 plants (plusieurs ramets par clone)
  - Inoculation des clones par le champignon
- Phenotypic data available for 2019 samples only
  - Mesure de la longueur des lesions vers le bas
  - Classification des plants en deux classes
    - Résistantes = 0
    - Sensibles = 1







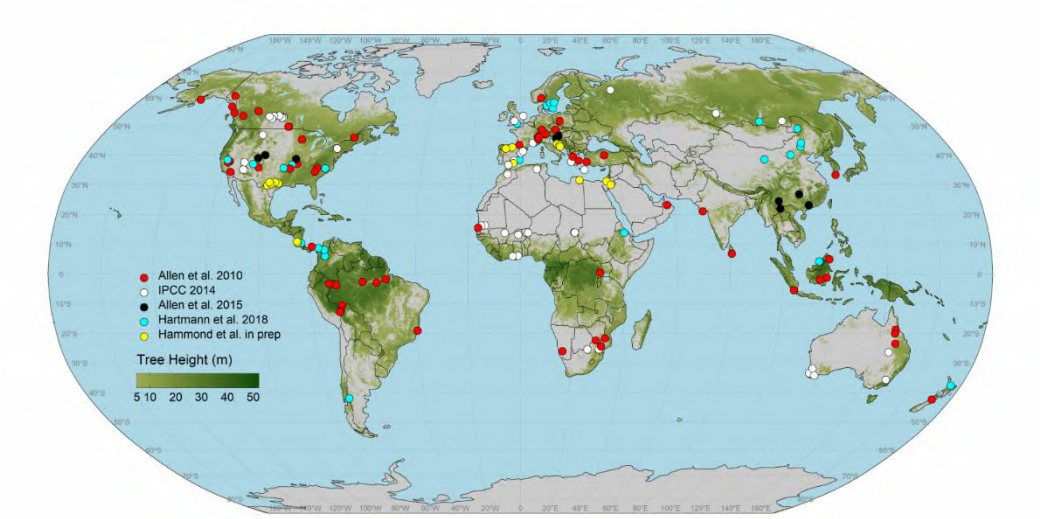
Prétraitements mathématiques

Régression PLS-DA

	Feuille 5	Feuille 7	Feuille 9
Modèles global	0,77	0,71	0,82
Placette 1	0,81	0,64	0,73
Placette 2	0,83	0,85	0,87
Placette 3	0,87	0,96	0,96
Placette 4	0,78	0,76	1,00

- Présence d'une hétérogénéité entre feuilles mesurées
- Meilleur modèle obtenu à partir des spectres des feuilles 9
- Outil d'aide à la décision permettant d'éliminer les individus sensibles
- Aide à la sélection des clones résistants pour freiner la progression de la maladie

Sècheresse et mortalité, un phénomène global – Régis Burlett

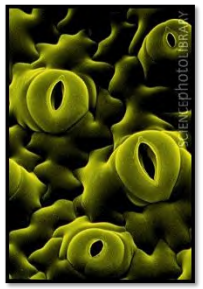


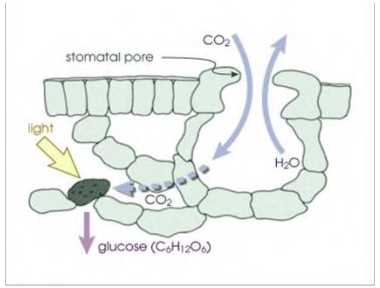
Chênes en forêt de Compiègne (2020)

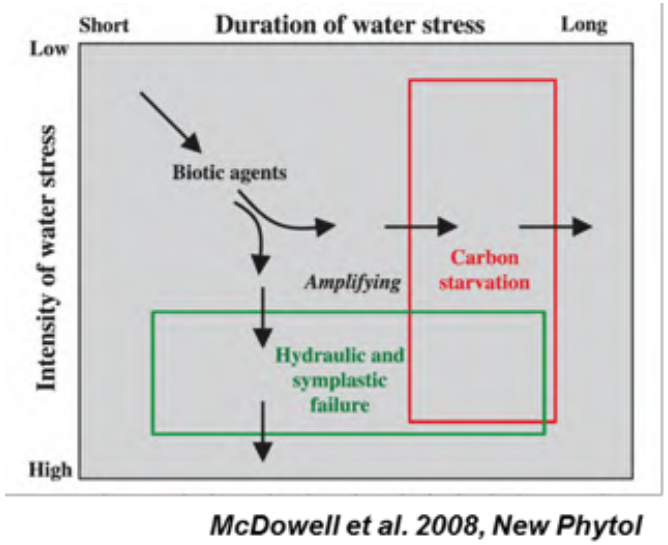
Epicéas dans la Marne (2020)

Hêtre dans le Jura (2019)

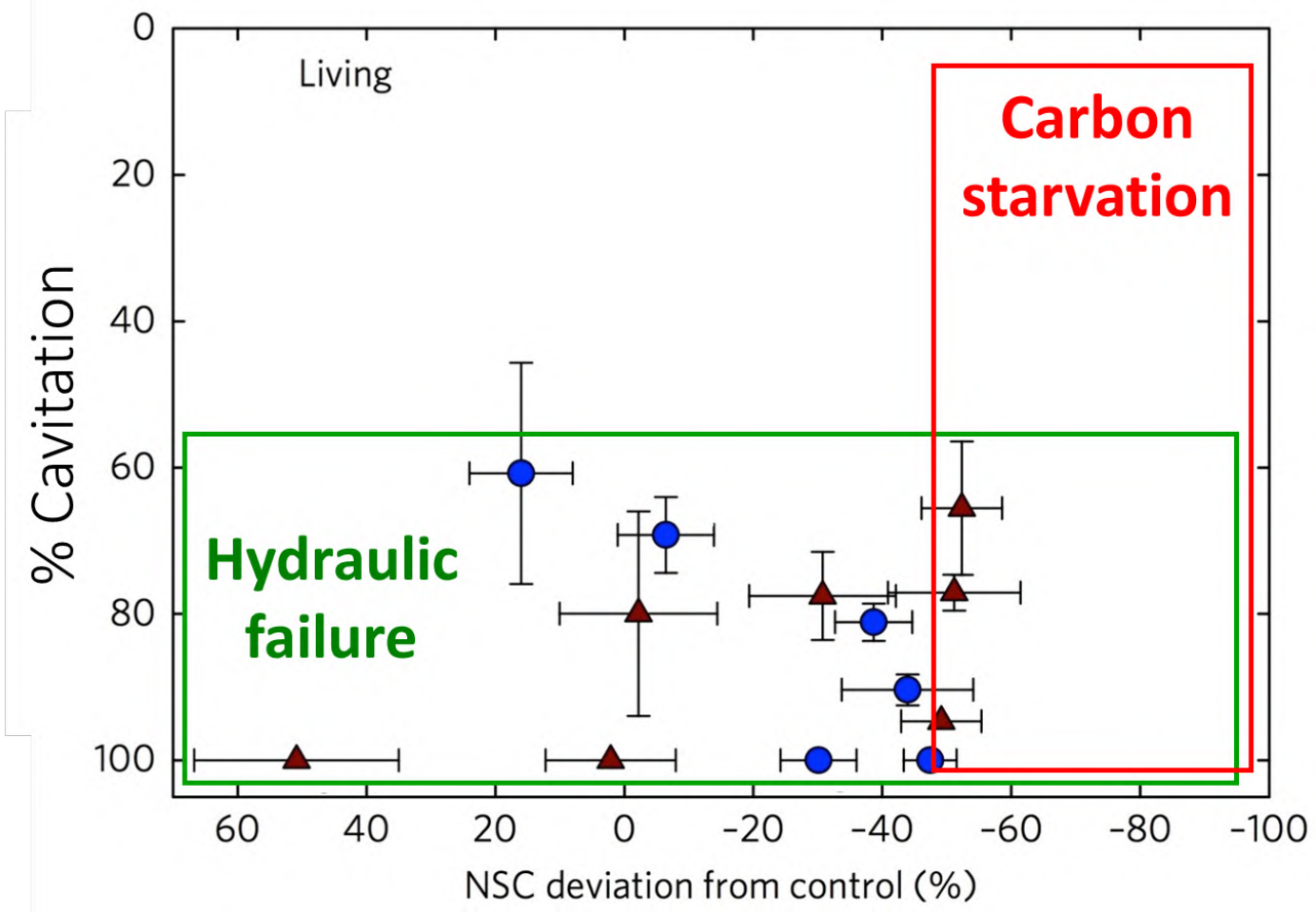
Mort de soif ou mort de faim ?





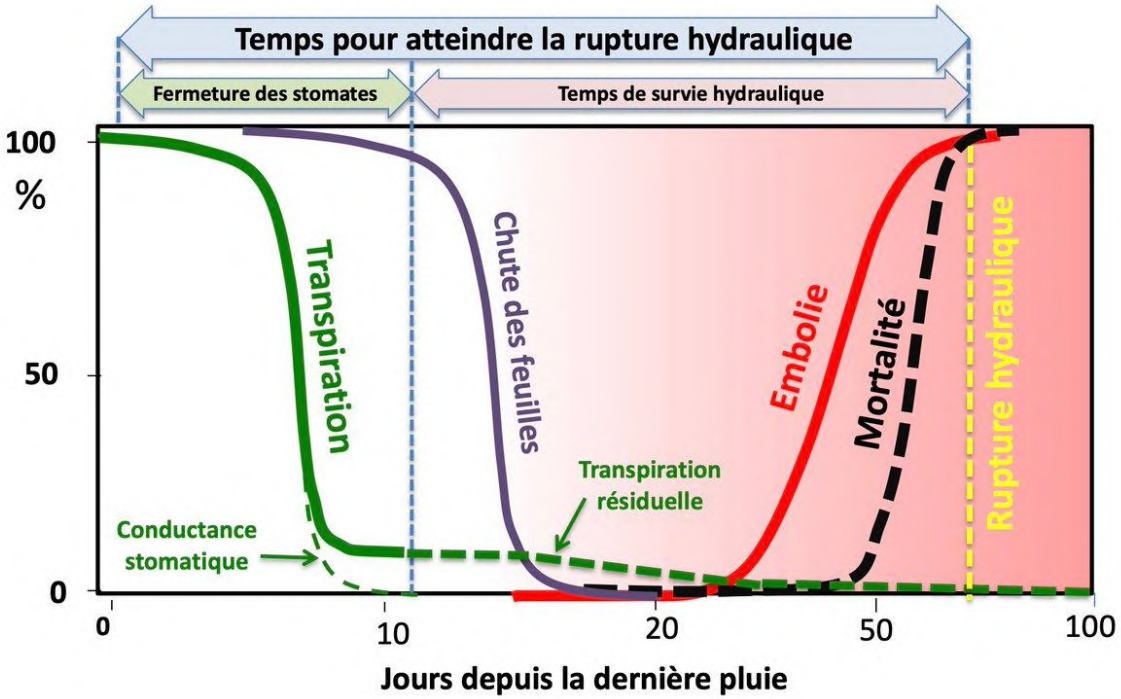


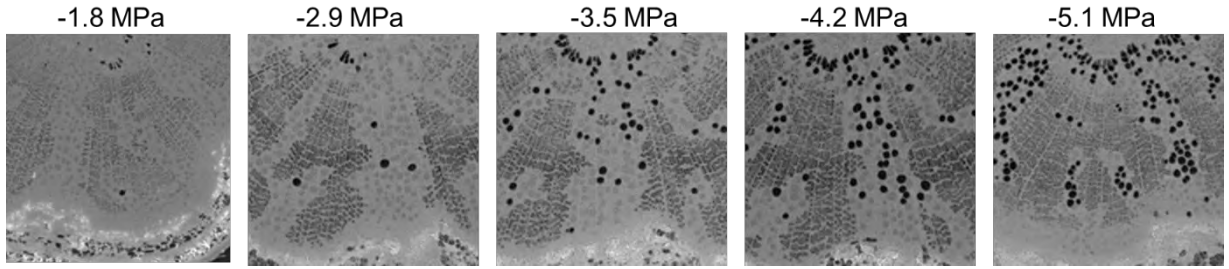
McDowell et al. 2008, New Phytol



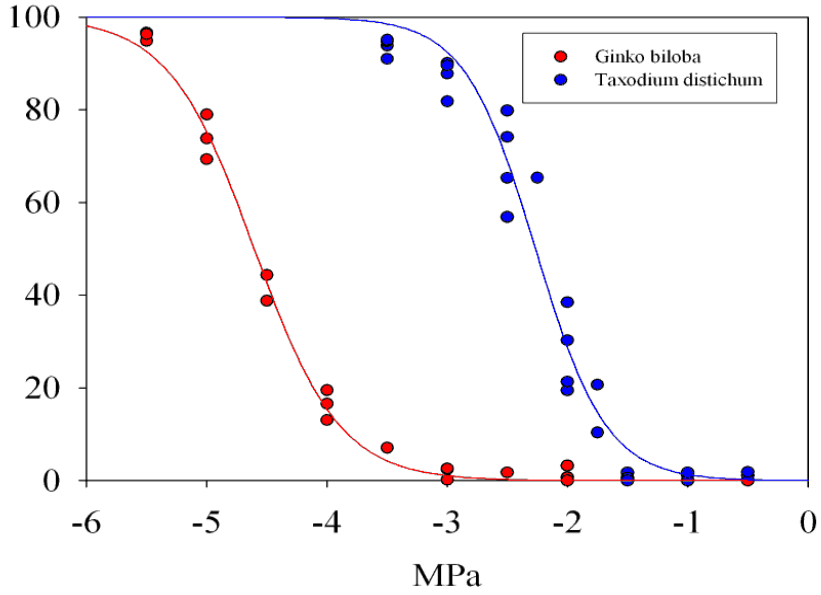
From Adams *et al* 2017

Lien entre la rupture hydraulique et la mortalité, un effet seuil



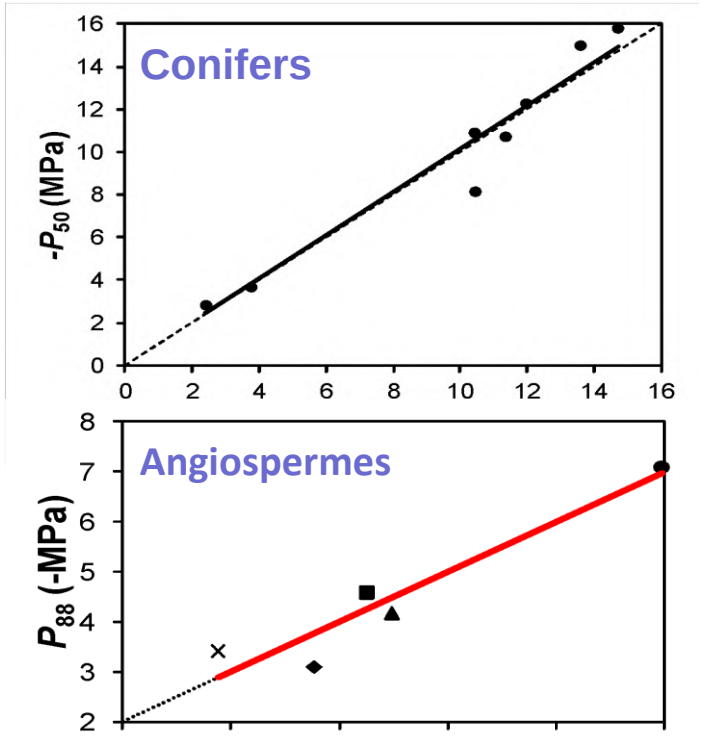


L'embolie du xylem : un processus irréversible



Courbe de vulnérabilité = Caractérisation de la résistance à la sécheresse

Lien entre la rupture hydraulique et la mortalité, un effet seuil

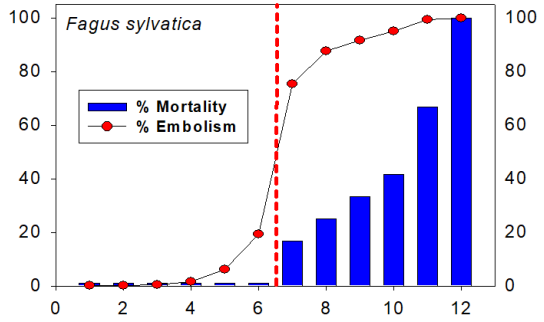


Lethal water potential (-MPa)

Brodribb et al. 2010 New Phytol

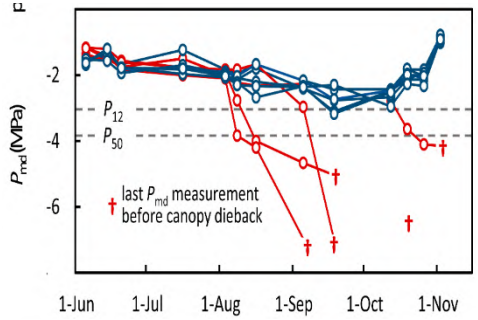
Urli et al. 2013 Tree Phys

En serre



Barigah et al 2013 Tree phys

Sur le terrain

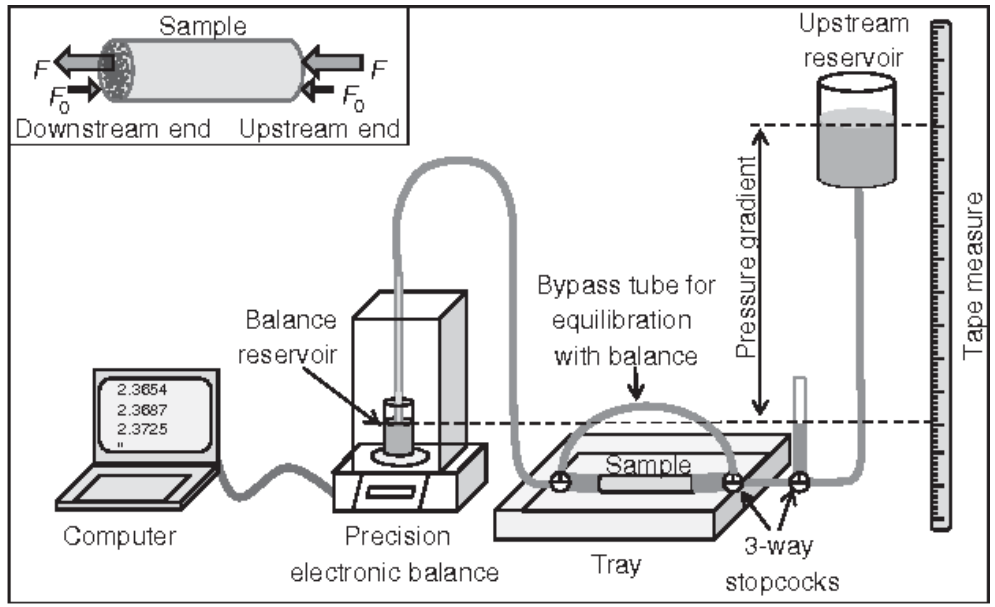


Arend et al 2021 PNAS

Mesurer la P_{50} = mesurer la conductance à différent niveaux de sécheresse

Les méthodes « historiques »

Méthode hydraulique (gravimétrie)

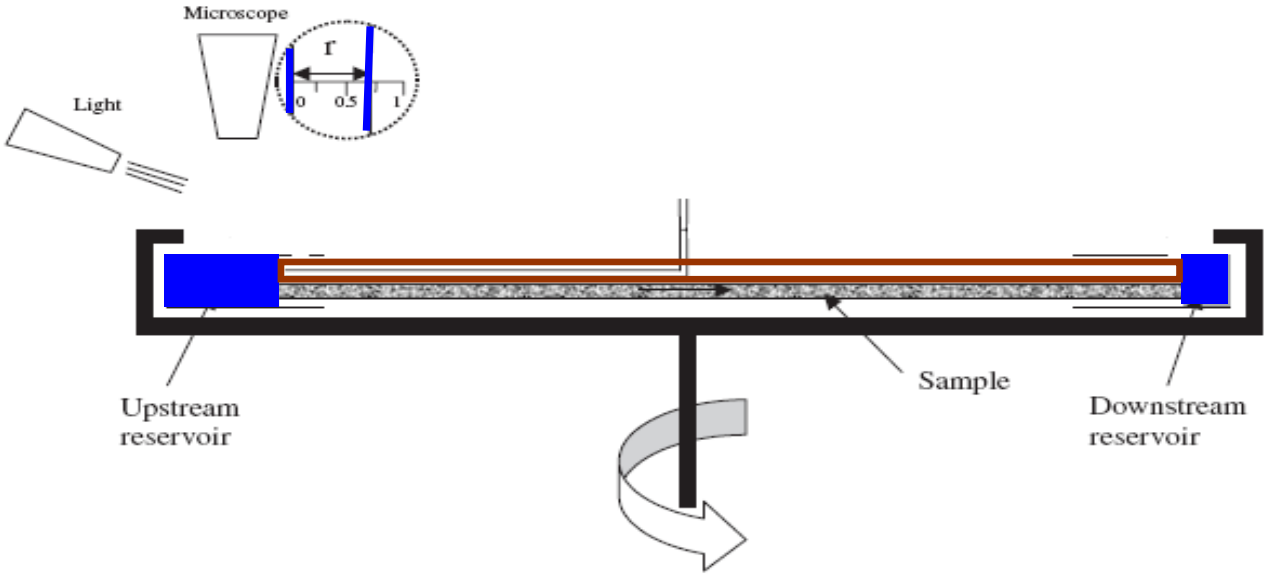


Méthode acoustique (ultrason)

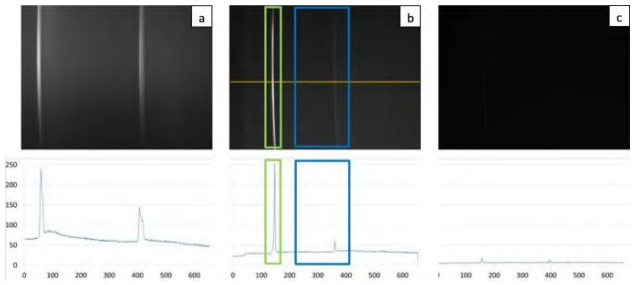
Coloration (perfusion)

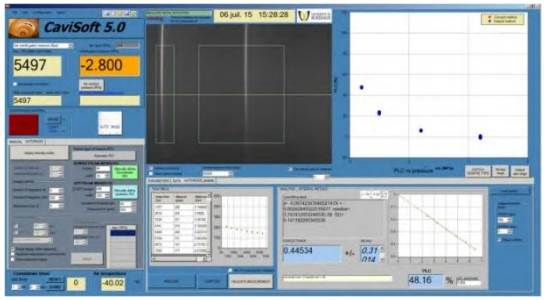
Mesurer la P_{50}

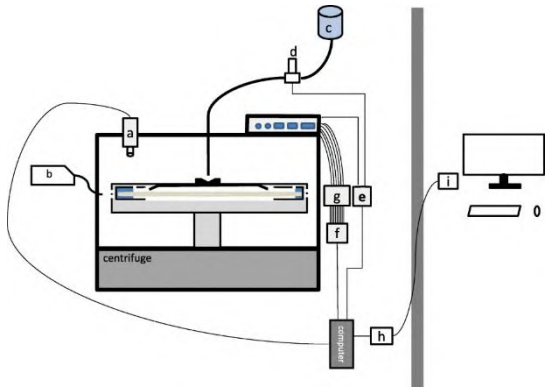
Le cavitron

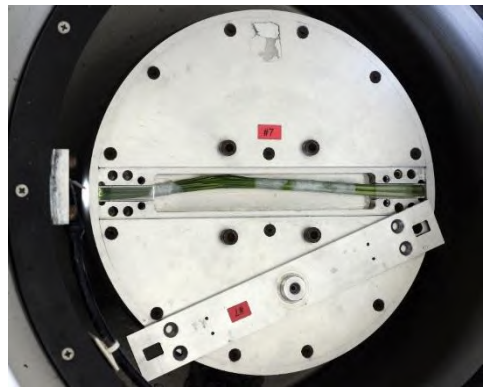


Burlett et al 2022, Annals of Forest Science





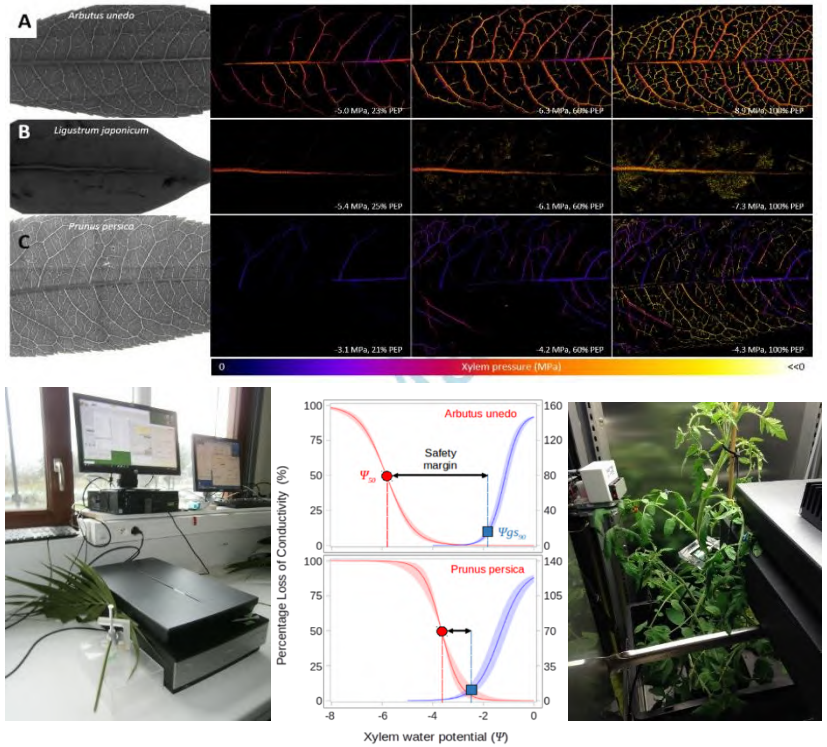




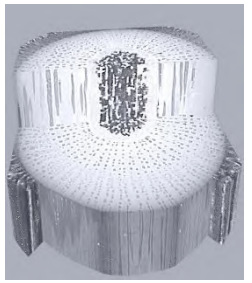
Mesurer la P_{50}

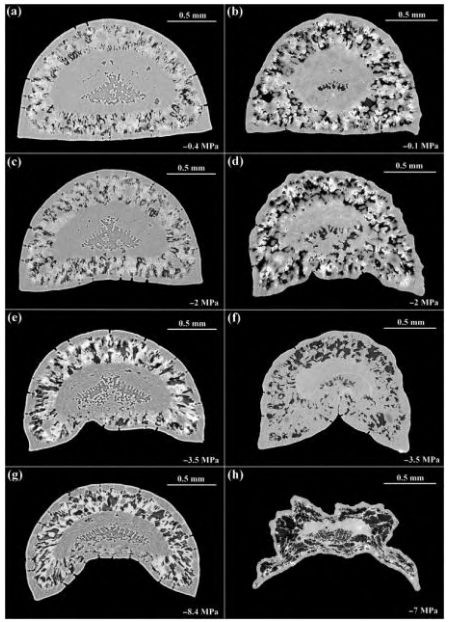
Les méthodes par visualisation directes (méthodes non invasives et non destructives)

Méthode optique (visible)

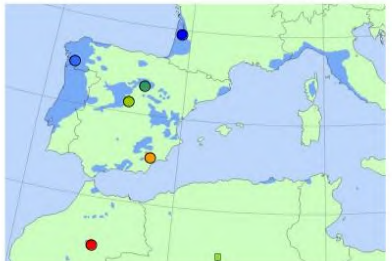


Microtomographie RX

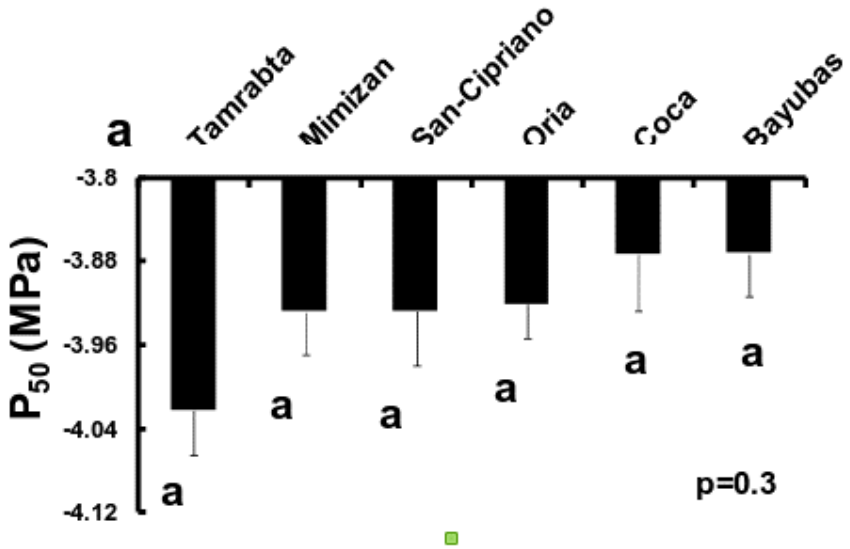




Variabilité intraspecifique limitée

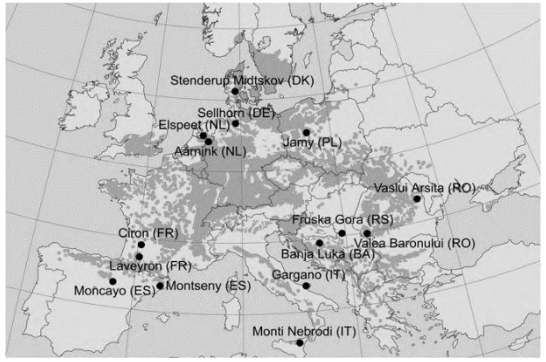


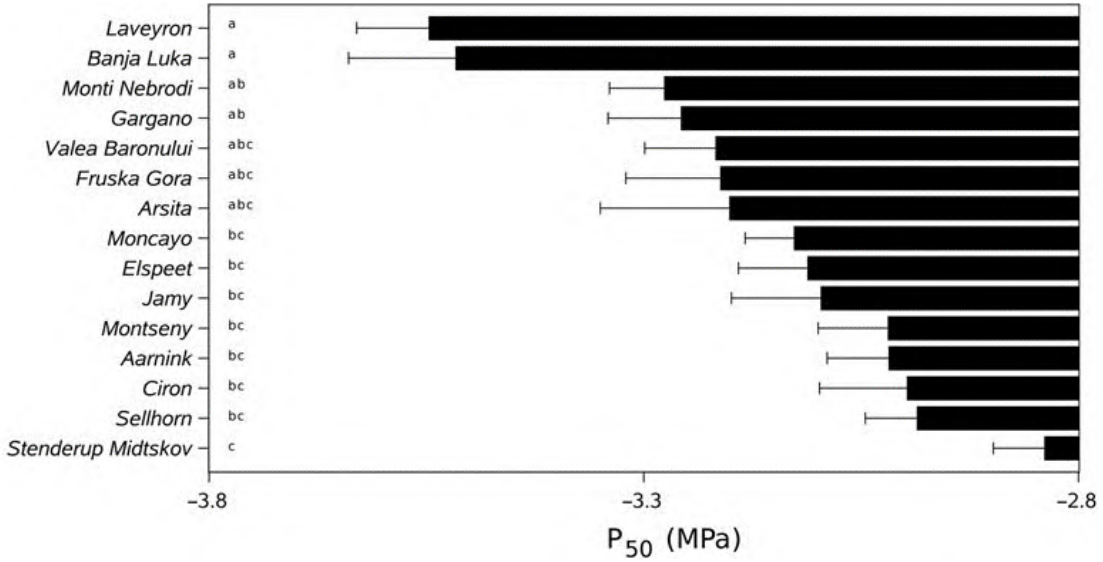
Pin maritime (*Pinus pinaster*)



Lamy et al. 2011 PLOS one
Lamy et al. 2014 New Phytol

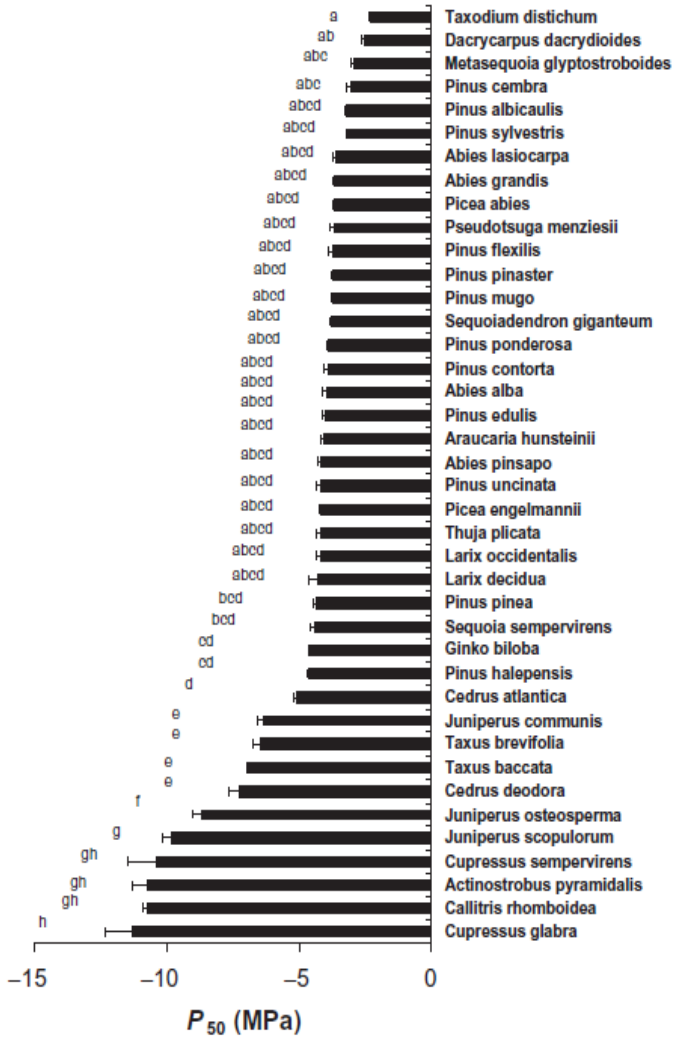
Hêtre (*Fagus sylvatica*)

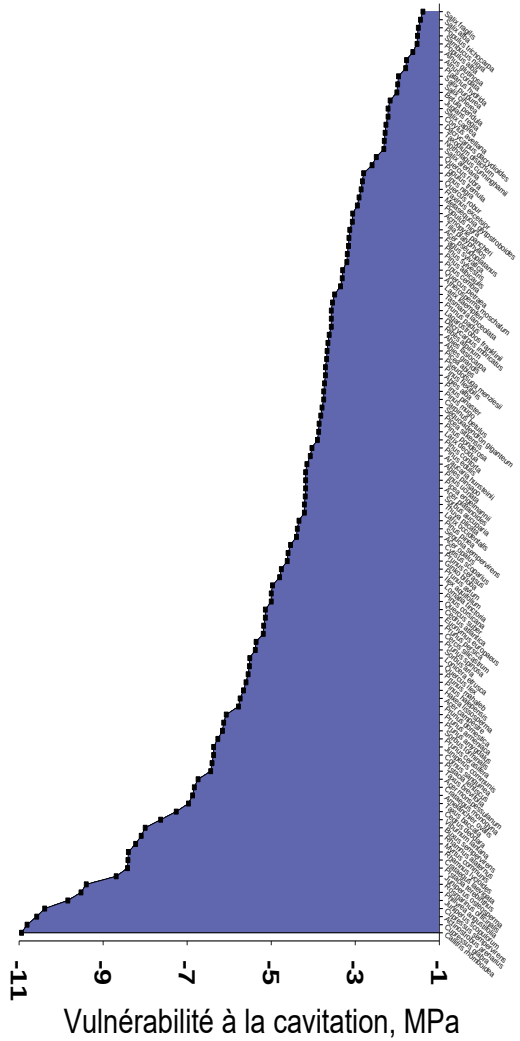


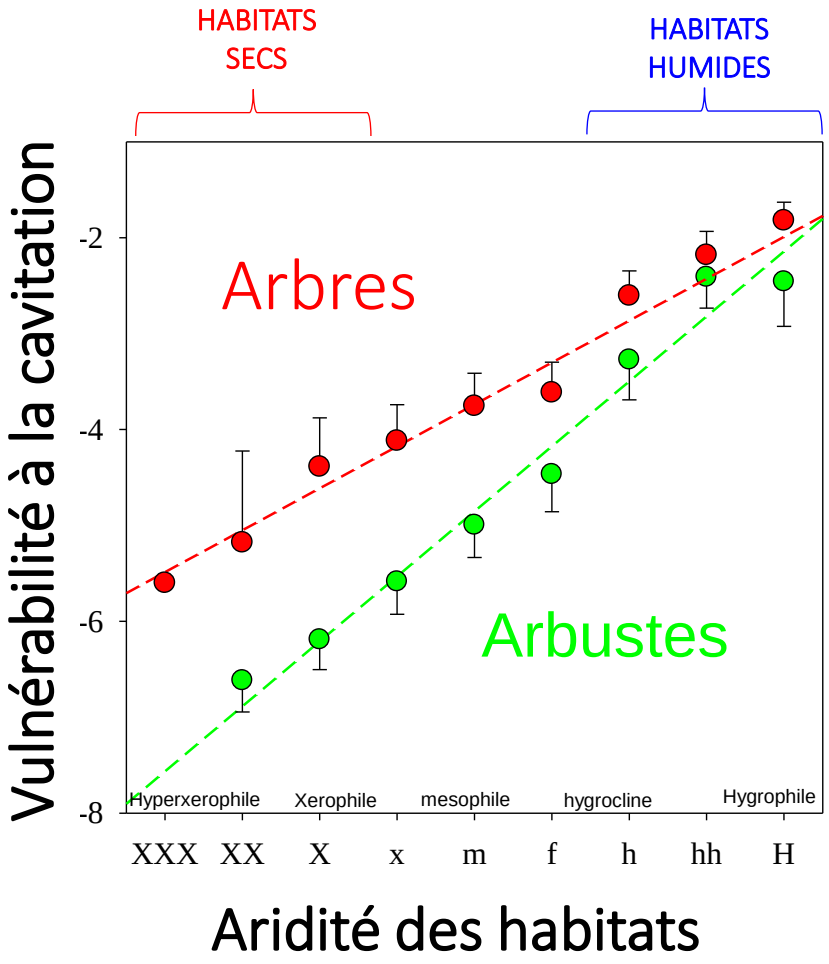


Stojnic et al. 2017 Tree Phys

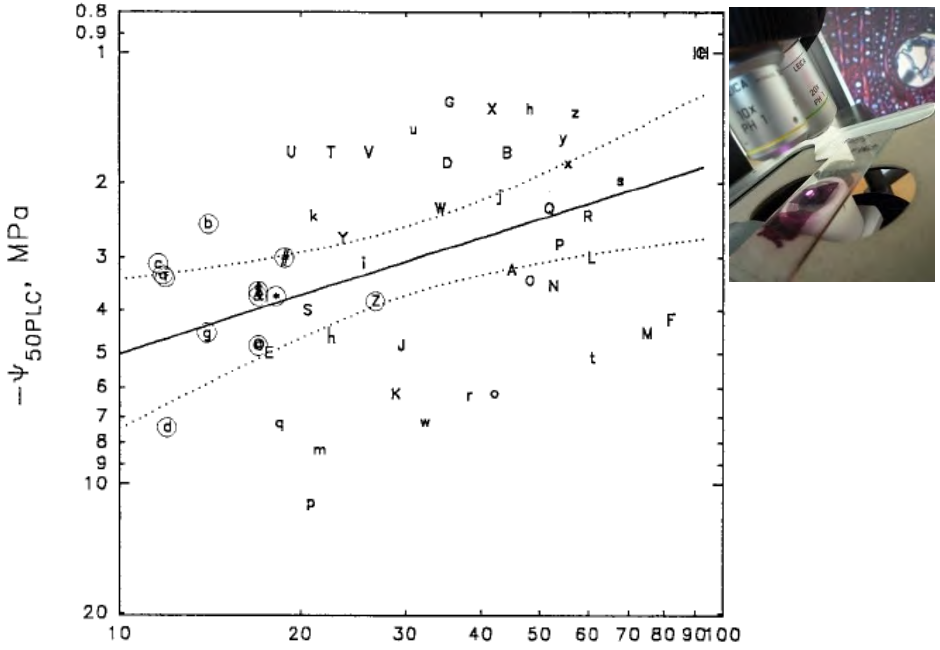
Grande variabilité interspecifique, +/- liée à l'aridité des habitats



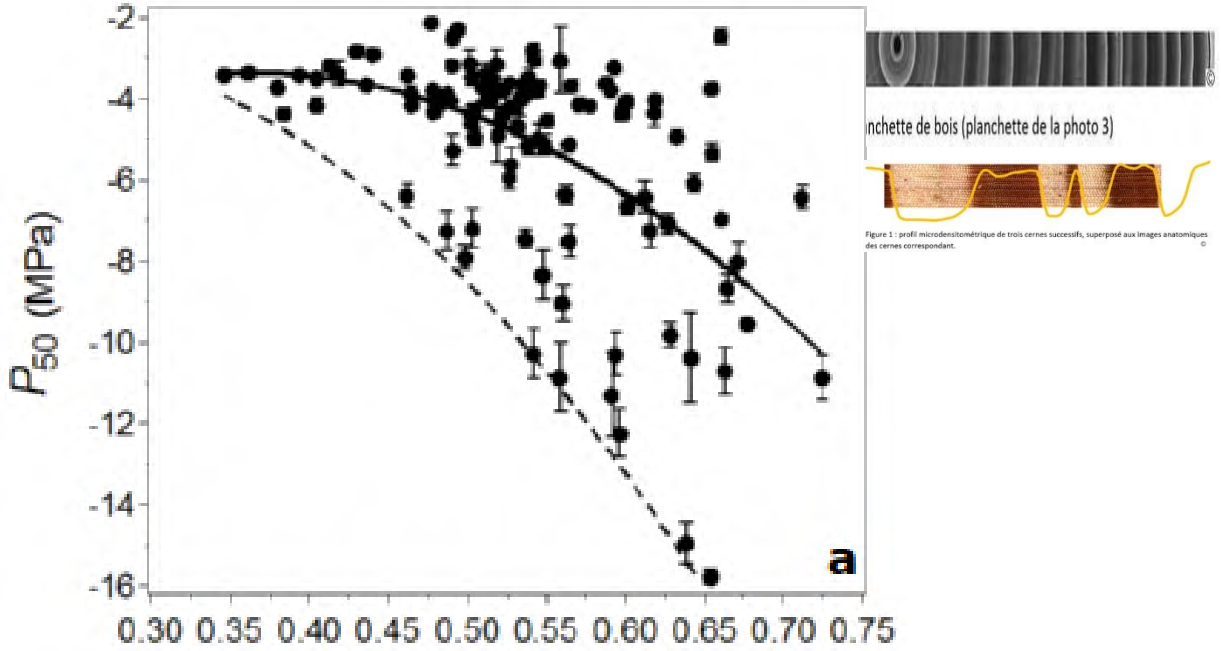




Pas de lien très clair entre résistance à la sècheresse et taille des vaisseaux ou densité du bois



Diamètre des vaisseaux (µm)

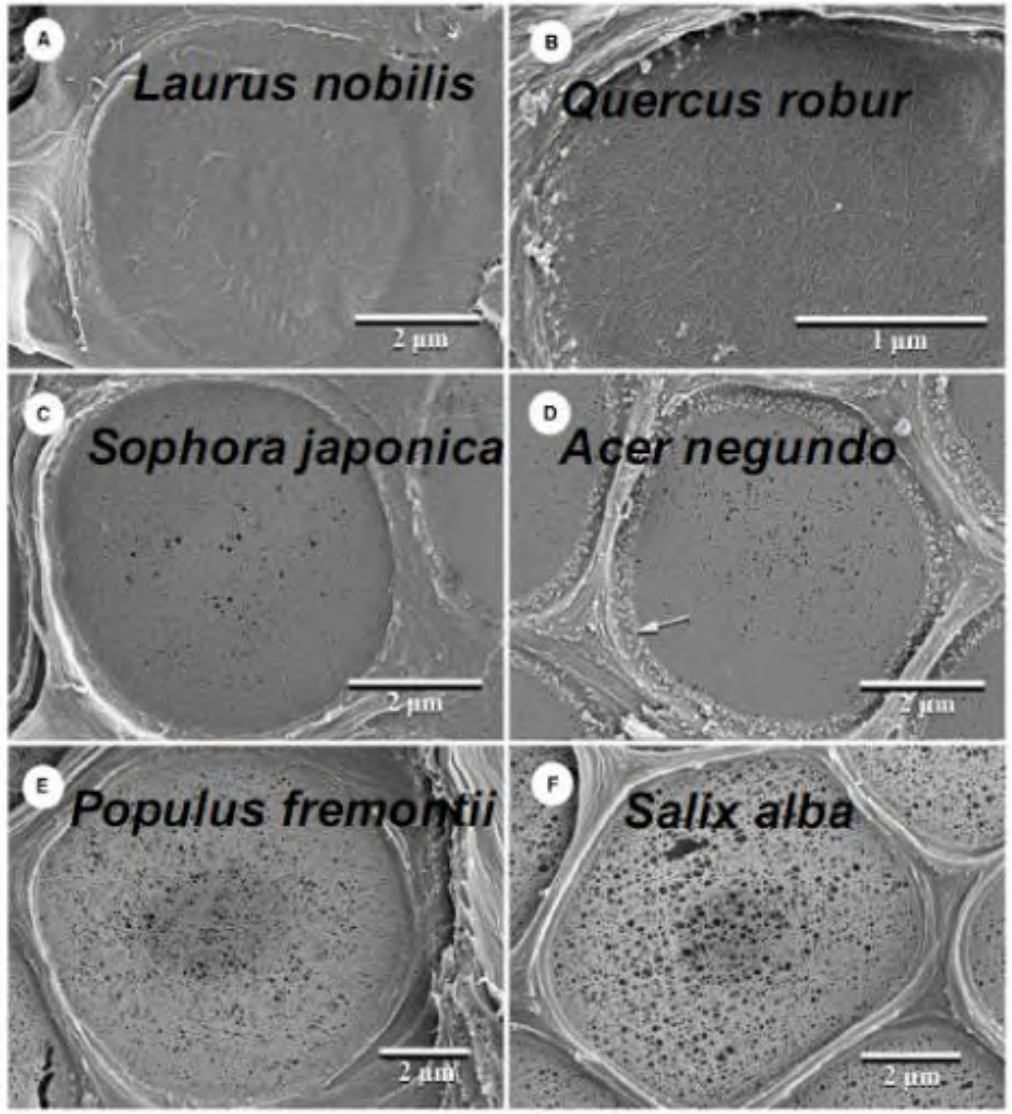


Densité du bois

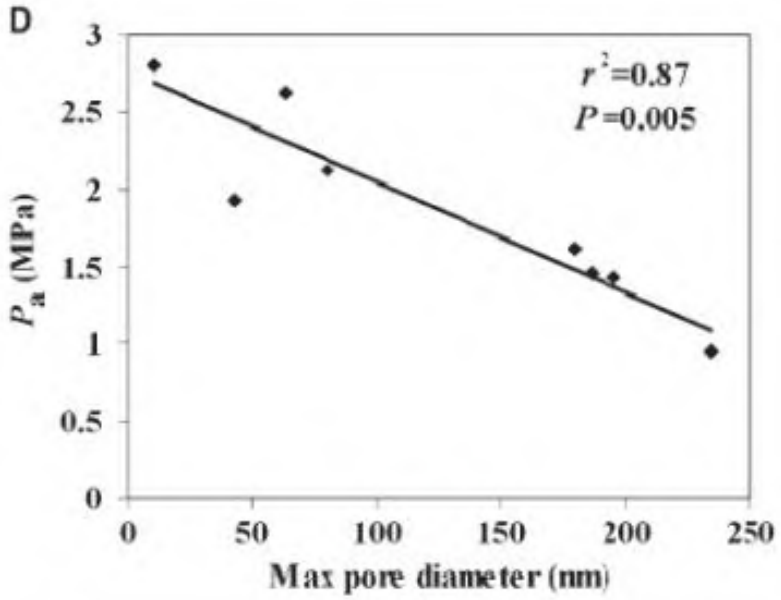
Delzon et al (Unpublished data)

Et à une autre échelle spatiale?

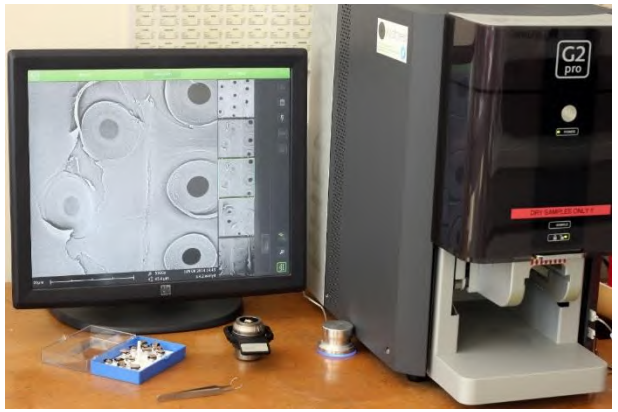
Cavitation et structure des ponctuations - angiospermes-



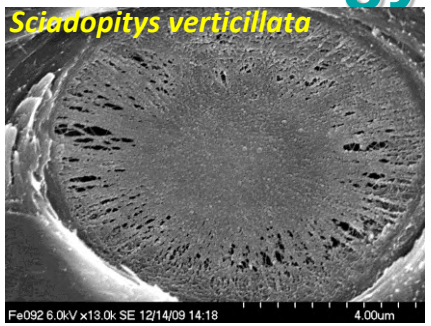
Jansen et al. 2009



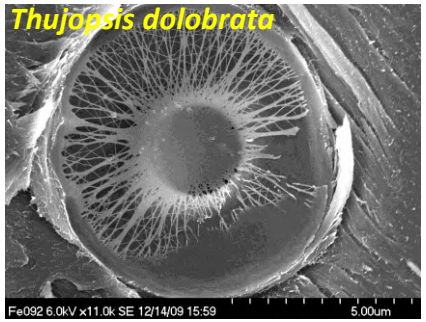
Observations en MEB



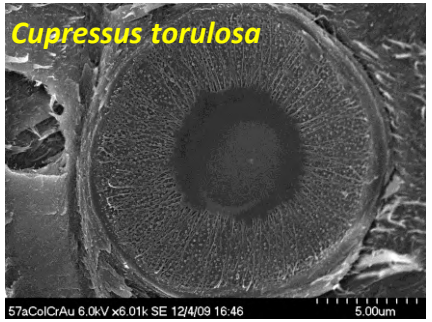
Cavitation et structure des ponctuations - gymnospermes-



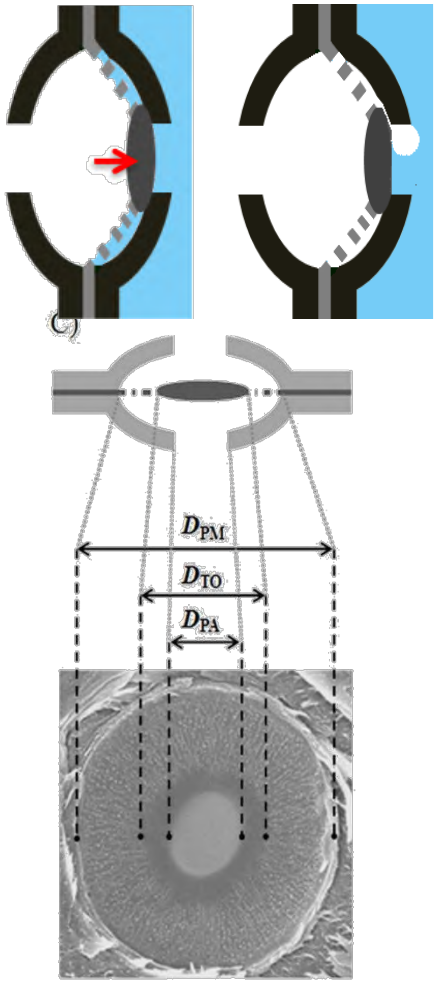
P_{50} = -3.8 MPa



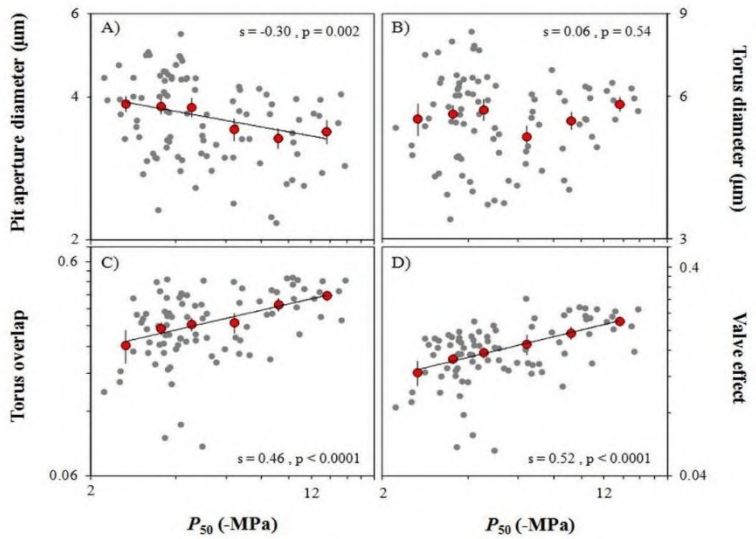
P_{50} = -5.2 MPa



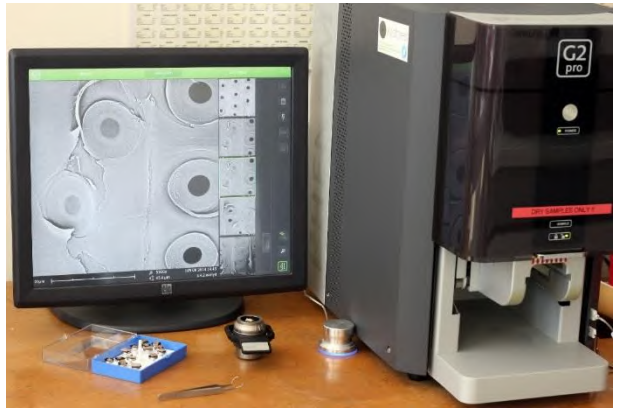
P_{50} = -7.6 MPa



Delzon et al. 2010 PC&E



Bouche et al. 2014 JExpBot



Merci pour votre attention…

contact-phenobois@inrae.fr