



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2013-2014

MASTER FAGE

Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et
l'Environnement

Spécialité

BIA

Biologie Intégrative de l'Arbre et des Plantes Cultivées

Extractibles nodaux des essences forestières tempérées



Nassim Touahri

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 03/09/2014

Encadrants :

Francis Colin, Chargé de recherche, HDR. Equipe Croissance, Production, Qualité des Bois (CPQB). UMR LERFoB – INRA centre de Nancy.

Zineb Kebbi-Benkeder, Doctorante 2^{ème} année. Equipe Croissance, Production, Qualité des Bois (CPQB). LERFoB et LERMaB

Stéphane Dumarçay, Maître de Conférences à l'université de Lorraine et membre de l'équipe chimie du bois et procédés de préservation du LERMaB.

Philippe Gérardin, professeur. Directeur du LERMaB.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à adresser mes vifs remerciements à Monsieur Francis Colin, pour son encadrement, son soutien, ses conseils et sa patience pendant toute la durée du stage.

Je remercie également Madame Zineb Kebbi-Benkeder pour toute son aide, sa disponibilité et l'attention accordée pendant mon stage.

Toute ma gratitude ira également à Monsieur Stéphane Dumarçay, pour son aide, ses conseils et sa patience, particulièrement pendant la réalisation des analyses chimiques.

Je souhaite également faire part de ma reconnaissance à Monsieur Philippe Gérardin, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe au LERMaB pour la réalisation des analyses chimiques.

Je tiens également à remercier Monsieur Bruno Garnier, Monsieur Loïc Dailly et Monsieur Nicolas Houssement pour leur contribution technique durant ce stage.

Enfin j'adresse mes vifs remerciements aux équipes du LERFoB et du LERMaB, pour leur sympathie, leur bonne humeur et leur accueil chaleureux.

Liste des abréviations

- BSTFA : Bis trimethyl silyl trifluoroacétamide
- FAO : Food and Agriculture Organisation of the united nations
- GC-MS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
- LC-MS : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
- NIST : National Institute of Standards and Technology (U.S.A)
- TMS : Triméthyle silyle
- UV : Rayons ultra-violets

Sommaire.

| | |
|---|----|
| Présentation de la structure d'accueil. | 1 |
| I- Introduction..... | 1 |
| I-1- Les classes d'extractibles. | 2 |
| I-1-1- Les extractibles lipophiles. | 2 |
| a- Les composés terpéniques. | 2 |
| b- Les acides gras. | 3 |
| I-1-2- Les extractibles hydrophiles. | 3 |
| a- Les lignanes. | 4 |
| b- Les flavonoïdes. | 4 |
| c- Les stilbènes. | 5 |
| I-2- Les rôles des extractibles. | 5 |
| I-3- Contexte et objectifs du stage. | 6 |
| II - Matériels et méthodes. | 7 |
| II-1- Matériel végétal. | 7 |
| II-2- Matériel au laboratoire. | 8 |
| II-2-1- Solvants utilisés. | 9 |
| II-2-2- Récupération de l'extrait. | 9 |
| II-2-3- Quantification. | 10 |
| II-2-4- Techniques analytiques. | 10 |
| a- Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GCMS)..... | 10 |
| b- Chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse (LC/MS) | 11 |
| III-Résultats..... | 12 |
| III-1- Quantification des extraits totaux obtenus après extraction. | 12 |
| III-2- Taux et nature des extraits selon le solvant utilisé et le type de nœud considéré..... | 13 |
| III-3- Caractérisation des extraits. | 14 |
| IV- Discussion. | 16 |
| V- Conclusion et Perspectives. | 18 |
| Références bibliographiques. | 19 |
| Annexes | |

Présentation de la structure d'accueil.

J'ai réalisé mon stage de master 2 dans le cadre d'une collaboration entre le LERFoB (Laboratoire d'Etude des Ressources Forêt-Bois : <http://www6.nancy.inra.fr/foret-bois-lerfob/>) au centre INRA de Nancy-Lorraine à Champenoux (54) et le LERMaB (laboratoire d'études et de recherche sur le matériau bois : <http://lermab.univ-lorraine.fr/>) à l'Université de Lorraine à Vandœuvre-lès-Nancy (54). Le financement de mon travail a été assuré par le LABORatoire d'EXcellence « Arbre » (LABEX Arbre : <http://mycor.nancy.inra.fr/ARBRE/>) dans le cadre de son Workpackage WP3 « Améliorer la compétitivité du secteur bois ».

Les thèmes de recherche développés par le LERFoB concernent notamment l'architecture de l'arbre dont la branchaison - nodosité, la formation du bois, l'effet de l'environnement forestier et de ses perturbations sur des paramètres liés au développement de l'arbre et des forêts... Les thèmes de recherche développés par l'équipe du LERMaB concernent la bio-raffinerie, la valorisation chimique des extractibles dont ceux présents dans les nœuds, la production d'énergie par voies sèches (combustion, la gazéification et pyrolyse) et par voies humides (liquéfaction, hydrolyse, ...).

Au LERFoB j'ai participé à l'échantillonnage des espèces, leur exploitation et la préparation des poudres pour les analyses chimiques que j'ai ensuite réalisées au LERMaB.

I- Introduction.

Les forêts du monde couvrent un peu plus de 4 milliards d'hectares, ce qui représente 31% de la superficie totale des terres (FAO, 2006). Les forêts française et européenne appartiennent aux forêts tempérées qui correspondent à 13 % de la superficie des forêts mondiales (Guinard, 2009).

La chimie verte est en plein essor. Encouragée par la raréfaction prévue à plus ou moins long terme des ressources fossiles, elle est devenue un axe prioritaire de la recherche et de l'industrie. En effet, l'utilisation d'agroressources pour la fabrication de produits chimiques afin de maîtriser la dépendance à la pétrochimie contribue à la promotion d'une industrie raisonnée s'inscrivant dans les principes du développement durable.

Le bois représente la principale ressource forestière est une matière première renouvelable, aux multiples propriétés. Environ 50 millions de mètres cubes sont consommés annuellement par l'industrie du bois en France, cette industrie génère également à haut débit des coproduits tels que les nœuds et les écorces d'arbres, éliminés pour leurs trop fortes quantités en lignines et composés lipidiques.

Actuellement, ces déchets sont brûlés en chaudières pour produire de l'énergie sous forme de vapeur mais une grande partie est également jetée.

Les nœuds représentent une particularité du bois, ils sont liés à la présence de branches dont ils sont le prolongement à l'intérieur du tronc. Ils sont connus pour contenir des quantités importantes d'extractibles tels que des lignanes plutôt chez les résineux, flavonoïdes plutôt chez les feuillus, de grand intérêt économique (nutrition humaine, en pharmaceutique, cosmétique, fongicide, antibactérienne, aromathérapie et parfumerie...). (Holmbom et al. 2003)



Figure 1. Nœud sur metasequoia.

Le bois des nœuds contient de fortes teneurs en extractibles. Par exemple chez l'épicéa, ceux-ci peuvent représenter de 12 à 29% du poids sec du bois de nœud selon le type d'extraction et de solvant associé et la zone où ils ont été prélevés dans l'arbre (Willför et al. 2003). De manière générale, ils contribuent de façon importante aux propriétés physiques et technologiques du bois, tels que la couleur, l'odeur, l'acidité, la durabilité, le comportement vis-à-vis de la finition, du séchage et de l'adhésion (Charrier, 1992). Ce sont donc des composés très étudiés en chimie du bois.

I-1- Les classes d'extractibles.

I-1-1- Les extractibles lipophiles.

Ces extractibles sont solubles dans plusieurs solvants organiques à faible polarité comme l'hexane et le dichlorométhane (Soon et Chiang, 2012).

Il est établi que leur teneur est relativement faible par rapport à la teneur des extractibles hydrophiles dans les nœuds d'épicéa et de sapin, et regroupent plusieurs familles de molécules :

a- Les composés terpéniques.

Comprennent les terpènes et terpénoïdes, synthétisés à partir d'unités isoprènes (C_5-H_8)_n, ces composés sont présents chez toutes les plantes, et représentent de loin le groupe le plus vaste avec plus de 22000 composés identifiés (Raven et al., 2000). Cependant, les sources les plus abondantes de ces composés terpéniques sont les conifères. Ils sont parmi les composés majoritaires des résines dont la structure est une répétition d'un nombre varié d'unités isopréniques (C5) (Figure 2) ; ils sont majoritairement hydrophobes.

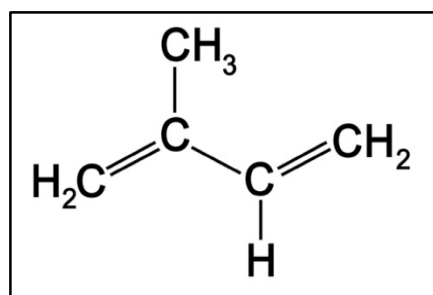


Figure 2. Une unité isoprène

Les terpènes peuvent être subdivisés en différents groupes en fonction du nombre d'unités isoprène qui les constituent. Ainsi, on peut rencontrer des mono, sesqui, di, ses ou triterpènes, constitués respectivement de deux, trois, quatre, cinq ou six unités isoprène. On rencontre également des polyterpènes correspondant à des polymères d'isoprène.

Les résineux renferment de nombreux monoterpènes à 10 atomes de carbone, sesquiterpènes à 3 unités isoprènes, diterpènes à 20 atomes de carbone, des triterpènes à 30 atomes de carbone (tels que les stéroïdes) et des acides terpéniques (Kleinhentz et al., 1999 ;

Arrabal et al., 2002). Par contre chez les feuillus, on rencontre principalement les triterpènes (Raven et al. 2000 ; Krasutsky 2006).

Les terpénoïdes, contrairement aux terpènes, possèdent des groupements fonctionnels oxygénés comme des groupements alcool, éther ou acide carboxylique.

b- Les acides gras.

Un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique. Dans le cas des résineux ce sont des acides gras estérifiés qui dérivent de di- et tri-glycériles, ou d'esters de stéroïdes, représentant de 0,15 à 0,19% de la masse sèche dans les nœuds d'épicéa (Willfor 2003b). Chez les résineux, on relève plusieurs acides gras comme l'acide linoléique et l'acide stéarique (Figure 3)

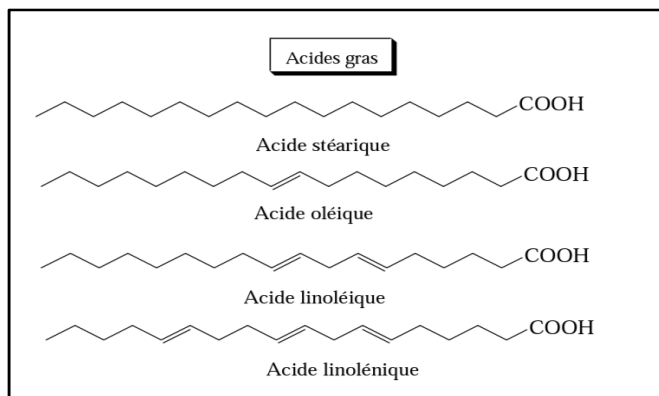


Figure 3. Principaux acides gras retrouvés dans le bois

I-1-2- Les extractibles hydrophiles.

Ils comprennent majoritairement les composés phénoliques qui se regroupent selon plusieurs familles chimiques telles que les lignanes, les flavonoïdes et les stilbènes (Figure 4), Ils sont extraits avec des solvants polaires comme l'acétone, l'eau ou l'éthanol.

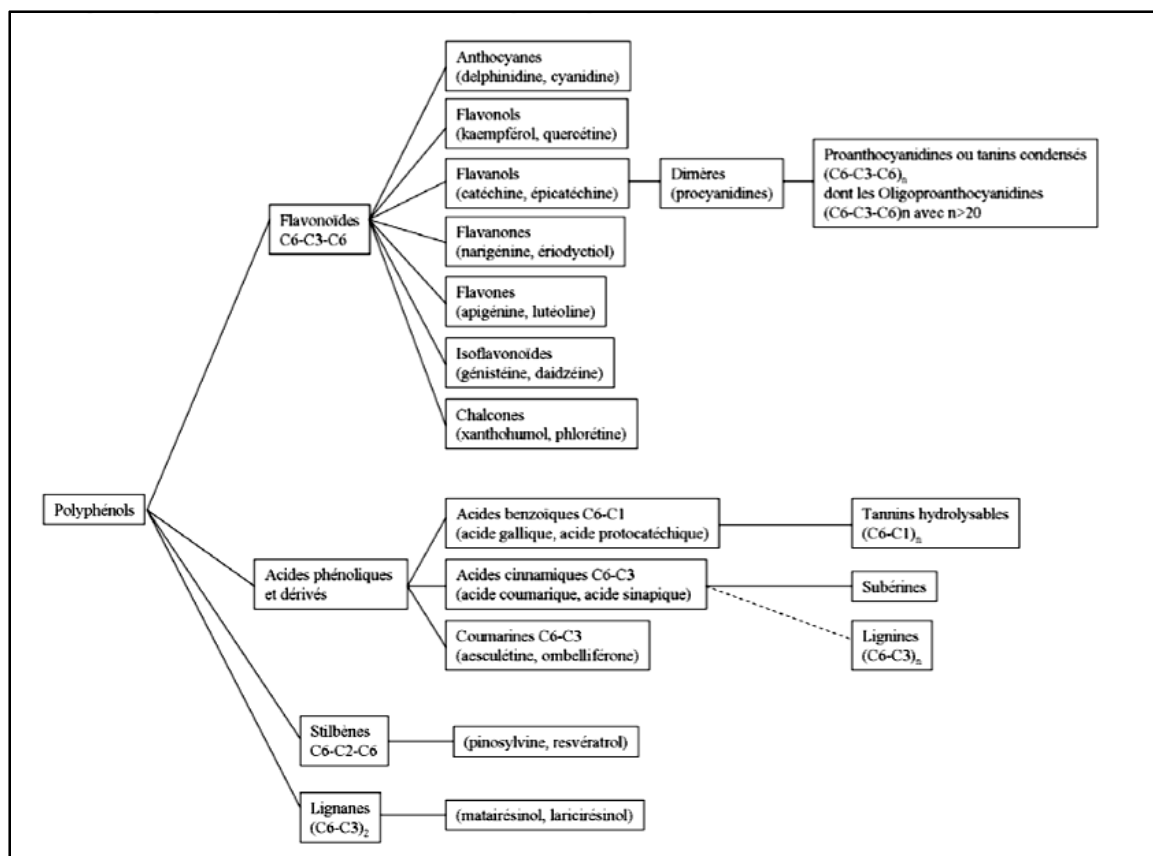


Figure 4. Les grandes familles de polyphénols (Collin et al. 2011).

a- Les lignanes.

Les lignanes sont des composés formés à partir d'unités phénylpropanes, liées entre elles par différentes liaisons résultants de couplages oxydatifs. (Figure 5). Ces molécules peuvent être présentes en grande quantité au niveau des nœuds de certains résineux (Holmbom et al. 2003 ; Willför et al. 2004c ; 2005).

Chez certaines espèces telles que l'épicéa, les lignanes peuvent représenter jusqu'à 25% de la masse sèche des nœuds alors que le bois normal n'en contient en moyenne que 1% (Willför et al. 2006). De manière générale, la concentration en lignanes est souvent plus significative dans les nœuds des branches sujettes à des sollicitations mécaniques et aux charges dues aux conditions du milieu (neige, pluie et vent...) (Piispanen et al. 2008).

Les lignanes constituent une famille de composés très étudiée pour leur intérêt dans divers domaines comme les domaines pharmaceutiques et agroalimentaire à cause de leurs effets phytoestrogènes (Hooper et Cassidy, 2006 ; Lainé et al. 2007 ; Martins et al. 2011). Outre ces intérêts, les lignanes possèdent également des propriétés antioxydantes (Lee et al., 2004 ; Zeng et al. 2014). D'autres lignanes sont dotés de propriétés antifongiques (Kawamura et al., 2004 ; Céspedes et al. 2006).

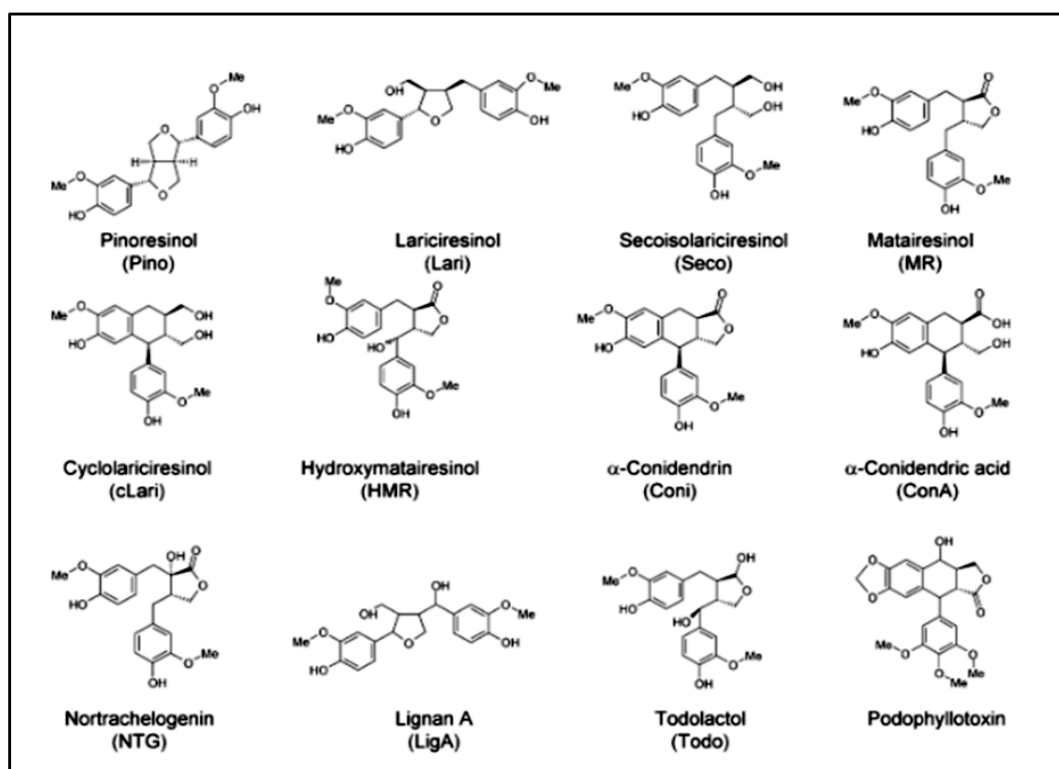


Figure 5. Structures de quelques lignanes rencontrés chez les arbres.

b- Les flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux, synthétisés à partir de la phénylalanine. Ils sont omniprésents dans les cellules des plantes vertes (Yang et Jaakkola, 2012). Ils représentent le plus grand groupe de composés phénoliques présents chez les végétaux (Raven et al. 2000). Une des fonctions incontestée des flavonoïdes est leur rôle dans la protection des plantes contre des attaques microbiennes et des herbivores. Ils peuvent aussi s'accumuler comme phytoalexines en réponse aux attaques microbiennes (Harborne et Williams, 2000 ; Arima et al. 2002 ; Välimaa et al. 2007). Ainsi, certains flavonoïdes tel que la catéchine et ses dérivés présentent des propriétés antibactériennes (Veluri et al. 2004) ; d'autres tels que la

biochanine A et l'apigénine présentent des propriétés anti termites (Srivasatava et al. 2011). D'autres molécules appartenant à la famille des flavonoïdes sont impliquées dans la coloration du bois, ces dernières sont également utilisées dans l'industrie textile (Dweck, 2002).

Les flavonoïdes peuvent également être synthétisés suite à un stress abiotique tel que le stress salin, une forte exposition aux UV ou à l'ozone.

Les diverses propriétés biologiques attribuées aux flavonoïdes ont pour origine les variations de structure chimique (Hooper et Cassidy, 2006). Ainsi, certains flavonoïdes tel que la catéchine et ses dérivés, présentent des propriétés antibactériennes (Veluri et al. 2004) ; d'autres tel que la biochanine A et l'apigénine présentent des propriétés anti termites (Srivasatava et al. 2011). D'autres molécules appartenant à la famille des flavonoïdes sont impliquées dans la coloration du bois, ces dernières sont également utilisées dans l'industrie textile (Dweck, 2002).

Bien d'autres propriétés des flavonoïdes sont connues et c'est pour ces raisons qu'ils sont utilisés dans le domaine médical, pharmacologique, nutritionnel, cosmétique et autre.

c- Les stilbènes.

Les stilbènes sont des composés phénoliques formés à partir de l'acide hydroxycinnamique. Ils sont présents chez les résineux comme chez les feuillus.

Cette famille de molécules possède des propriétés antioxydantes (Välímäa et al. 2007) ; antifongiques (Karppanen et al. 2007), pharmacologiques et thérapeutiques (Parage, 2013).

Les stilbènes se retrouvent en grandes quantités dans les nœuds. Ainsi la teneur en stilbènes extractibles dans les nœuds de jeunes *Pinus sylvestris* peut atteindre 200 fois celle du bois. Cette différence tend à diminuer avec l'âge, puisque les nœuds de *Pinus sylvestris* ne contiennent plus que de 2 à 7 fois le contenu en stilbènes extractibles du duramen (Willför et al. 2003).

I-2- Les rôles des extractibles.

Les extractibles, souvent appelés métabolites secondaires, sont des molécules bioactives dont la diversité de leurs structures chimiques confère à l'arbre une meilleure résistance aux contraintes environnementales et aux sollicitations biotiques et abiotiques auxquelles il est soumis, telles que l'activité antioxydante (Willför et al. 2003a ; 2003b ; 2003c, Burda et Oleszek 2001), résistance au pathogènes (Bergström et al. 1999; Schultz and Nicholas 2000; Venäläinen et al. 2003 ; Välímäa et al. 2007 ; Imai et al. 2013). Ces activités sont étroitement liées. Ainsi, le rôle de défense joué par les phénols est lié à leur caractère antioxydant que leur confèrent les anneaux phényles qu'ils contiennent.

Les polyphénols ont des propriétés biocides, capteurs de radicaux libres et chélateurs de métaux. Le captage des radicaux est important car les champignons se servent de radicaux pour perturber la paroi cellulaire (Pietarinen et al. 2006a).

Des études récentes ont montré la corrélation entre la composition du bois en polyphénols et la résistance de l'arbre à certains pathogènes (McPherson et al. 2014).

Plusieurs essais ont été menés pour évaluer le caractère antioxydant des extractibles des nœuds d'arbres (feuillus et résineux). Le pouvoir antioxydant est testé par la capacité des polyphénols à inhiber l'oxydation des lipides. Leur capacité à capter les radicaux libres est vérifiée par le nombre de radicaux captés par un gramme d'extrait testé (Pietarinen et al. 2006a ; Willför et al. 2003a ; 2003c).

De manière générale, le complexe que représente les extractibles de nœuds est plus efficace que les composés purs. Une étude révèle que les extractibles des nœuds d'*Acacia crassicaarpa* sont de puissants antioxydants (Pietarinen et al. 2005). Cependant à l'intérieur d'une même espèce, les extractibles n'ont pas les mêmes pouvoirs antioxydant. C'est le cas des pins ; *Pinus strobus* est très faiblement antioxydant par rapport aux *Pinus sylvestris*, *P. banksiana* et *P. resinosa*. Chez ces essences, les lignanes sont particulièrement antioxydants, de même que certains flavonoïdes (Pietarinen et al. 2006b).

Des études ont mis en lumière le rôle antibactérien des extraits de nœuds de pins (Välímää et al. 2007 ; Lindberg et al. 2004). Ce pouvoir est attribué à la pinosylvine contenue particulièrement dans ces extraits et ceci est confirmé par son efficacité lorsqu'elle est testée seule en tant que composé pur. Les extractibles de nœuds de pins se sont aussi révélés toxiques. Seul le flavonoïde pinocembrine a un effet antibactérien mais pas cytotoxique (Välímää et al. 2007), alors qu'il a été présenté comme un composé très peu antioxydant (Neacsu et al. 2007).

Dans tous les cas, les flavonoïdes glycosides (un motif de type sucre est attaché à la molécule) se révèlent moins antioxydants comparativement aux flavonoïdes aglycones (sans motif de type sucre). Les flavonoïdes retrouvés dans les nœuds sont majoritairement sous forme aglycone, excepté dans ceux du peuplier (Neacsu et al. 2007 ; Pietarinen et al. 2006b) ; et du saule (Pohjamo et al. 2003).

Les lignanes ne semblent pas être des antibactériens mais de très bons antioxydants et capteurs de radicaux (Pietarinen et al. 2006a ; Willför et al. 2003 ; Lindberg et al. 2004).

I-3- Contexte et objectifs du stage.

Des études ont montré que les nœuds possèdent une forte teneur en composés phénoliques notamment les lignanes pouvant représenter jusqu'à 24 % des extractibles contenus dans les nœuds, ce qui équivaut de 20 à 50 fois plus que le bois les entourant (Willför et al., 2004a ; 2004b).

Ainsi les nœuds d'épicéa commun, pin sylvestre et sapin contiennent des concentrations exceptionnellement élevées d'extractibles, de l'ordre de 10 à 15% en masse, bien supérieures aux concentrations présentes dans le bois autour des nœuds (Willför et al. 2004a). Le fait que le bois des nœuds contienne des concentrations plus fortes que le bois autour a été confirmé pour un certain nombre de résineux (Willför et al. 2003b) et de feuillus (Pohjamo et al. 2003, Pietarinen et al. 2006).

Une première généralisation de cette observation a été testée pour une gamme étendue d'espèces appartenant à la ressource du Nord-Est de la France dans le cadre de la première année de thèse de Mme Z. Kebbi-Benkeder profitant d'un contrat CJS de l'INRA. L'observation a bien été confirmée. Pourtant les différences de concentration entre les nœuds, le duramen et l'aubier du tronc sont apparues bien plus faibles pour les feuillus que pour les résineux (Kebbi-Benkeder, 2013).

D'autre part, les nœuds prélevés sur les résineux (Epicéa, sapin, pin sylvestre, Douglas et mélèze) présentaient des taux d'extraits au dichlorométhane plus élevés alors que les nœuds prélevés sur les feuillus (chêne, robinier, aulne, merisier, frêne, hêtre et charme) présentaient des taux d'extraits à l'eau plus importants.

Un autre résultat remarquable a été le profil chimique des nœuds du Mélèze. En effet, ce résineux caduque possédait des taux d'extraits au dichlorométhane particulièrement faibles, en comparaison avec les autres résineux, alors qu'il avait des extraits aqueux très élevés comparables à ceux des feuillus.

Les objectifs de ce stage sont de compléter l'analyse de la biodiversité des extractibles nodaux, du duramen et de l'aubier des essences forestières sélectionnées, de quantifier les taux d'extractibles ainsi que des composés présents après identification, permettant d'avancer des hypothèses sur ces extractibles (rôles, profil intra-arbre des concentrations, différences intra arbre et interspécifiques...)

Les hypothèses émises pour cette étude sont les suivantes :

- 1- Les nœuds contiennent plus d'extraits que le duramen et l'aubier.
- 2- Il existe des différences entre les taux d'extraits nodaux des feuillus et des résineux.
- 3- Un profil vertical intra-arbre caractérise les extraits nodaux.
- 4- Existe-t-il des différences en termes de quantité et de nature d'extraits entre résineux caduques et résineux persistants, et entre feuillus caduques et feuillus persistants ?
- 5- Les molécules identifiées diffèrent entre les essences exploitées, et entre les différentes parties analysées au sein d'un même arbre.

II - Matériels et méthodes.

II-1- Matériel végétal.

Pour mettre en avant la variabilité inter espèces, nous avons sélectionné 11 individus représentant chacun une espèce. Des espèces à intérêt économique : pin maritime, noyer, châtaigner, if et cèdre de l'Atlas. Des espèces de résineux caduques : cyprès chauve, metasequoia et ginkgo biloba. Et des espèces de feuillus persistants : chêne vert, buis et houx.

Les arbres sélectionnés ont été abattus en période hivernale 2014 (Tableau 1 en annexe 1), des mesures ont été prises lors de l'abatage (hauteur des nœuds et diamètre des rondelles)

Les nœuds à prélever ont été sélectionnés.

Afin d'en déterminer l'âge, une rondelle de souche de chaque arbre a été découpée (exemple en Figure 6).

Une autre rondelle a été également découpée à 1,3m de hauteur sur chaque arbre afin d'y prélever du bois de duramen et d'aubier afin de comparer les concentrations d'extractibles avec le bois de nœuds.

D'autres rondelles ont été prélevées selon la hauteur et le type de nœud : nœuds morts, nœuds vivants du bas, du milieu et nœuds jeunes (en haut de l'arbre), ceci afin d'établir un profil intra arbre des extractibles nodaux.

A l'aide de gouges, du bois a été prélevé des nœuds sélectionnés (Figure 7), les bois de duramen et d'aubier ont été prélevés par sciage. Les différents échantillons ont été séchés à l'étuve pendant 24h à 50°C.



Figure 6. Rondelle de souche de l'if



Figure 7. Prélèvement d'un nœud.

Après séchage, les différents échantillons ont été broyés (Figure 8), les poudres obtenues ont été mises dans des piluliers en verre et conservées au congélateur jusqu'à extraction.



Figure 8. Appareil de broyage (à gauche) et bol de broyage contenant les morceaux de nœuds prélevés.

II-2- Matériel au laboratoire.

Pour obtenir les extractibles contenus dans les poudres de bois (Aubier, duramen, nœuds morts, nœuds vivants du bas, du milieu et nœuds jeunes), j'ai effectué différentes extractions au Soxhlet. Cette méthode est assez simple, elle permet de répéter plusieurs fois le cycle d'extraction avec un solvant jusqu'à épuisement total du soluté dans la matière première (poudre).

Le Soxhlet est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre (cellulose) épais et pénétrable pour le solvant, d'un tube siphon et d'un tube de distillation. (Figure 9)

L'extracteur est relié à un ballon contenant le solvant d'extraction et à un réfrigérant. Le ballon est chauffé pour faire bouillir son contenu, les vapeurs remontent via le tube de distillation et se condensent au niveau du réfrigérant. Le solvant sous forme de liquide retombe dans le corps du Soxhlet et remplit la cartouche contenant la poudre à extraire. La poudre macérée dans le solvant est extraite jusqu'à remplissage complet et siphonage du corps de l'extracteur.

Lors du siphonage, le solvant emporte les extractibles et un nouveau cycle recommence.

Etant donnée que la température d'ébullition du solvant est plus faible que celle des extractibles,

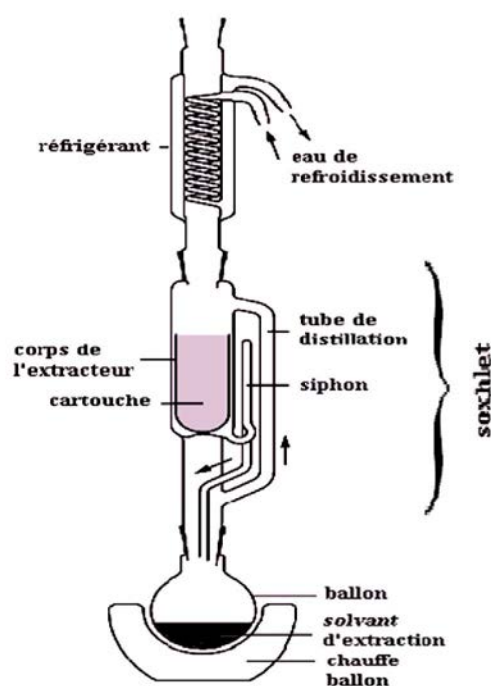


Figure 9. Schéma d'un montage Soxhlet.

ces derniers restent et s'accumulent dans le ballon pendant que le solvant bout. A la fin de l'extraction, le ballon contenant les extractibles et le solvant est récupéré afin d'éliminer le solvant soit par évaporation, soit par lyophilisation.

II-2-1- Solvants utilisés.

Sur la poudre de chaque échantillon, l'extraction au Soxhlet a été réalisée avec l'utilisation successive de quatre solvants avec des polarités croissantes, respectivement: dichlorométhane, acétone, toluène/éthanol (2/1 (v/v)), et eau (Figure 10)

Les molécules dites lipophiles (résines, acides gras et terpènes) sont extraites au solvant le moins polaire : Le dichlorométhane.

Les solvants plus polaires : acétone, toluène/éthanol et eau servent à extraire des molécules dites hydrophiles (sucres et polyphénols).

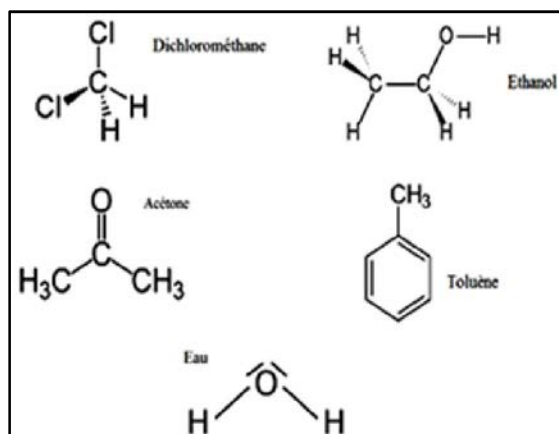


Figure 10. Solvants utilisés

II-2-2- Récupération de l'extrait.

Dans le cas d'une extraction au dichlorométhane, à l'acétone ou au toluène/éthanol, l'élimination du solvant d'extraction est faite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Figure 11).

Cet appareil sert à réaliser l'évaporation du solvant sous vide en utilisant une pompe à vide avec contrôle de la pression. Le ballon est plongé dans un bain d'eau chauffée, il est mis en rotation pendant l'évaporation. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat.

La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide tout en évitant les phénomènes d'ébullition prononcés conduisant à une perte de produit par souillage de l'évaporateur..



Figure 11. Evaporateur rotatif (Rotavapor).

Afin d'éviter une éventuelle dégradation thermique de certains composés, la pression est abaissée afin d'évaporer le solvant à température réduite.

Après évaporation du solvant, les extractibles se retrouvent collés aux parois du ballon, qui est rincé avec un solvant (acétone pour une extraction au dichlorométhane, méthanol pour une extraction faite à l'acétone ou au toluène/éthanol) le contenu est récupéré avec une pipette pasteur et transvasé dans un pilulier en verre. (Figure 12)

La récupération des extractibles contenus dans l'eau est réalisée par lyophilisation. (Figure 13.)



Figure 12. Récupération de l'extrait.



Figure 13. Appareil lyophilisateur.

II-2-3- Quantification.

Une fois les extractions réalisées et les solvants évaporés, le taux d'extractibles contenus dans chaque poudre est obtenu par la différence entre le poids d'un pilulier contenant le mélange d'extractibles et le poids de ce même pilulier pesé préalablement à vide, cette différence est rapportée au poids de la poudre utilisée.

$$\text{Taux d'extractibles (\%)} = \left[\frac{(\text{Masse du pilulier} + \text{extractibles}) - (\text{Masse du pilulier vide})}{\text{Masse de la poudre de bois}} \right] \times 100$$

II-2-4- Techniques analytiques.

a- Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GCMS).

L'identification ainsi que la quantification relative des molécules contenues dans les extraits sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type PERKIN ELMER CLARUS 680, qui permet la séparation des molécules dans le mélange d'extractibles, couplé à un spectromètre de masse PERKIN ELMER SQ8, permettant de détecter, d'identifier et de caractériser les molécules contenues dans le mélange.

La séparation chromatographique est réalisée avec une phase stationnaire DB-5MS (longueur : 30m ; diamètre : 250mm ; épaisseur du film : 0.25µm) avec un programme de four de 40 min, comprenant un palier à 80°C (10 min), puis 190°C (15 min), puis 280°C (10 min), et enfin un palier à 300°C (5 min) et une phase mobile constituée d'Hélium à 1 mL/min

Avant d'injecter les échantillons dans le système GCMS, et afin de stabiliser les molécules pour éviter leur évaporation et faciliter leur détection, chaque échantillon est dérivatisé, c'est-à-dire que les groupes hydroxyles des composés chimiques sont transformés en groupes triméthylsilyle. Cette étape consiste à solubiliser 1 à 3 mg d'extrait dans 50µl de BSTFA (Agent de silylation) dans un pilulier prévu pour GCMS, le pilulier est fermé et placé à l'étuve à 70°C pendant 30 minutes. Le bouchon du pilulier est ensuite ouvert pour permettre l'évaporation du BSTFA. Une fois ce dernier évaporé, nos extraits sont donc silylés, ils sont

ensuite dissous dans 1mL d'acétate d'éthyle, puis 1 μ L de cette dernière solution est injecté en mode splitless dans la GC, via un injecteur chauffé à 250°C.

b- Chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse (LC/MS).

La séparation des extraits a été réalisée par chromatographie liquide en phase inverse couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes et à un spectromètre de masse de type triple quadrupôle de marque Shimadzu LC-MS/MS 8030. La séparation des composés est réalisée sur une colonne Phenomenex Luna 3u C18, thermostatée à 40°C. Les solvants utilisés pour l'élution sont l'eau et l'acétonitrile contenant chacun 0,1% d'acide formique. L'élution est effectuée en mode gradient avec un débit de 0,4mL/min et le volume d'injection de 5,0 μ L. La détection est effectuée en utilisant le détecteur UV à barrettes de diodes utilisant une gamme de détection comprise entre 190 et 800 nm. Les paramètres de détection MS sont : le gaz de nébulisation (N₂) avec un débit 3 L/min, le gaz de séchage avec un débit 15 L/min, le voltage d'interface : 4,5 Kv, la pression du gaz 230 kPa, la CDL température : 250 °C, « block heater temperature » 400°C, gamme m/z 100-2000.

La caractérisation des molécules a été obtenue par comparaison avec la base de données NIST (exemple en figures a et b en annexe. 3) ou bien par comparaison avec des publications.

La chromatographie en phase liquide couplée à spectromètre de masse (LC-MS) a été utilisée afin de confirmer la présence de certaines molécules que nous n'avons pas pu détecter en GC-MS.

III-Résultats.

III-1- Quantification des extraits totaux obtenus après extraction.

Les taux d'extraits correspondant aux différentes parties sélectionnées sur chaque arbre (nœuds, duramen, aubier) sont rassemblés dans le tableau 2 en annexe 2.

Les taux d'extraits moyennés pour tous les nœuds d'une même essence (un arbre) ainsi que ceux des duramens et aubiers des 11 essences échantillonnées sont présentés en Figure 14.

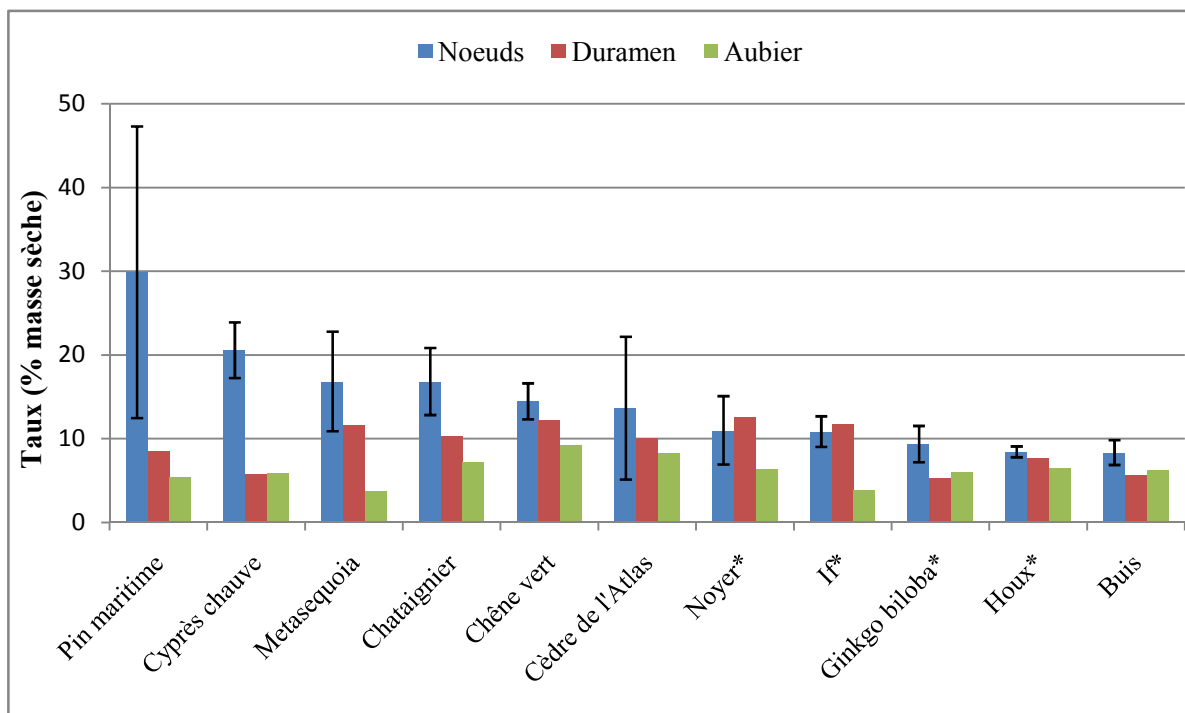


Figure 12. Représentation graphiques des taux d'extraits totaux des 11 essences échantillonnées. (*absence de nœuds morts)

D'une manière générale, ces résultats montrent des taux d'extraits nodaux significativement supérieurs à ceux contenus dans le tronc (aubier et duramen), et ceci dans la plupart des essences. On note cependant les cas de l'if et du noyer qui présentent des taux d'extraits dans les duramens légèrement supérieurs à ceux contenus dans les nœuds.

D'autre part, on relève une forte variabilité des taux d'extraits nodaux au sein d'un même arbre, notamment chez le pin maritime, le cèdre de l'Atlas et le Metasequoia. Par exemple chez le pin maritime, le taux d'extraits nodaux varie de 6.79% de matière sèche dans les nœuds vivants jeunes à 26.32% dans les nœuds vivants du milieu et 45.33% dans les nœuds morts (Tableau 2 en annexe 2).

Les taux d'extraits retrouvés dans les duramens sont compris entre 5 et 10%, tandis que dans les nœuds, les taux moyennés sont moins variables, compris entre 8 et 30%.

En deuxième lieu, on observe que les essences ayant montré les taux d'extraits nodaux les plus élevés sont des résineux et particulièrement le Pin maritime, le Cyprés chauve et le Metasequoia.

Nous notons également chez l'if, le noyer et le houx, des taux d'extraits très proches entre les nœuds et le duramen.

III-2- Taux et nature des extraits selon le solvant utilisé et le type de nœud considéré.

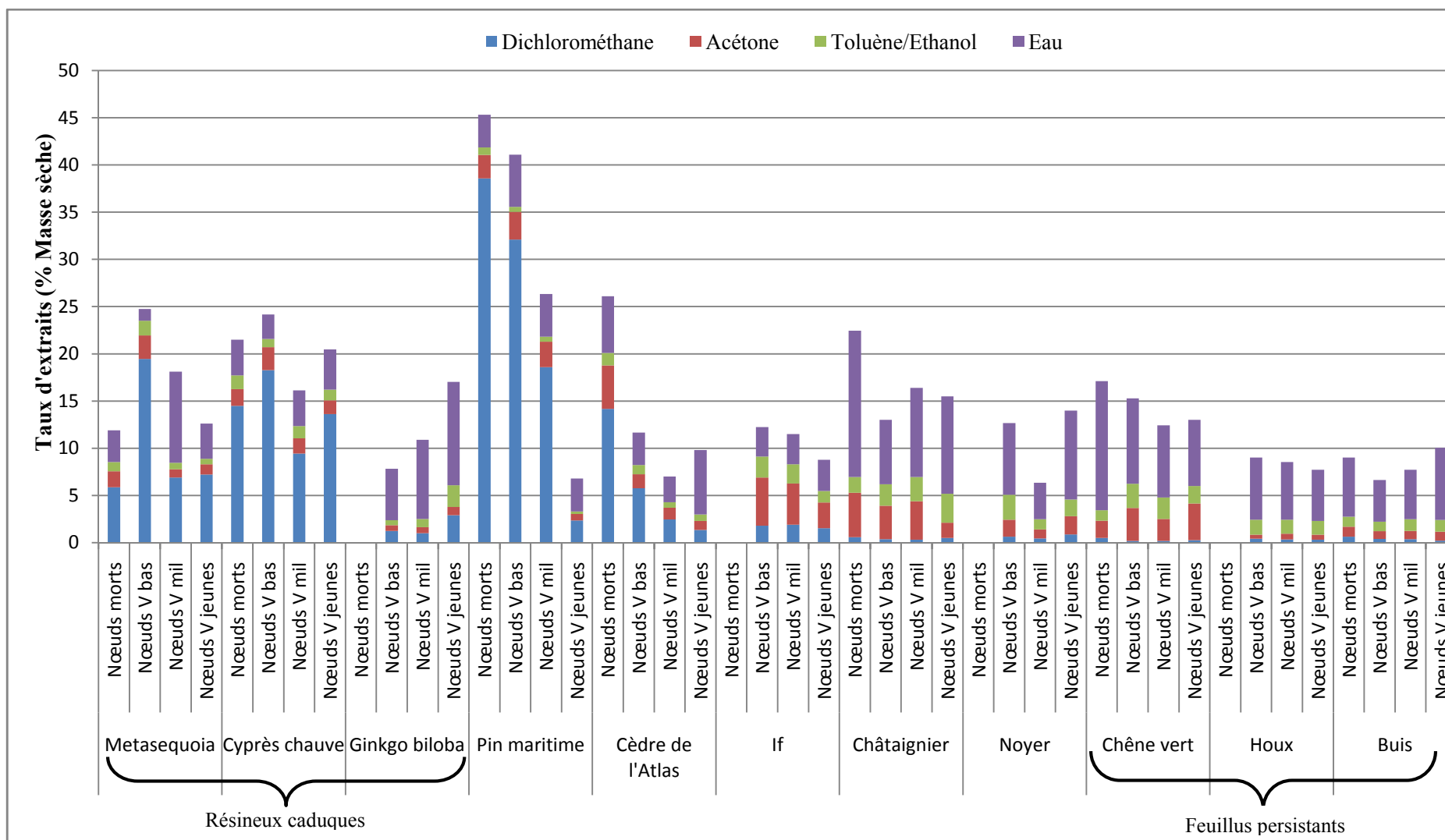


Figure 13. Représentation graphique des taux et de la nature des extraits nodaux des essences échantillonnées.

L'analyse des résultats d'extractions réalisées sur différents types de nœuds de chaque arbre permet de faire des distinctions basées sur des différences de taux et de nature des extraits nodaux. La figure 15 montre des taux d'extraits nodaux au dichlorométhane nettement plus élevés chez les résineux, mis à part les cas du ginkgo où on note un taux élevé d'extraits aqueux, et de l'if où on remarque une dominance de la proportion des extraits acétoniques.

Chez les feuillus, y compris les feuillus persistants, on retrouve un profil assez similaire avec des taux très élevés d'extraits aqueux comparativement aux résineux.

Certaines espèces présentent un profil vertical caractéristique des taux d'extraits nodaux, avec une décroissance des taux d'extrait en allant du bas vers le haut de l'arbre. Ce type de profil a été observé chez le pin maritime, le metasequoia, l'if et le houx. Ce profil est cependant inversé chez d'autres espèces telles que le ginkgo et le buis où on relève les taux d'extrait les plus élevés dans les nœuds vivants jeunes et les taux les plus bas dans les nœuds vivants du bas. Le reste des espèces ne présente aucun profil particulier.

De manière générale, on observe de fortes variabilités inter et intra-arbre des taux d'extraits nodaux.

III-3- Caractérisation des extraits.

L'identification et la quantification relative des molécules présentes dans les extraits au dichlorométhane et les extraits acétoniques ont été réalisées. Pour chaque solvant et pour chaque partie de l'arbre analysée, une liste contenant le nom et le pourcentage relatif de chacune des molécules rencontrées puis classées en familles chimiques a été établie (tableau 2 en annexe 2).

L'analyse de la composition en extractibles des différentes parties analysées sur chaque arbre révèle une grande diversité de molécules. Afin de respecter les consignes de rédaction de ce rapport, nous ne présentons ici que deux exemples d'arbres analysés (un résineux et un feuillus), néanmoins caractéristiques des observations réalisées pour toutes les essences de ce travail: le pin maritime et le chêne vert (Figures 16 et 17). Les familles chimiques majoritairement identifiées dans les extraits au dichlorométhane sont les terpènes, les acides gras, les stérols, les lignanes et les acides résiniques. Dans les extraits acétoniques on retrouve des sucres, des flavonoïdes, des lignanes, de l'acide gallique, des terpènes, des acides gras et des acides résiniques (Tableau 2 en annexe 2).

Le chêne vert est caractérisé principalement par la présence de flavonoïdes (catéchine) dans toutes les parties analysées. Le taux le plus élevé est rencontré dans les nœuds morts (51.97%). Pour les autres feuillus, on relève la présence de flavonoïdes chez le châtaigner et le noyer avec des taux qui varient aussi bien entre les deux espèces qu'entre les différentes parties d'un même arbre.

Les flavonoïdes sont quasiment absents chez les résineux, mis-à-part les cas du cyprès chauve et du cèdre de l'Atlas qui présentent des traces de flavonoïdes dans l'aubier pour le premier et dans le duramen et l'aubier pour le second.

Les lignanes sont absents chez les feuillus, excepté chez le châtaigner où on retrouve des lignanes et également des proportions élevées d'acide gallique.

On observe un profil vertical typique des taux de lignanes contenus dans les extraits nodaux du pin maritime (figure. 16), de l'if et du metasequoia (Tableau.2 annexe. 2). Ce profil est caractérisé par une décroissance en allant de la base (nœuds vivants du milieu) vers le haut du houppier (nœuds vivants jeunes).

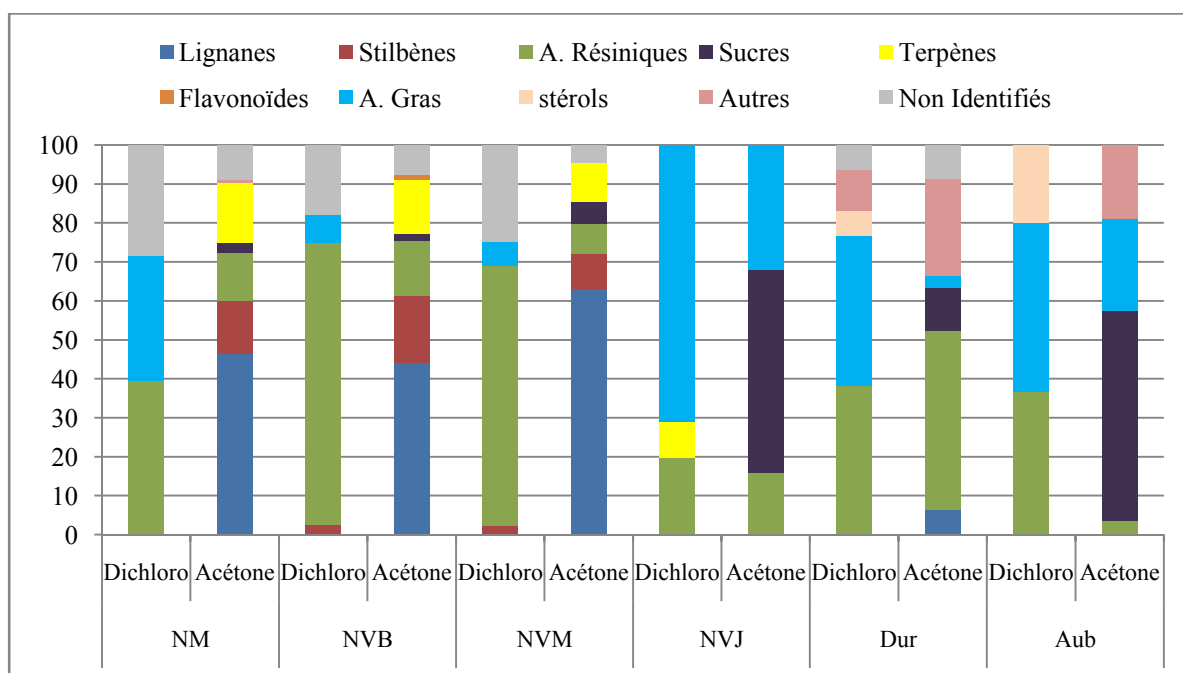


Figure 14. Composition en extractibles du pin maritime. (NM : Nœuds mort ; NVB : Nœuds vivants du bas ; NVM : Nœuds vivants du milieu ; NVJ : Nœuds vivants jeunes ; Dur : Duramen ; Aub : Aubier).

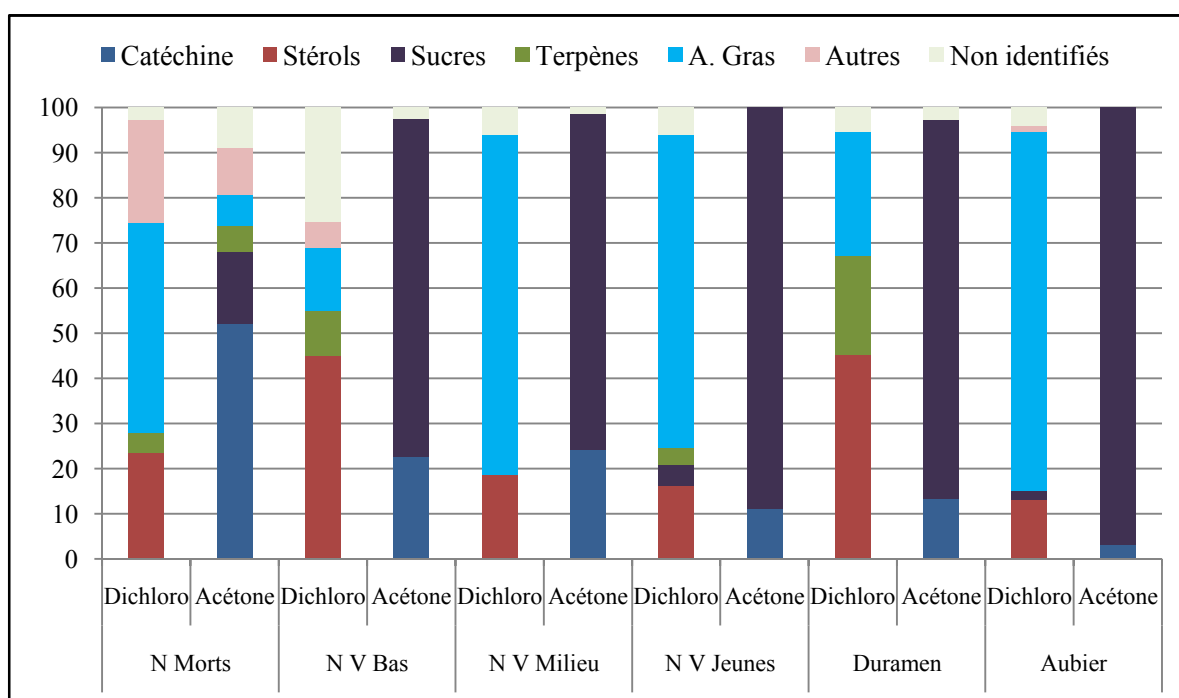


Figure 15. Composition en extractibles du chêne vert.

On note la présence de stilbènes uniquement dans les extraits nodaux du pin maritime.

En outre, il est à signaler que des taux élevés de sucres sont rencontrés dans la quasi-totalité des extraits d'aubiers et de duramens des essences analysées.

IV- Discussion.

Un des premiers objectifs visés à travers cette étude est la quantification des taux d'extraits nodaux comparés à ceux de l'aubier et du duramen sur une large gamme d'essences échantillonnées, afin de vérifier nos hypothèses émises sur les différences de quantités existant entre extraits nodaux et extraits du tronc (duramen et aubier), et entre feuillus et résineux.

Nos résultats montrent des taux d'extraits nodaux significativement supérieurs à ceux du tronc. Des résultats assez similaires ont été obtenus dans diverses études (Kebbi-Benkeder et al. 2013 ; Willför et al. 2003a, b; 2004a, b; Pietarinen et al. 2006b). Cette supériorité est cependant moins marquée chez les feuillus. Ce même constat a été relevé par Kebbi-Benkeder et al. (2013) pour différentes espèces de feuillus et de résineux. Ceci confirme l'hypothèse n° 1.

Les taux élevés des extraits nodaux comparativement à ceux des troncs renseignent sur l'importance du rôle central joué par les nœuds dans la biologie de l'arbre à savoir : le processus de branchaison, la jonction entre branches et tronc pour la conduction de sève, la résistance aux sollicitations mécaniques (vent, pluies et neiges) et aux attaques de pathogènes.

L'exception rencontrée chez le noyer, le houx et l'if, qui présentent des taux d'extraits dans les duramens très proches et parfois supérieurs à ceux des nœuds, pourrait être liée à une probable duraminisation rapide de ces derniers. Ou bien à l'absence de nœuds morts, qui sont généralement très riches en extraits et tendent à augmenter considérablement les taux moyennés d'extraits nodaux.

Les essences ayant montré les taux d'extraits nodaux les plus élevés sont des résineux. Mis-à-part les cas particuliers du chêne et du châtaigner. Ceci confirme les résultats de Kebbi-Benkeder et al. (2013) sur mélèze, pin sylvestre et épicéa. Ces espèces contenaient des taux d'extraits nodaux significativement supérieurs à ceux d'autres espèces de feuillus telles que le robinier, le hêtre et le charme. Le même résultat a été obtenu pour d'autres feuillus tels que le saule et l'acacia (Pohjamo et al. 2003; Pietarinen et al. 2005).

Cependant, il est à noter que les écarts-types des taux d'extraits nodaux moyennés de certaines espèces telles que le pin maritime et le cèdre de l'Atlas (Figure 14) témoignent d'une forte variabilité entre différents nœuds prélevés sur un même arbre.

L'analyse des taux et de la nature des extraits selon le solvant utilisé et le type de nœud considéré a permis de consolider notre hypothèse n°3 émise sur l'existence d'un profil vertical intra-arbre des extraits nodaux, mais pas pour toutes les essences analysées (Figure 15). En effet la figure 15 montre bien une décroissance des taux d'extraits nodaux en allant de la base vers le haut du houppier, les nœuds morts (lorsqu'ils sont présents) et les nœuds vivants du bas contenaient les taux les plus élevés et les nœuds vivants jeunes (vers le haut du houppier) les taux les plus bas. Ce profil vertical n'est cependant retrouvé que chez le pin maritime, le metasequoia, l'if et le houx. On observe même une inversion du profil vertical chez le ginkgo et le buis.

Concernant la nature des extraits nodaux et les proportions des différentes fractions qui les composent, on relève une variabilité interspécifique, mais de manière générale les nœuds des résineux semblent contenir des quantités élevées d'extraits au dichlorométhane correspondant à la fraction lipophile (résines, graisses, ...) alors que ceux des feuillus se distinguent par un taux élevé d'extraits aqueux (Composés phénoliques et sucres) (Figure 15).

Contrairement aux autres espèces de résineux caduques analysées, le ginkgo semble être le seul à avoir un profil similaire aux feuillus et à celui du mélèze (résineux caduque) qui avaient été analysés dans les travaux de Kebbi-Benkeder et al. (2013). Les nœuds de ces deux espèces présentent de fortes proportions d'extraits aqueux (Figure 15).

Concernant les feuillus persistants, ces derniers ne présentent aucun profil particulier, ou de différences notables dans la nature de leurs extraits, qui les distingueraient des autres feuillus. Ceci infirme notre hypothèse n° 4 quant à l'existence d'une différence en quantité et en nature des extraits entre feuillus caduques et feuillus persistants.

L'identification et la quantification relative des molécules présentes dans les extraits au dichlorométhane et les extraits acétoniques nous a permis d'appréhender la diversité moléculaire qui les caractérise et de conforter notre hypothèse n°5. Il existe donc des différences au niveau de la nature des molécules et de leurs quantités aussi bien à l'échelle interspécifique qu'à l'échelle intra-arbre.

En effet, de manière générale, les lignanes semblent caractériser les résineux plutôt que les feuillus, et les taux les plus élevés sont signalés dans les extraits nodaux. Ce résultat confirme celui trouvé par Kebbi-Benkeder et al. (2013).

En outre, on relève chez le pin maritime, l'if et le metasequoia, l'existence d'un profil vertical des taux de lignanes contenus dans les extraits nodaux, ce profil qui se caractérise par une décroissance en allant de la base (nœuds vivants du milieu) vers le haut du houppier (nœuds vivants jeunes). Le même constat a été signalé dans d'autres travaux sur pin maritime (Conde et al. 2014) et sur épicéa (Piispanen et al. 2008).

La présence de taux élevés en lignanes dans les résineux en général et dans les nœuds vivants du milieu en particulier, suggère que les lignanes joueraient un rôle de protection et de renforcement de l'arbre. Cette partie de l'arbre est en effet généralement pourvue de branches longues, particulièrement sollicitées par des contraintes environnementales (ozone, vent, pluies et neige) et les lignanes sont réputés pour leur pouvoir antioxydant (Willför et al. 2003c ; Pietarinen et al. 2006a), ainsi que pour leur rôle dans la lignification et le renforcement des branches (Lewis, 1999 ; Willför et al. 2003b). Par ailleurs, une activité photosynthétique plus élevée dans les branches vivantes du milieu, qui sont plus anciennes, produirait plus d'assimilats disponibles pour la synthèse d'extractibles.

Les stilbènes sont retrouvés uniquement dans les extraits nodaux du pin maritime, un résultat qui concorde avec celui mentionné dans la littérature. Les stilbènes ont été signalés sur pin maritime (Conde et al. 2014), ainsi que sur d'autres espèces de pin, telles que le pin sylvestre (Willför et al. 2003a,b). Leur présence dans nos échantillons comme dans les essences précédemment citées suggère leur rôle dans la défense contre les pathogènes.

Pour ce qui est des flavonoïdes, ces derniers semblent caractériser les feuillus, leur taux est très variable d'une espèce à l'autre (Tableau 2 annexe 2). Le même résultat a été signalé dans des études précédentes sur d'autres espèces de feuillus telles que l'acacia, le peuplier et le hêtre (Pietarinen et al. 2006a ; Kebbi-Benkeder et al. 2013).

Nos résultats montrent une variabilité intra-arbre des taux de flavonoïdes. Ainsi le taux le plus élevé (52% en catéchine) a été retrouvé dans les extraits des nœuds morts du chêne vert. Ceci est à rapprocher du fait que la chute des branches (élagage, neige, vent,...) crée une ouverture propice aux attaques de pathogènes particulièrement les agents fongiques. Ceci expliquerait une synthèse plus accrue en flavonoïdes de défense. Les mêmes constats et interprétations ont été notés dans des études précédentes (Pietarinen et al. 2006b ; Neascu et al. 2007).

On note cependant la présence de traces de catéchine (moins de 2%) dans l'aubier et le duramen du cèdre de l'Atlas et du cyprès chauve. Su et al. (2013) signalent également la présence de flavonoïdes dans le bois du cyprès chauve. Ces molécules sont aussi retrouvées dans le bois du cèdre de l'Himalaya (Willför et al. 2009).

L'acide gallique a été retrouvé dans nos échantillons chez deux espèces de feuillus (châtaigner et chêne vert) avec des taux plus élevés chez le châtaigner où on le retrouve dans

tous les nœuds ainsi que dans le duramen, un résultat conforme à ceux de récentes études sur la même essence (Comandini et al. 2014). Il est à rappeler que l'acide gallique est un tanin hydrolysable, connu pour ses activités antioxydantes (Diouf et al. 2006), antibactériennes et antivirales (Kratz et al. 2008).

Concernant les sucres, ces derniers sont retrouvés dans la totalité des essences analysées. Leur taux est cependant variable d'une essence à une autre et au sein d'un même arbre. Par contre, les taux les plus élevés sont généralement retrouvés dans le tronc (aubier et duramen) ce qui pourrait être expliqué par un éventuel processus de mise en réserve. Il est rappelé que les arbres ont été abattus en fin de période hivernale et donc que les réserves n'étaient pas encore mobilisées et étaient donc encore bien présentes.

V- Conclusion et Perspectives.

Cette étude nous a permis de compléter l'analyse de la biodiversité en extractibles contenus dans les nœuds, les duramens et aubiers des essences forestières exploitées.

Nos analyses montrent globalement la richesse des nœuds en extractibles comparativement aux duramens et aubiers.

On note également que chez les essences issues de forêts tempérées (toutes les essences mis à part le ginkgo et le metasequoia), les résineux sont plus riches en extraits que les feuillus sauf pour les cas particuliers du chêne vert et du châtaigner qu'on retrouve intercalés entre des essences de résineux.

Grâce à l'analyse des taux et de la nature des extraits selon le solvant utilisé et le type de nœud considéré, nous avons pu confirmer l'existence de fortes variabilités, tant en quantité qu'en nature des extraits, entre les différentes essences et même au sein d'un même arbre.

Par ailleurs, nous avons pu relever l'existence d'un profil vertical intra-arbre caractérisé par une décroissance des taux d'extraits nodaux en allant de la base vers le haut du houppier, et ceci chez le pin maritime, l'if, le metasequoia et le houx.

Les nœuds des résineux se distinguent par leur forte proportion d'extraits lipophiles (résines, graisses) tandis que ceux des feuillus se distinguent par de fortes proportions d'extraits aqueux (composés phénoliques et sucres).

Cependant nos analyses ne nous ont pas permis de mettre en lumière une relation directe entre les extractibles et le chute des feuilles.

L'identification et la quantification relative des molécules présentes dans les extraits analysés a permis de faire des distinctions entre les différentes essences et entre les nœuds et le tronc de chaque arbre, tant en quantités qu'en nature des molécules présentes dans chaque extraits. Ainsi nous avons pu confirmer la présence de lignanes principalement chez les résineux et de flavonoïdes principalement chez les feuillus.

De manière générale, nos résultats permettent de mettre en avant la particularité anatomique mais surtout chimique des nœuds.

Certains arbres tels que le noyer, l'if et le houx présentent des taux d'extraits dans les duramens très proches et parfois supérieurs à ceux des nœuds, il serait intéressant de mener des analyses plus poussées sur ces essences afin de connaître l'origine et l'intérêt de ce profil caractéristique.

Afin de confirmer les différences (en quantités et en nature des extractibles) entre essences et de généraliser nos observations, il serait intéressant de mener d'autres investigations sur d'autres essences de feuillus et de résineux.

Des tests enzymatiques ont été lancés dans le cadre de ce stage afin de voir l'effet des extraits sur l'activité de certaines enzymes telles que les laccases et les pectinases. Il serait appréciable de poursuivre ces tests et de réaliser d'autres tests biologiques afin de mettre en lumière les rôles des extractibles dans la défense de l'arbre (antifongique, antibactérien, antioxydant...)

Aussi, des études pourraient être conduites afin d'appréhender la localisation et le processus de synthèse des molécules extractibles au cours de la croissance de l'arbre.

Références bibliographiques.

Arima, H., Ashida, H., Danno, G. (2002). Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 66 :1009-1014

Arrabal, C., Cortijo, M., Fernandez de Simon, B., Concepcion Garcia-Vallejo, M., Cadahia, E (2002). *Pinus pinaster* Oleoresin in Plus Trees. *Holzforschung*. 56 : 261-266

Bergström, B., Gustafsson, G., Gref, R., and Ericsson, A. (1999). Seasonal changes of pinosylin distribution in the sapwood/ heartwood boundary of *Pinus sylvestris*. *Trees* (Berlin), 14:65-71.

Burda S. and Oleszek W. (2001), Antioxidant and anti-radical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2774-2779.

Céspedes, CL., Avila, JG., García, AM., Becerra, J., Flores C., Aqueveque, P., Bittner, M., Hoeneisen, M., Martinez, M., Silva, M. (2006). Antifungal and antibacterial activities of *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch heartwood lignans. *Journal Of Biosciences*. 61 : 35-43.

Charrier, B. Les discolorations brunes du chêne apparaissant pendant le séchage artificiel: Etude fondamentale et mise en place de techniques de prévention, Thèse de 3^e cycle, Institut National Polytechnique de Lorraine. (1992).

Collin, S, Counet, C, Callemien, D, Jerkovic, V. (2011). Polyphénols et procédés. Lavoisier, Paris, France, p 337.

Comandini, P., Lerma-Garcia, J.M, Simo-Alfonzo, E.F. and Toschi, T.G. (2014). Tannin analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC-DAD-MS. *Food Chemistry*. 157 : 290-295.

Conde, E., Fang, W., Hemming, J., Willför, S., Dominguez, H et Parajo, J.C. (2014). Recovery of bioactive compounds from *Pinus pinaster* wood by consecutive extraction stages. *Wood. Sci. Technol.* 48 : 311-323.

Diouf, P.N., Merlin, A., Perrin, D. (2006). Antioxidant properties of wood extracts and colour stability of woods. *Ann. For. Sci.* 63 : 525-534.

Dweck, A. (2002). Natural ingredients for colouring and styling. *International Journal of Cosmetic Science*. 24 : 287-302

Guinard, D. (2009). La filière bois en Europe et dans le monde. *Responsabilité et environnement*, 53:49-56

Harborne, J.B., Williams, C. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* 55: 481-504.

- Holmbom, B., Hemming, J., Willför, S., Reunanen, M., Nisula, L., Eckerman, C. (2003). Phenolic bioactive substances in wood and knots of different spruce and fir species. 12th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, I: 341-344, University of Wisconsin-Madison.
- Hooper, L. et Cassidy, A. (2006). A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 : 1805-1813.
- Imai, K., Yamauchi, K., Mitsunaga, T. (2013). Extractives of *Quercus crispula* sapwood infected by the pathogenic fungus *Raffaella quercivora* II : isolation and identification of phenolic compounds from infected sapwood. *Journal of Wood Science*. 59 : 517-521.
- Karppanen, O., Venäläinen, M., Harju, A.M., Willför, S., Pietarinen, S., Laakso, T.; Kainulainen, P. (2007). Knotwood as a window to the indirect measurement of the decay resistance of Scots pine heartwood. *Holzforschung*. 61: 600-604.
- Kawamura, F., Ohara, S., Nishida, A. (2004). Antifungal activity of constituents from the heartwood of *Gmelina arborea*: Part 1. Sensitive antifungal assay against Basidiomycetes. *Holzforschung*. 58 : 189–192.
- Kebbi – Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S., Gérardin, P. (2013). Secondary metabolites in the knots of different tree species. *Présentation Colloque international WoodChem Nancy*, 26-27 septembre.
- Kleinhentz, M., Jactel, H., Menassieu, P. (1999). Terpene attractant candidates of *Dioryctria sylvestrella* in maritime pine (*Pinus pinaster*) oleoresin, needles, liber and headspace samples. *Journal of Chemical Ecology*. 25 : 2741-2756.
- Krasutsky, P. (2006). Birch bark research and development. *Natural product reports*. 23 : 919-942.
- Kratz, J.M., Andrighetti-Fröhner, C.R., Leal, P.C., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Trybala, E., Bergström, T., Barardi, C.R., Simões, C.M. (2008). Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 903-7.
- Lainé, E., Hano, C. et Lamblin, F. (2007). Les lignanes phytoestrogènes du lin, sont-ils des bienfaiteurs méconnus ? *Phytothérapie*. 5 : 121-128.
- Lee, K. H., Wi, S. G., Adya, P., Kim, S. Y. S. (2004). Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Journal of Wood Sciences*. 50: 281–284.
- Lewis, N.G. (1999). A 20th century roller coaster ride: a short account of lignification. *Current Opinion in Plant Biology*. 2 : 153-162.
- Lindberg, L. E., Willför, S. M., and Holmbom, B. R. (2004). Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 31 : 137–147.
- Martins, S., Mussato, S.I., Martinez-Avila, G., Montanez-Saenz, J., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid- state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. 29 : 365-373.

- McPherson, B.A., Mori, S.R., Opiyo, S.O., Conrad, A.O., Wood, D.L. (2014). Association between resistance to an introduced invasive pathogen and phenolic compounds that may serve as biomarkers in native oaks. *Forest Ecology and Management*. 312 : 154-160.
- Neacsu, M., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Pietarinen, S. P., Ahotupa, M. O., Holmbom, B. R., and Willför, S. M. (2007). Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *European Journal of Wood and Wood Products*. 65: 1–6.
- Parage Claire. (2013). *Génomique fonctionnelle de la biosynthèse des stilbènes chez la vigne*. Thèse de doctorat. Université d'Alsace. 201 p.
- Pietarinen, S. P., Willför, S. M., Sjöholm, R.E., and Holmbom, B. R. (2005). Bioactive phenolic substances in important tree species. Part3 : Knots and stemwood of *Acacia crassicarpa* and *A. mangium*. *Holzforschung*. 59 : 94-101.
- Pietarinen, S. P., Willför, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., and Holmbom, B. R. (2006a). Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *Journal of wood science*, 52 : 436–444.
- Pietarinen, S. P., Willför, S. M., Vikström, F. A., and Holmbom, B. R. (2006b). Aspen knots, a rich source of flavonoids. *Journal of wood chemistry and technology*. 26 : 245–258.
- Piispanen, R., Willför, S., Saranpaa, P., Holmbom, B. (2008). Variation of lignans in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) knotwood: within-stem variation and the effect of fertilisation at two experimental sites in Finland. *Trees*. 22 (3):317-328.
- Pohjamo, S. P., Hemming, J. E., Willför, S. M., Reunanen, M. H. T., and Holmbom, B. R. (2003). Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. *Phytochemistry*. 63 : 165–169.
- Raven, P., Ray, F. E., Susan, E. E. (2000). *Biologie végétale*. Editions De Boeck Université. 944 Pages.
- Schultz, T.P., and Nicholas, D. D. (2000). Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, 54: 47 –52
- Soon, L. K., and Chiang, L.K. (2012). Influence of Different Extraction Solvents on Lipophilic Extractives of *Acacia* Hybrid in Different Wood Portions. *Asian Journal of Applied Science*. 5: 107-116.
- Srivasatava, N., Shwarupa, S., et Bhagyawant, S.S. (2011). Comparative Study On the Anti-Termite, Antimicrobial And Antioxidant Activity Of Leaf And Root Extracts Of *Pothos Aurea* (*Epipremnum aureum* L.). (2) :1-11.
- Su, Z., Yuan, W., Wang, P., Li, S. (2013). Ethnobotany, Phytochemistry, and Biological Activities of *Taxodium* Rich. *Pharmaceutical Crops*. 4 : 1-11.
- Välimaa, A. L., Honkalampi-Hämäläinen, U., Pietarinen, S., Willför, S., Holmbom, B., and von Wright, A. (2007). Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International journal of food microbiology*. 115 : 235–243.
- Veluri, R., Weir, T. L., Bais, H. P., Stermitz, F. R., Vivanco, J. M. (2004). Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 :1077-1082.

- Venäläinen, M., Harju, A.M., Kainulainen, P., Viitanen, H., and Nikulainen, H. (2003). Variation in decay resistance and its relationship with other wood characteristics in old Scots pines. *Ann. For. Sci.* 60: 409–417.
- Willför, S., Hemming, J., Reunanen, M. & Holmbom, B. (2003). Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stemwood. *Holzforschung* 57, 359-372.
- Willför, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., Reunanen, M. H. T., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Eckerman, C. S. E., Pohjamo, S. P., and Holmbom, B. R. (2003a). Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51 :7600–7606.
- Willför, S., Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C. & Holmbom, B. (2003b). Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung* 57, 27-36
- Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Reunanen, M.H.T., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Eckerman, C.S.E., Pohjamo, S.P., Holmbom, B.R. (2003c). Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *J Agric Food Chem* 51:7600–7606.
- Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M. & Holmbom, B. (2004a). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1 : Knots and heartwood of different spruce species. *Holzforschung*. 58:335–344.
- Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M. & Holmbom, B. (2004b). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2: Knots and stemwood of fir species. *Holzforschung*. 58 : 650-659.
- Willför, S.M., Reunanen, M., Eklund, P., Sjöholm, R., Kronberg, L., Fardim, P., Pietarinen, S., Holmbom, B. (2004c). Oligolignans in Norway spruce and Scots pine knots and Norway spruce heartwood. *Holzforschung*. 58:345–354.
- Willför, S.M., Eklund, P., Sjöholm, R., Reunanen, M., Sillanpää, R., Von Schoultz, S., Hemming, J., Nisula, L., Holmbom, B.R. (2005). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 4 : Identification of two new 7-hydroxy divanillyl butyrolactol lignans in some spruce, fir, and pine species. *Holzforschung*. 59:413–417.
- Willför, S. M., Smeds, A. I. & Holmbom, B. R. (2006). Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography*. 1112 : 64-77.
- Willför, SM., Ali, M., Karonen, M., Reunanen, M., Arfan, M., Harlamow, R. (2009). Extractives in bark of different conifer species growing in Pakistan. *Holzforschung*. 63 : 551-558.
- Yang, G., Jaakkola, P. (2012). Extractives with Antimicrobial Properties from Scots Pine. BIOTULI Project. Saimaa University of Applied Sciences. 18p.
- Zeng, X. L., Fu, G. M., Tian, K., Sun, J. X., Xiong, H. B., Huang, X. Z. et Jiang, Z. Y. (2014). Acutissimanide, a new lignan with antioxidant activity isolated from the bark of *Quercus acutissima* Carruth. *Natural Product Research*. 1 : 1-7.

Annexe 1 :

Tableau 1. Tableau des données sur les essences échantillonnées.

| | Ginkgo | Cèdre | If | Cyprés | Metasequoia | Noyer | Châtaignier | Houx | Chêne vert | Buis | Pin maritime |
|---------------------------------------|---|--------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------|--------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------|
| Provenance | Pépinières Adam et Fils, Laneuvelotte (Nancy) | | | | | | ONF de Schirmeck, Saverne | IRSTEA (Aix-En-Provence) | ONF Lons-Le-Saunier | INRA Orléans | |
| Date abattage | 03 et 04/02/2014 | | | | | | 12/02/2014 | 13/02/2014 | 27/02/2014 | 11/03/2014 | |
| âge | 43 | 24 | 41 | 39 | 35 | 41 | 18 | 73 | 46 | 134 | 36 |
| Hauteur totale (m) | 5,77 | 8,6 | 5,6 | 6,93 | 12 | 8,3 | 14,4 | 15,3 | 7,1 | 7,5 | 14 |
| Circonférence (mm) | 256 | 452 | 395/249/ 262 | 509 | 699 | 577 | 775 | 707 | 576 | 359 | 940 |
| Diamètre (mm) | 81,52 | 143,94 | 125,79 | 162,10 | 222,61 | 183,75 | 246,81 | 225,15 | 183,43 | 114,33 | 299,36 |
| Hauteur 1ère Branche verte (m) | 2 | 0,98 | 0,2 | 1,48 | 1,02 | 1,95 | 1,27 | 2,28 | 1,2 | 1,88 | 3,7 |
| Date échantillonnage des nœuds | 05/02/2014 | | 06/02/ 2014 | 05/02/ 2014 | 04/02/ 2014 | 05/02/ 2014 | 12/02/2014 | | 17/02/2014 | 27/02/2014 | 14/03/2014 |
| Nœuds vivants bas (m) | 2,10 et 2,22 | 1,70 / 2 / 2,70 | 0,8 | 0,9 | 1,2 et 1,47 | 1,9 | 1,30 et 2,25 | 2, et 3,23 | 1,2 / 1,60 / 2,05 et 2,11 | 1,88 / 2,70 / 3,25 / 3,40 | 1,30 / 3,70 / 5,50 |
| Nœuds vivants du milieu (m) | 3,2 et 3,9 | 4,1 | 2,9 | 3 | 6 | 3,7 | 7,2 | 6,2 | 3,21 / 3,47 / 3,81 | 3,90 / 4,10 / 4,50 / 4,80 | 10,2 |
| Nœuds vivants jeunes (m) | | 5,5 | 3,7 / 4,7 | | 7,8 | 6 / 6,30 | 10,3 | 9 et 10,80 | 4,76 / 5 / 5,32 / 5,66 | 5,90 et 4 nœuds autour de 6 et 6,50 | 12 |
| Nœuds morts (m) | Absents | 0,64 | Absents | 1,8 | Absents | Absents | 1,47 et 4,90 2,55 | Absents | 0,56 / 0,71 / 0,78/ 1,20 / 1,60 / 1,65 | 1,17/1,55/2,40/2,90/3,10 | 1,30 et 5,50 |

Annexe 2 :

Tableau 2. Tableau des résultats d'extractions et de la composition en extractibles pour chaque essence. (NM : Nœuds morts ; NVB : Nœuds vivants du bas ; NVM : Nœuds vivants du milieu ; NVJ : Nœuds vivants jeunes ; Dur : Duramen ; Aub : Aubier ; AG : Acides gras, N.I : Non identifiés)

| | | Dichlorométhane | Acétone | Toluène/ éthanol | Eau |
|-------------------|-----|---|---|------------------|------------------|
| Chêne vert | NM | ET=0.5% -AG (46.78%) -Stérols (23.53%) -Autres (22.69%) -Terpènes (4.25%) -N.I (2.75%) | ET=1.82% -Catéchine (51.97%) -Sucres (16.13%) -Acide gallique (10.47%) -N.I (8.88%) -Acides gras (6.92%) -Terpènes (5.63%) | ET=1.11% | ET=13.69% |
| | NVB | ET=0.19% -Stérols (44.96%) -N.I (25.46%) -AG (14.06%) -Terpènes (9.89%) -Autres (5.63%) | ET=3.47% -Sucres (74.77%) -Catéchine (22.60%) -N.I (2.63%) | ET=2.59% | ET=9.03% |
| | NVM | ET=0.18% -AG (75.14%) -Stérols (18.72%) -N.I (6.12%) | ET=2.33% -Sucres (74.44%) -Catéchine (24.17%) -N.I (1.39%) | ET=2.27% | ET=7.64% |
| | NVJ | ET=0.25% -AG (69.44%) -Stérols (16.18%) -N.I (6.07%) -Sucres (4.77%) -Terpènes (3.52%) | ET=3.90% -Sucres (89.01%) -Catéchine (10.99%) | ET=1.84% | ET=7.02% |
| | Dur | ET=0.24% -Stérols (45.24%) -AG (27.61%) -Terpènes (21.81%) -N.I (5.31%) | ET=2.96% -Sucres (83.92%) -Catéchine (13.21%) -N.I (2.86%) | ET=2.34% | ET=6.71% |
| | Aub | ET=0.39% -AG (79.44%) -Stérols (12.99%) -N.I (4.09%) -Sucres (2.14%) -Lignanes (1.32%) | ET=2.51% -Sucres (97.08%) -Catéchine (2.92%) | ET=1.39% | ET=4.98% |

| | | | | | |
|-------------------------|-----|--|---|-----------------|-----------------|
| Métaséquoia | NM | ET=5.88% -Terpènes (58.19%) -Stérols (22.33%) -N.I (13.95%) -AG (5.54%) | ET=1.69% -Sucres (53.19%) -N.I (21.79%) -Lignanes (9.08%) -Terpènes (6.27%) | ET=0.96% | ET=3.38% |
| | NVB | ET=19.45% -Terpènes (58.19%) -Stérols (22.33%) -N.I (13.95%) -AG (5.54%) | ET=2.50% -Sucres (45.72%) -N.I (39.37%) -Lignanes (13.15%) -Terpènes (1.76%) | ET=1.55% | ET=1.24% |
| | NVM | ET=6.91% -Terpènes (58.19%) -Stérols (22.33%) -N.I (13.95%) -AG (5.54%) | ET=0.86% -N.I (53.67%) -Lignanes (34.03%) -Sucres (10.55%) -Terpènes (1.74%) | ET=0.69% | ET=9.64% |
| | NVJ | ET=7.23% -Terpènes (58.19%) -Stérols (22.33%) -N.I (13.95%) -AG (5.54%) | ET=1.08% -Sucres (39.95%) -N.I (29.44%) -Lignanes (16.41%) -Terpènes (14.21%) | ET=0.58% | ET=3.73% |
| | Dur | ET=4.03% -Terpènes (81.50%) -Autres (10.91%) -N.I (4.77%) -Stérols (2.82%) | ET=0.25% -N.I (46.83%) -Terpènes (32.12%) -Sucres (11.90%) -Autres (9.15%) | ET=1.15% | ET=6.15% |
| | Aub | ET=0.38% -AG (84.74%) -Terpènes (10.67%) -Stérols (4.59%) | ET=0.48% -Sucres (94.67%) -Acides gras (4.23%) -N.I (1.10%) | ET=0.58% | ET=2.29% |
| Cèdre de l'Atlas | NM | ET=14.18% -Terpènes (86.87%) -Acides gras (5.41%) -Autres (4.21%) -Stérols (1.76%) -Lignanes (1.72%) | ET=4.59% -Lignanes (59.04%) -Sucres (29.75%) -N.I (3.52%) -Terpènes (3.11%) -Acides gras (2.69%) -Autres (1.86%) | ET=1.32% | ET=6.02% |
| | NVB | ET=5.78% -Terpènes (82.73%) -N.I (13.99%) -Lignanes (3.28%) | ET=1.47% -Lignanes (60.43%) -Sucres (28.10%) -N.I (3.61%) | ET=0.98% | ET=3.43% |

| | | | | | |
|----------------------|-----|--|--|-----------------|-----------------|
| | | | -Terpènes (3.19%) -Acides gras (2.75%) -Autres (1.90%) | | |
| | NVM | ET=2.47% -Terpènes (70.69%) -N.I (13.34%) -Lignanes (6.72%) -Stérols (4.57%) -Autres (1.42%) | ET=1.24% -Sucres (86.10%) -Lignanes (6.58%) -Terpènes (7.32%) | ET=0.57% | ET=2.72% |
| | NVJ | ET=1.35% -Stérols (29.81%) -Terpènes (24.94%) -Lignanes (22.34%) -N.I (9.25%) -Acides gras (6.74%) -Sucres (1.30%) -Autres (5.59%) | ET=0.95% -Sucres (82.68%) -Lignanes (14.94%) -Terpènes (2.38%) | ET=0.69% | ET=6.81% |
| | Dur | ET=4.90% -Terpènes (89.89%) -N.I (6.10%) -Stérols (2.88%) -Autres (0.76%) -Acides gras (0.35%) | ET=1.86% -Sucres (47.49%) -N.I (28.84%) -Terpènes (22.39%) -Catéchine (1.28%) | ET=0.95% | ET=2.38% |
| | Aub | ET=0.23% -Terpènes (46.79%) -Acides gras (34.10%) -Stérols (16.65%) -Autres (2.44%) | ET=1.48% -Sucres (99%) -Catéchine (1%) | ET=2.11% | ET=4.49% |
| Cyprès chauve | NM | ET=14.50% -Terpènes (29.64%) -Stérols (27.23%) -N.I (24.85%) -Autres (9.87%) -Acides gras (8.38%) | ET=1.77% -N.I (59.59%) -Lignanes (21.98%) -Sucres (18.43%) | ET=1.45% | ET=3.79% |
| | NVB | ET=18.28% -Terpènes (35.54%) -N.I (25.24%) -Stérols (23.13%) -Autres (10.76%) -Acides gras (5.31%) | ET=2.43% -Sucres (78.23%) -N.I (9.47%) -Autres (7.72%) -Lignanes (4.56%) | ET=0.87% | ET=2.58% |
| | NVM | ET=9.43% | ET=1.62% | ET=1.30% | ET=3.79% |

| | | | | | |
|-------------------|-----|--|--|-----------------|------------------|
| | | -Stérols (51.97%) -Acides gras (18.75%) -Terpènes (15.80%) -N.I (10.01%) -Autres (3.44%) | -Sucres (53.61%) -N.I (35.03%) -Lignanes (11.34%) | | |
| | NVJ | ET=13.62% -N.I (31.92%) -Terpènes (30.09%) -Stérols (19.44%) -Acides gras (16.17%) -Autres (2.36%) | ET=1.45% -Sucres (57.08%) -N.I (29.75%) -Lignanes (13.16%) | ET=1.14% | ET=4.26% |
| | Dur | ET=2.85% -Terpènes (29%) -N.I (22.74%) -Acides gras (7.33%) -Stérols (1.8%) | ET=0.93% -Sucres (80.62%) -N.I (17.02%) -Autres (2.35%) | ET=1.29% | ET=0.78% |
| | Aub | ET=0.49% -Acides gras (59.41%) -Terpènes (26.96%) -N.I (6.99%) -Stérols (6.62%) | ET=0.86% -Sucres (96.97%) -Catéchine (1.61%) -N.I (1.40%) | ET=0.96% | ET=3.62% |
| Châtaigner | NM | ET=0.58% -Acides gras (79.40%) -Stérols (12.80%) -N.I (3.79%) -Autres (2.20%) -Lignanes (1.79%) | ET=4.70% -Sucres (79.25%) -Acide gallique (20.75%) | ET=1.67% | ET=15.48% |
| | NVB | ET=0.38% -Acides gras (75.62%) -Stérols (12.36%) -N.I (8.11%) -Autres (2.47%) -Lignanes (1.42%) | ET=3.53% -Acide gallique (97.44%) -N.I (2.55%) | ET=2.28% | ET=6.82% |
| | NVM | ET=0.31% -Acides gras (71.51%) -Stérols (14.67%) -N.I (6.13%) -Lignanes (4.92%) -Autres (2.74%) | ET=4.09% -Acide gallique (56.26%) -Sucres (43.73%) | ET=2.55% | ET=9.43% |
| | NVJ | ET=0.50% | ET=1.62% | ET=3.06% | ET=10.30% |

| | | | | | |
|-------------|-----|--|--|-----------------|-----------------|
| | | -Acides gras (75.35%) -Stérols (13.94%) -Autres (5.38%) -N.I (5.32%) | -Acide gallique (80.22%) -N.I (11.65%) -Flavonoïdes (5.84%) -Sucres (2.27%) | | |
| | Dur | ET=0.25% -Acides gras (40.63%) -Stérols (30.26%) -Autres (12.18%) -Monophénols (9.73%) -Lignanes (7.17%) | ET=1.90% -Acide gallique (60.48%) -Sucres (24.65%) -N.I (6.89%) -Lignanes (6.38%) -Flavonoïdes (1.58%) | ET=1.30% | ET=6.86% |
| | Aub | ET=0.17% -Acides gras (65.54%) -Stérols (29.36%) -Autres (5.08%) | ET=0.47% -Sucre (94.25%) -Stérols (3.39%) -Autres (0.95%) -Acides gras (0.79%) -N.I (0.59%) | ET=0.66% | ET=5.94% |
| Buis | NM | ET=0.64% -N.I (34.87%) -Acides gras (30.37%) -Terpènes (28.60%) -Stérols (3.70%) -Autres (2.44%) | ET=1.05% -Sucre (60.04%) -N.I (21.72%) -Acides gras (12.21%) -Autres (6.01%) | ET=1.06% | ET=6.26% |
| | NVB | ET=0.40% -Terpènes (46.42%) -Acides gras (45.23%) -Stérols (5.02%) -Autres (3.30%) | ET=0.83% -Sucre (97.07%) -N.I (2.46%) -Acides gras (0.45%) | ET=0.99% | ET=4.43% |
| | NVM | ET=0.37% -Acides gras (53.60%) -Terpènes (32.51%) -Autres (5.20%) -Stérols (5.17%) -N.I (3.49%) | ET=0.87% -Sucre (100%) | ET=1.26% | ET=5.22% |
| | NVJ | ET=0.21% -Acides gras (66.15%) -Terpènes (24.85%) -Autres (4.95%) -Stérols (4.02%) | ET=0.96% -Sucre (94.76%) -Terpènes (2.90%) -Autres (1.19%) -Acides gras (1.12%) | ET=1.25% | ET=7.62% |
| | Dur | ET=0.39% | ET=0.62% | ET=1.18% | ET=3.53% |

| | | | | | |
|-----------|-----|--|---|-----------------|-----------------|
| | | -Acides gras (47.93%) -Terpènes (19.48%) -Autres (19.11%) -Stérols (8.65%) -N.I (4.80%) | -Sucre (94.85%) -Terpènes (1.99%) -N.I (1.75%) -Autres (1.08%) -Acides gras (0.32%) | | |
| | Aub | ET=0.34% - Acides gras (80.73%) - Stérols (7.85%) - Autres (7.65%) - N.I (3.74%) | ET=0.92% -Sucre (98.93%) -N.I (1.07%) | ET=0.54% | ET=4.44% |
| If | NM | Absence de nœuds morts. | | | |
| | NVB | ET=1.80% -Lignanes (82.03%) -Terpènes (8.66%) -Stérols (2.77%) -N.I (2.76%) -Sucres (2.56%) -AG (1.19%) | ET=5.11% -Lignanes (47.15%) -Sucres (42.15%) -N.I (10.69%) | ET=2.21% | ET=3.13% |
| | NVM | ET=1.90% -Lignanes (83.01%) -Terpènes (6.85%) -Sucres (4.02%) -Stérols (2.94%) -N.I (2.33%) -AG (0.83%) | ET=4.37% -Sucres (53.65%) -Lignanes (42.35%) -N.I (4%) | ET=2.03% | ET=3.21% |
| | NVJ | ET=1.54% -Lignanes (82.14%) -Terpènes (6.61%) -Sucres (6.41%) -Stérols (2.74%) -AG (1.27%) -N.I (0.90%) | ET=2.72% -Sucres (57.80%) -Lignanes (36.97%) -N.I (5.21%) | ET=1.22% | ET=3.30% |
| | Dur | ET=1.22% -Lignanes (50.66%) -Sucres (31.63%) -Terpènes (16.06%) -AG (1.64%) | ET=3.64% -Sucres (61.78%) -Lignanes (28.95%) -N.I (9.27%) | ET=4.17% | ET=2.74% |
| | Aub | ET=0.60% -Terpènes (44.68%) -AG (36.20%) -Autres (19.13%) | ET=0.31% -Sucres (94.96%) -AG (5.04%) | ET=0.49% | ET=2.42% |

| | | | | | |
|--------------|-----|---|--|-----------------|-----------------|
| Houx | NM | Absence de nœuds morts | | | |
| | NVB | ET=0.43% -Stérols (37.93%) -N.I (34.36%) -Acides gras (13.56%) -Terpènes (8.16%) -Autres (5.96%) | ET=0.42% -Stérols (52.44%) -Sucres (47.55%) | ET=1.58% | ET=6.59% |
| | NVM | ET=0.34% -Stérols (44.76%) -N.I (27.75%) -Acides gras (10.61%) -Terpènes (10.36%) -Autres (6.49%) | ET=0.60% -Sucres (100%) | ET=1.49% | ET=6.10% |
| | NVJ | ET=0.32% -N.I (38.92%) -Stérols (37.89%) -Acides gras (16.06%) -Autres (4.93%) -Terpènes (2.17%) | ET=0.52% -Sucres (91.71%) -N.I (6.28%) -Acide palmitique (1.99%) | ET=1.46% | ET=5.44% |
| | Dur | ET=0.29% -N.I (50.07%) -Stérols (25.56%) -Terpènes (10.47%) -Acides gras (9.60%) -Autres (4.27%) | ET=1.91% -Sucres (86.98%) -Autres (8.60%) -N.I (4.40%) | ET=1.20% | ET=4.25% |
| | Aub | ET=0.24% - Stérols (43.79%) - Acides gras (24.34%) - N.I (19.27%) - Terpènes (9.46%) - Autres (3.11%) | ET=1.39% - Sucres (98.15%) - Terpènes (1.84%) | ET=1.00% | ET=3.87% |
| Noyer | NM | Absence de nœuds morts | | | |
| | NVB | ET=0.64% - Stérols (48.81%) - Acides gras (21.33%) - Terpènes (17.24%) - N.I (8.09%) - Sucres (4.51%) | ET=1.80% - Sucres (94.52%) - Catéchine (2.83%) - N.I (1.81%) - Autres (0.83%) | ET=2.63% | ET=7.60% |
| | NVM | ET=0.46% - Stérols (48.81%) | ET=0.94% - Sucres (96.41%) | ET=1.09% | ET=3.84% |

| | | | | | |
|---------------|-----|---|---|-----------------|------------------|
| | | - Acides gras (21.33%) - Terpènes (17.24%) - N.I (8.09%) | - Autres (2.25%) - N.I (1.32%) | | |
| | NVJ | ET=0.86% - Stérols (47.45%) - Terpènes (21.29%) - N.I (17.26%) - Acides gras (9.75%) - Autres (4.23%) | ET=1.95% - Sucres (93.44%) - Catéchine (1.39%) - N.I (5.16%) | ET=1.76% | ET=9.41% |
| | Dur | ET=0.58% - Stérols (42.79%) - Terpènes (28.22%) - Acides gras (14.84%) - N.I (14.12%) | ET=4.12% - Sucres (55.22%) - Catéchine (19.38%) - N.I (11.41%) - Lignanes (11.06%) - Acide gallique (2.90%) | ET=3.08% | ET=4.76% |
| | Aub | ET=0.51% - Terpènes (49.88%) - Stérols (33.27%) - Acides gras (10.43%) - N.I (6.40%) | ET=1.21% - Sucres (90.11%) - N.I (9.89%) | ET=0.72% | ET=3.91% |
| Ginkgo | NM | Absence de nœuds morts | | | |
| | NVB | ET=1.23% -Stérols (77.94%) -Terpènes (9.60%) -AG (8.60%) -N.I (2.82%) -Autres (1.03%) | ET=0.62% - Sucres - Lignanes (LCMS) | ET=0.54% | ET=5.43% |
| | NVM | ET=1.00% -Terpènes (38.32%) -Autres (28.43%) -AG (16.16%) -N.I (10.37%) -Stérols (6.72%) | ET=0.65% - Sucres - Lignanes (LCMS) | ET=0.86% | ET=8.38% |
| | NVJ | ET=2.91% | ET=0.86% | ET=2.32% | ET=10.95% |
| | Dur | ET=0.96% -AG (35.91%) -Terpènes (34.39%) -Autres (14.61%) -Stérols (8.39%) -N.I (6.71%) | ET=0.86% - Sucres (97.60%) - Acides gras (2.40%) | ET=1.07% | ET=2.41% |

| | | | | | |
|---------------------|-----|--|---|-----------------|-----------------|
| | Aub | ET=0.89% -Terpènes (44.92%) -Autres (36.46%) -AG (14.35%) -Stérols (4.27%) | ET=0.65% - Sucres (100%) | ET=1.55% | ET=2.93% |
| Pin maritime | NM | ET=38.58% -Acides résiniques (39.41%) -Acides gras (32.32%) -N.I (28.26%) | ET=2.49% -Lignanes (46.31%) -Terpènes (15.52%) -Stilbènes (13.67%) -Acides résiniques (12.43%) -N.I (8.86%) -Sucres (2.44%) -Autres (0.74%) | ET=0.79% | ET=3.47% |
| | NVB | ET=32.10% -Acides résiniques (72.40%) -N.I (17.82) -Acides gras (7.26%) -Stilbènes (2.51%) | ET=2.94% -Lignanes (44.16%) -Stilbènes (16.99%) -Acides résiniques (14.6%) -Terpènes (15.09%) -N.I (7.46%) -Sucres (1.72%) | ET=0.54% | ET=5.53% |
| | NVM | ET=18.58% -Acides résiniques (66.76%) -Acides gras (6.36%) -N.I (24.62%) -Stilbènes (2.25%) | ET=2.71% -Lignanes (63.15%) -Terpènes (10.18%) -Stilbènes (8.9%) -Acides résiniques (7.82%) -Sucres (5.46%) -N.I (4.49%) | ET=0.51% | ET=4.52% |
| | NVJ | ET=2.34% -Acides gras (71.06%) -Acides résiniques (19.83%) -Terpènes (9.11%) | ET=0.70% -Sucre (52.08%) -Acides gras (32%) -Acides résiniques (15.92%) | ET=0.27% | ET=3.48% |
| | Dur | ET=2.70% -Acides gras (38.59%) -Acides résiniques (38.15%) -Autres (10.81%) - Stérols (6.30%) -N.I (6.15%) | ET=1.48% -Acides résiniques (45.99%) -Autres (25.08%) -Sucres (10.85%) -N.I (8.66%) -Lignanes (6.38%) -Acides gras (3.04%) | ET=0.46% | ET=3.95% |
| | Aub | ET=2.91% -Acides gras (43.50%) -Acides résiniques (36.59%) | ET=0.28% -Sucres (54.07%) -Acides gras (23.51%) | ET=0.22% | ET=2.00% |

| | | | | | |
|--|--|-------------------|----------------------------|--|--|
| | | -Stérols (19.91%) | -Autres (19.00%) | | |
| | | | -Acides résiniques (3.41%) | | |

Annexe 3 :

Identification moléculaire par la base de données NIST.

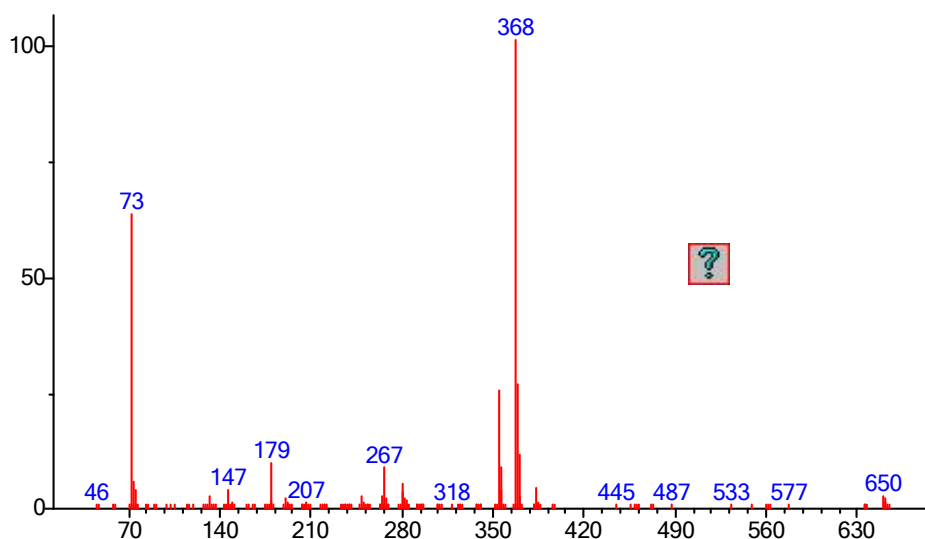


Figure a. Spectre de masse de la molécule à identifier
(Dans les nœuds morts du chêne vert, extraits acétoniques).

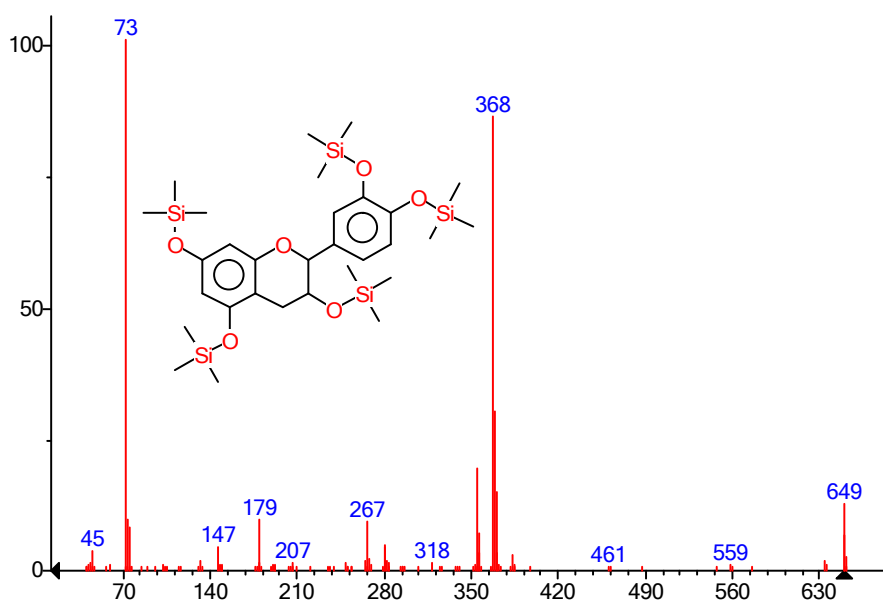


Figure b. Spectre de masse de la molécule proposée par la base de données NIST (Catéchine penta TMS).

Résumé.

Les nœuds sont la principale singularité du bois. Ils sont réputés pour leur richesse en molécules extractibles telles que les lignanes et les flavonoïdes, de grand intérêt économique. Leur concentrations peuvent être jusqu'à 500 fois plus élevées dans le bois de nœud que dans celui du tronc, aussi bien chez les résineux que chez les feuillus. La généralisation de cette observation a été testée pour une gamme plus étendue d'espèces appartenant à la ressource du Nord-Est de la France (Kebbi-Benkeder et al. 2013).

Dans ce contexte, les objectifs de ce stage sont de compléter l'analyse de la biodiversité des extractibles nodaux, du duramen et de l'aubier sur onze essences forestières sélectionnées, de quantifier les taux d'extractibles ainsi que des composés présents après identification, permettant d'avancer des hypothèses sur ces extractibles (rôles, profil intra-arbre des concentrations, différences intra arbre et interspécifiques...).

Des extractions ont été réalisées avec un montage soxhlet, en utilisant quatre solvants à polarité croissante (dichlorométhane, acétone, toluène/éthanol, eau). Un couplage GC-MS a été utilisé pour l'identification et la quantification relative des molécules extractibles.

De manière générale, les résultats montrent des taux élevés d'extraits nodaux. Les composés majoritaires identifiés sont les lignanes (principalement chez les résineux), les flavonoïdes (principalement chez les feuillus) et les stilbènes. Par ailleurs, nos résultats révèlent de fortes variabilités en termes de nature et de quantité d'extractibles aussi bien à l'échelle interspécifique qu'à l'échelle d'un même arbre.

Ajouté à leur particularité anatomique, la composition chimique des nœuds fait de ces derniers une autre particularité du bois, cette composition dépend aussi bien de l'essence que de la partie de l'arbre analysée.

Abstract.

Knots are the main particularity of wood. They are renowned for their high extractives contents such as lignans and flavonoids, of great economic interest. Their concentrations can be up to 500 times higher in the knotwood than in the stems, both in conifers than in hardwoods. The generalisation observation has been tested for a wider range of species belonging to the North-East France resource (Kebbi-Benkeder and al. 2013).

In this context, the objectives of this study, are to complete analysis of extractives biodiversity in knots, heartwood and sapwood among eleven other trees selected species, to quantify the extractives and present compounds rates after logging making it possible to forward hypotheses on these extractives(roles, profile intra-tree levels, intra-tree and interspecific differences ...).

Extractions were performed using a soxhlet assembly using four increasing polarity solvents (dichloromethane, acetone, toluene / ethanol, water). A GC-MS coupling was used for identification and quantification of the relative extractable molecules.

The results, generally show high levels of nodal extracts. The major identified compounds are lignans (mainly in softwood), flavonoids (mainly in hardwoods) and stilbens. Furthermore, our results show high variability in terms of the nature and amount of extractives both interspecific scale at the level of the same tree.

Added to their anatomical feature, the chemical composition of knots makes another wood's feature, this composition depends on species and on part of the analyzed tree as well.