



HAL
open science

Métabolites de *Pseudotsuga menziesii* : approche métabolomique et rôle dans la résistance

Henri Mbakidi-Ngouaby

► **To cite this version:**

Henri Mbakidi-Ngouaby. Métabolites de *Pseudotsuga menziesii* : approche métabolomique et rôle dans la résistance. Chimie organique. Université de Limoges, 2017. Français. NNT : 2017LIMO0056 . tel-01662455

HAL Id: tel-01662455

<https://theses.hal.science/tel-01662455v1>

Submitted on 13 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges

École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED 523)

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (EA 1069)

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Chimie appliquée / Spécialité : Chimie des Substances Naturelles

Présentée par

MBAKIDI-NGOUABY HENRI

Le **28 avril 2017**

Métabolites de *Pseudotsuga menziesii* : approche métabolomique et rôle dans la résistance

Thèse dirigée par Pr Lengo MAMBU et Dr Marion MILLOT

JURY :

Président du jury

M. Nicolas FABRE, UMR 152, Université Paul Sabatier de Toulouse

Rapporteurs

M. Pierre CHAMPY, Professeur, UMR 8076 CNRS, Université Paris-Sud

M. Bertrand CHARRIER, Professeur, UMR CNRS 5254, Université de Pau et des Pays de l'Adour.

Examineurs

M. Guy COSTA, Maître de conférences HDR, EA 1069, Université de Limoges

Mme Marion MILLOT, Maître de conférences, EA 1069, Université de Limoges

Mme Lengo MAMBU, Professeur, EA 1069, Université de Limoges



Rien n'est jamais perdu tant qu'il reste quelque chose à trouver

Pierre Dac



Remerciements

Toutes ces années passées au Laboratoire de pharmacognosie à la faculté de pharmacie de Limoges représentent pour moi une riche expérience scientifique, professionnelle et humaine. Je tiens donc à remercier tout d'abord le professeur Vincent SOL, Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et le professeur Vincent GLOAGUEN pour m'avoir fait confiance en m'accordant l'opportunité de réaliser cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Mes remerciements chaleureux à mes directrices de thèse, le Professeur Angèle Lengo MAMBU et le Docteur Marion MILLOT pour l'encadrement, le soutien permanent qu'elles m'ont témoigné dans ce travail ainsi que pour leur disponibilité et la grande autonomie qu'elles m'ont accordée. Leur rigueur scientifique et leurs remarques pertinentes m'ont permis de faire évoluer mes travaux.

Je remercie très sincèrement les Professeurs Pierre CHAMPY et Bertrand CHARRIER d'avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le professeur Guy COSTA pour m'avoir fourni le matériel végétal étudié au cours de la thèse mais également pour les conseils et stratégies proposés pour améliorer mes travaux.

Je n'oublie pas de remercier le Docteur Yves CHAMPAVIER pour avoir effectué les analyses en RMN et le docteur Emilie PINAULT pour les analyses en spectrométrie de masse ; veuillez trouver ici mes remerciements et mon profond attachement ; sans oublier le Docteur Claude Calliste pour les mesures de l'activité antioxydante des composés par RPE, le Docteur Mehdi BENIDDIR et la Cellule Bioinformatique (Stephanie DURAND, Bastien HERVE et Erwan SCAON) pour l'aide à la création et la compréhension des réseaux moléculaires ; le Docteur Pascal LABROUSSE pour son aide en botanique; qu'ils trouvent également l'expression de toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier tout particulièrement Laetitia VIGNAUD pour sa très grande disponibilité lorsqu'un appareil ne fonctionnait pas et pour ses conseils avisés dans l'utilisation du matériel présent au laboratoire de pharmacognosie.



Mes pensées vont également à Aurelie LAGARDE avec qui j'ai partagé les enthousiasmes et les doutes inhérents à nos parcours de doctorants. Nombreux sont les bons moments que nous avons passé dans le laboratoire de pharmacognosie.

Un grand merci à mes autres collègues du LCSN : Idellette, Benjamin, Tom, Amaury, Manon, Gautier,...et tous ceux que j'aurais pu oublier, pour tous les moments passés ensembles.

Je remercie ceux qui de loin ou de près m'ont apporté un soutien constant pour arriver au terme de ce travail.

A mes parents,

Jean Pierre MBAKIDI, je te remercie pour le soutien, l'encouragement inébranlable que tu m'as apporté et ton amour incommensurable.

Margueritte MBAKIDI, je te remercie pour ton soutien, tes prières et ton amour incommensurable.

Veillez chers papa et maman trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance pour ce long chemin parcouru ensemble.

J'adresse mes profonds remerciements à mes 5 frères (Horsini, Davy, Hubert, Emard et JP) qui m'ont toujours soutenus et encouragés.

Je remercie également tous les membres de ma famille, oncles, tantes, cousin (Rufin, Vianney, Bio, Fany,...), cousines (Galia, Harielle, Valdie,...), belles sœurs (Nephertiti, Roquelina, Ornella, Bienfaite) ainsi que mes amis (Gilles, Yannick, Asouma, Joel,...) pour m'avoir épaulé et soutenu.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abreviations

% : pourcentage massique

Abs : Absorbance

AcOEt : acétate d'éthyle

ACN : acétonitrile

ASE : extraction accélérée par solvant

n-BuOH: n-butanol

cf : confère

CO : groupe carboxyle

CO₂ : Dioxyde de carbone

CE : Collision Energy

CDCl₃ : chloroforme deutérié

CD₃OD : méthanol deutérié

DAD : Diode Array Detector

DP : Declustering Potentiel.

DPPH : 1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazyle

EIC : Extracted Ion Chromatogram (chrommatogramme des ions extraits)

EP : Entrance Potential

ESI: Electrospray Ionisation

Et₂O : éther d'éthyle

eV : électron volt

Glc : glucose

h : hauteur

hex : hexuplet

ha : hectare

LC : Liquide Chromatography

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CXP : collision cell exit potential

m : masse

m_{bois} : masse de bois

MeOH : méthanol

m_{ext} : masse d'extrait



Min : minute
PDA : photodiode array
P : pression
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
Rha : rhamnose
RMN¹H : RMN du proton
RMN¹³C : RMN du carbone 13
RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
s : singulet
sec : seconde
T° : température
T°A : température ambiante
T : temps
t_R : temps de rétention
TIC (Total Ion Current)
uma : unité de masse atomique



Table des matières

Liste des abreviations	6
Introduction générale	19
Partie I. Etude bibliographique	21
I. Le règne végétal	21
II. Organisation générale des spermaphytes	21
III. Les différents tissus de la tige des spermaphytes.....	23
IV. Le bois des gymnospermes.....	26
IV.1. Morphologie	26
IV.1.1. L'aubier	27
IV.1.2. La zone de transition	27
IV.1.3. Le duramen	27
IV.2. Composition chimique	29
IV.2.1. Les métabolites primaires	30
IV.2.1.1. La cellulose	30
IV.2.1.2. L'hémicellulose	31
IV.2.1.3. Les pectines	32
IV.2.1.3.1. Les homogalacturonanes	33
IV.2.1.3.2. Les rhamnogalacturonanes	34
IV.2.1.4. Les lipides	34
IV.2.1.5. Les protéines.....	35
IV.2.2. Les métabolites secondaires	35
IV.2.2.1. Les terpènes.....	35
IV.2.2.2. Les polyphénols.....	37
IV.2.2.2.1. Biosynthèse	37
IV.2.2.2.2. Les stilbènes.....	39
IV.2.2.2.3. Les lignanes	40
IV.2.2.2.4. Les flavonoïdes	44
IV.2.2.2.5. Les tanins	47
V. Le sapin de Douglas	48
V.1. Description	48
V.2. Métabolites secondaires et propriétés du bois de Douglas.....	50
V.2.1. Structure et localisation	50
V.2.1.1. Les terpènes	50
V.2.1.2. Les polyphénols	53
V.3. Propriétés.....	54
V.3.1. Résistance mécanique.....	54
V.3.2. Durabilité naturelle du bois.....	54
V.3.2.1. Les agents pathogènes destructeurs	54

V.3.2.2. Conditions favorisant la détérioration du bois.....	55
V.3.2.3. Les différents mécanismes de défenses.....	56
V.3.2.4. Caractère chimique de la réaction de défense	57
V.3.2.4.1. Les inhibiteurs constitutifs	57
V.3.2.4.2. Les inhibiteurs induits.....	57
V.3.2.4.3. La résine.....	58
V.3.2.4.4. Les minéraux	58
V.4. Utilisation du bois dans la construction	59
Objectif du travail.....	60
Partie II. Partie expérimentale.....	62
I. Matériel végétal	62
II. Choix du solvant et du type d'extractions	64
II.1. Extractions avec des solvants de polarités croissantes.....	64
II.2. Délipidation et partition liquide-liquide.....	64
II.3. Extraction avec du méthanol puis partition liquide-liquide	65
II.4. Extraction avec l'acétone aqueux.	67
III. Méthodes d'extractions	68
III.1. Extraction par macération à froid	68
III.2. Extraction liquide sous pression	68
IV. Fractionnement et purification des extraits issus du bois d'automne	70
IV.1. Extrait d'aubier.....	70
IV.2. Extrait de duramen	71
IV.3. Description des produits isolés.....	74
V. Méthodes de séparations et techniques analytiques	77
V.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	77
V.2. Chromatographies sur colonne	78
V.2.1. Chromatographie sur colonne de silice	78
V.2.2. Chromatographie liquide à moyenne pression.....	78
V.2.3. Chromatographie d'exclusion stérique	79
V.3. Chromatographie liquide haute performance couplée avec un détecteur UV-visible	80
V.4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	81
V.5. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem	82
V.6. Quantification relative par MRM.	83
V.7. Résonance magnétique nucléaire.....	84
VI. Méthode d'évaluation biologique	85
Partie III. Résultats et discussions	87
I. Choix du solvant d'extraction	87
II. Choix de la méthode d'extraction	90
III. Extraction, fractionnement et isolement des composés majoritaires	91
III.1. Analyse des extraits	91

III.2. Caractérisation des produits isolés.....	94
III.2.1. Aubier	94
III.2.2. Duramen	95
IV. Identification des composés par LC-MS/MS.	97
IV.1. Aubier	98
IV.1.1. Extrait	98
IV.1.1.1. Flavonoïdes	98
IV.1.1.2. Lignanes	114
IV.1.1.3. Terpènes	116
IV.1.1.4. Acides gras	117
IV.1.1.5. Bilan des composés identifiés dans l'extrait d'aubier.	120
IV.1.2. Fractions	121
IV.1.2.1. Flavonols	121
IV.1.2.2. Diphénylpropane	126
IV.1.2.3. Flavonolignane	127
IV.1.2.4. Bilan des composés identifiés dans les fractions de l'aubier	128
IV.2. Duramen.....	129
IV.2.1. Extrait	129
IV.2.1.1. Flavonoïdes	130
IV.2.1.2. Bilan des composés identifiés dans l'extrait de duramen	136
IV.2.2. Fractions	136
IV.2.2.1. Flavonoïdes	137
IV.2.2.1.1. Dihydroflavonols.....	137
IV.2.2.1.2. Flavanone.....	138
IV.2.2.1.3. Biflavonoïde.....	139
IV.2.2.1.4. Dérivé d'acide phénylpropanoïque	140
IV.2.2.2. Flavonolignanes.....	141
IV.2.2.3. Terpènes	146
IV.2.2.3.1. Sesquiterpènes.....	146
IV.2.2.3.2. Diterpène.....	150
IV.2.2.4. Acides alcanoïques	152
IV.2.2.5. Acide phénolique	153
IV.2.2.6. Autre composé.....	154
IV.2.2.7. Bilan des composés identifiés dans les fractions du duramen	155
V. Zone de transition.....	156
V.1. Polyphénols	156
V.1.1. Dihydroflavonols.....	157
V.1.2. Flavonols.....	158
V.1.3. Lignanes.....	162
V.1.3.1. Tétrahydrofurane lignanes.....	162
V.1.3.2. Dibenzylbutyrolactone lignane	165



V.2. Terpènes	167
V.3. Autres composés.....	167
V.4. Bilan des composés identifiés dans la zone de transition.	168
VI. Propriétés biologiques des métabolites identifiés dans les différentes zones du bois de Douglas.....	169
VII. Répartition des métabolites secondaires au sein du bois de Douglas.....	170
VIII. Variation quantitative des métabolites majoritaires au cours de l'année.	175
Références bibliographiques.....	193
Annexes	203



Table des illustrations

Figure 1 : Schéma général d'une plante à fleurs.....	22
Figure 2 : Coupes transversales d'une tige de pin (coloration carminot vert).....	25
Figure 3 : Coupe transversale du tronc d'un arbre (A) et observation microscopique d'un bois de résineux (B).	26
Figure 4 : Organisation des polymères au sein de la paroi primaire.	29
Figure 5 : Structure de la cellulose.....	31
Figure 6 : Structures générales de la fibrille et de la microfibrille d'une cellulose	31
Figure 7 : Structure chimique de la région homogalacturonane.	32
Figure 8 : Structure primaire des pectines.	33
Figure 9 : Deux chaînes homogalacturonanes stabilisées par des ions calcium formant une structure en « egg-box ».....	34
Figure 10 : Structure chimique de composés aliphatiques présents dans le bois de gymnospermes.....	35
Figure 11 : Structure chimique de terpènes retrouvés dans le bois des gymnospermes.....	36
Figure 12 : Structure chimique de phytostérols présents dans le bois de gymnosperme.	37
Figure 13 : Schéma général de la biosynthèse des flavonols.	38
Figure 14 : Structures chimiques de stilbènes présents dans le bois de gymnospermes.	39
Figure 15 : Structure générale des principaux sous-groupes de lignanes.....	40
Figure 16 : Structure chimique des lignines	42
Figure 17 : Biosynthèse générale des lignanes	43
Figure 18 : Structures chimiques de lignanes identifiés dans le bois de gymnospermes.	44
Figure 19 : Structures générales des différentes des classes de flavonoïdes.	45
Figure 20 : Structures chimiques de flavonoïdes retrouvés dans le bois de gymnospermes	47
Figure 21 : Structures de tanins condensé (A) et hydrolysable (B).	48
Figure 22 : <i>Pseudotsuga menziesii</i>	49
Figure 23 : Structures chimiques des sesquiterpènes présents dans le bois de Douglas.	51
Figure 24 : Structures chimiques des triterpènes identifiés dans le bois de Douglas.....	52
Figure 25 : Structures chimiques de phytostérols identifiés dans le bois Douglas.	52
Figure 26 : Structures chimiques de polyphénols présents dans le bois Douglas.	53
Figure 27 : Les trois zones de la rondelle de bois d'automne N°1.....	63
Figure 28 : Les rondelles de bois prélevées aux différentes saisons de l'année.	63

Figure 29 : Représentation schématique des extractions réalisées.....	66
Figure 30 : Schéma présentant les extractions réalisées avec l'acétone et le mélange acétonique aqueux.	67
Figure 31 : L'extracteur ASE 150 [®] et ses principaux composants.	69
Figure 32 : Schéma général du fractionnement et de la purification de l'extrait d'aubier.	71
Figure 33 : Schéma général du fractionnement et de la purification de l'extrait du duramen.	73
Figure 34 : Réaction chimique du DPPH avec un phénol.	85
Figure 35 : Pourcentages massiques des extractions effectuées.	88
Figure 36 : Résultats de la mesure de l'activité antioxydante des extraits.	89
Figure 37 : Chromatogramme obtenus par CLHP UV-Visible des extraits E14, E15 et E16 (à 218 nm).	90
Figure 38 : Résultat de l'analyse en CLHP UV-Visible des extraits.	92
Figure 39 : Résultat de l'analyse en CLHP UV-Visible des sous-fractions F6f, F8d et F9f.	93
Figure 40 : Structure chimique de la taxifoline.	95
Figure 41 : Structure chimique de la quercétine.	95
Figure 42 : Structure chimique de l'acide dihydrotodomatique.	96
Figure 43 : Structure chimique de l'acide 4-p-tolylvalérique.	97
Figure 44 : Représentation du TIC de l'extrait d'aubier en mode négatif.	98
Figure 45 : Structure générale d'un flavonoïde.	99
Figure 46 : Spectre MS/MS de la taxifoline.	101
Figure 47 : Fragmentations de la taxifoline.	101
Figure 48 : Spectre MS/MS du dihydrokaempferol.	102
Figure 49 : Fragmentations du dihydrokaempferol.	103
Figure 50 : Spectre MS/MS de la pinobanksine.	104
Figure 51 : Fragmentations de la pinobanksine.	104
Figure 52 : Spectre MS/MS du kaempférol.	105
Figure 53 : Fragmentations du kaempferol.	106
Figure 54 : Spectre MS/MS de la pinocembrine.	107
Figure 55 : Fragmentations de la pinocembrine.	107
Figure 56 : Structures chimiques (A) et spectre MS/MS (B) de la catéchine ou de l'épicatéchine.	108
Figure 57 : Fragmentations de la catéchine et l'épicatéchine.	109
Figure 58 : Spectre MS/MS de la procyanidine B1 ou B2.	110

Figure 59 : Fragmentations de la procyanidine B1 ou B2.	110
Figure 60 : Spectre MS/MS de la procyanidine C4.	111
Figure 61 : Fragmentations de la procyanidine C4.	112
Figure 62 : Spectre MS/MS de la taxifoline-3'-O-glucoside.	113
Figure 63 : Fragmentations caractéristiques de la taxifoline-3'-O-glucoside.	114
Figure 64 : Spectre MS/MS du wikstromol.	115
Figure 65 : Fragmentations du wikstromol.	115
Figure 66 : Spectre MS/MS de la gibbérelline A7.	116
Figure 67 : Fragmentations de la gibbérelline A7.	117
Figure 68 : Spectre MS/MS de l'acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécenoïque.	118
Figure 69 : Fragmentations de l'acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécenoïque.	118
Figure 70 : Spectre MS/MS de l'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque.	119
Figure 71 : Fragmentations de l'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque.	120
Figure 72 : Spectre MS/MS de la quercétine.	122
Figure 73 : Fragmentations de la quercétine.	123
Figure 74 : Spectre MS/MS de la myricétine.	124
Figure 75 : Fragmentations de la myricétine.	124
Figure 76 : Spectre MS/MS du composé à m/z 447.	125
Figure 77 : Fragmentations de la quercitrine.	126
Figure 78 : Spectre MS/MS du composé à m/z 349.	126
Figure 79 : Structure du dérivé diphenylpropane.	127
Figure 80 : Spectre MS/MS de la silybine.	127
Figure 81 : Fragmentations de la silybine.	128
Figure 82 : Représentation du TIC de l'extrait de duramen.	129
Figure 83 : Spectre MS/MS de la taxifoline-7,3'-diméthyléther.	130
Figure 84 : Fragmentations de la taxifoline-7,3'-diméthyléther.	131
Figure 85 : Spectre MS/MS de la [5',5''']-bisdihydroquercétine.	132
Figure 86 : Fragmentations caractéristiques de la [5',5''']-bisdihydroquercétine.	132
Figure 87 : Spectre MS/MS du dimère de taxifoline et quercétine.	133
Figure 88 : Fragmentations caractéristiques du dimère de taxifoline et quercétine.	134
Figure 89 : Spectre MS/MS du [5',5''']-bisdihydroisorhamnétine.	135
Figure 90 : Fragmentations du [5',5''']-bisdihydroisorhamnétine.	135

Figure 91 : Spectre MS/MS de la taxifoline-3'- <i>O</i> -pentoside.	137
Figure 92 : Fragmentations caractéristiques de la taxifoline-3'- <i>O</i> -pentoside.	138
Figure 93 : Spectre MS/MS de l'ériodictyol.	138
Figure 94 : Fragmentations de l'ériodictyol.	139
Figure 95 : Représentation du spectre MS/MS du composé à 13,08 min.	140
Figure 96 : Fragmentations caractéristiques du fisétinidol-4,6-taxifoline.	140
Figure 97 : Spectre MS/MS du coniferylacétate.	141
Figure 98 : Fragmentations du coniferylacétate.	141
Figure 99 : Spectre MS/MS du pseudotsuganol.	142
Figure 100 : Fragmentations caractéristiques du pseudotsuganol.	142
Figure 101 : Spectre MS/MS du composé à <i>m/z</i> 499.	143
Figure 102 : Fragmentations caractéristiques du composé à <i>m/z</i> 499.	144
Figure 103 : Spectre MS/MS du composé à <i>m/z</i> 469.	145
Figure 104 : Fragmentations caractéristiques du composé à <i>m/z</i> 469.	145
Figure 105 : Spectre MS/MS de l'acide todomatuique.	146
Figure 106 : Fragmentations de l'acide todomatuique.	147
Figure 107 : Spectre MS/MS de l'acide dihydrotodomatuique.	147
Figure 108 : Fragmentations de l'acide dihydrotodomatuique.	148
Figure 109 : Spectre MS/MS du pseudotsugonal.	148
Figure 110 : Fragmentations du pseudotsugonal.	149
Figure 111 : Spectre MS/MS du composé à 20,50 min.	150
Figure 112 : Structures de la juvabione et du 2-hydroxybutylfêrulate.	150
Figure 113 : Spectre MS/MS du 3,18-dihydroxyabieta-7-ène.	151
Figure 114 : Fragmentations du 3,18-dihydroxyabieta-7-ène.	151
Figure 115 : Spectre MS/MS l'acide azélaïque.	152
Figure 116 : Fragmentations de l'acide azélaïque.	153
Figure 117 : Spectre MS/MS de l'acide protocatéchiue hexoside	153
Figure 118 : Fragmentations de l'acide protocatéchiue hexoside.	154
Figure 119 : Spectre MS/MS du acide shikimique.	154
Figure 120 : Fragmentations de l'acide shikimique.	155
Figure 121 : Représentation du TIC de l'extrait de la zone de transition.	156
Figure 122 : Spectre MS/MS de la taxifoline-4'-méthyléther.	157

Figure 123 : Fragmentations de la taxifoline-4'-méthyléther.....	158
Figure 124 : Spectre MS/MS du 6-méthylkaempférol.	159
Figure 125 : Fragmentations du 6-méthylkaempférol.	159
Figure 126 : Spectre MS/MS de l'isorhamnétine.....	160
Figure 127 : Fragmentations de l'isorhamnétine	160
Figure 128 : Spectre MS/MS de la lutéoline.....	161
Figure 129 : Fragmentations de la lutéoline.	162
Figure 130 : Spectre MS/MS du massonirésinol.....	163
Figure 131 : Fragmentations du massonirésinol.	163
Figure 132 : Spectre MS/MS du 5'-méthoxylaricirésinol.	164
Figure 133 : Fragmentations du 5'-méthoxylaricirésinol.....	165
Figure 134 : Spectre MS/MS du 7-hydroxymatairésinol.....	166
Figure 135 : Spectre MS/MS du 7-hydroxymatairésinol.....	166
Figure 136 : Spectre MS/MS de de la 1-(3,4 dimethoxyphenyl)-2,3-propanediol.	167
Figure 137 : Fragmentations de la 1-(3,4 dimethoxyphenyl)-2,3-propanediol.....	168
Figure 138 : Répartition des métabolites identifiés dans les extraits d'aubier, de duramen et de la zone de transition.....	172
Figure 139 : Fragment d'un réseau moléculaire réalisé à partir des fractions du duramen. ..	174
Figure 140 : Variation de l'aire de la taxifoline dans chaque zone en fonction des saisons. .	177
Figure 141 : Variation de la quantité relative de taxifoline au cours des saisons.	178
Figure 142 : Variation de la quantité relative de taxifoline-3'-O-glucoside au cours des saisons.....	179
Figure 143 : Variation de la quantité relative de quercétine au cours des saisons.	179
Figure 144 : Variation de la quantité relative des 3 dihydroflavonols au cours de l'année. ..	181
Figure 145 : Variation de la quantité relative de la pinocembrine (m/z 255 ; t_R = 24,41 min) au cours de l'année.....	182
Figure 146 : Variation de la quantité relative de la quercitrine (m/z 447 ; t_R = 11,78 min) au cours de l'année.....	182
Figure 147 : Chromatogramme MRM de la catéchine et l'épicatéchine.....	183
Figure 148 : Variation de la quantité relative des deux flavan-3-ol au cours de l'année.	184
Figure 149 : Variation de la quantité relative des deux dimères de flavonoïdes au cours de l'année.....	185
Figure 150 : Chromatogramme MRM de la silybine B et l'isosilybine A.	185

Figure 151 : Variation de la quantité relative des deux flavonolignanes au cours de l'année.	186
Figure 152 : Variation de la quantité relative du 7-hydroxymatairésinol (m/z 373) au cours de l'année.....	187
Figure 153 : Variation de la quantité relative du méthyl-3-[3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxypropyl]-2,4,6-trihydroxybenzoate (m/z 349 ; $t_R = 10,49$ min) au cours de l'année...	188
Figure 154 : Variation de la quantité de l'acide dihydrotodomatique (m/z 253 ; $t_R = 25,57$ min) au cours de l'année.	189
Figure 155 : Variation de la quantité du composé à m/z 347 ($t_R = 25,02$ min) au cours de l'année.....	189

Table des tableaux

Tableau 1 : Résultats des extractions réalisées à partir d'échantillons d'aubier et de duramen.	68
Tableau 2 : Résultats des extractions effectués avec l'ASE 150®	69
Tableau 3 : Résultats des extractions réalisées sur les échantillons de bois prélevés aux 4 saisons de l'année.	70
Tableau 4 : Résultats des extractions réalisées sur la zone de transition en utilisant l'extraction manuelle et l'extracteur ASE 150.	91
Tableau 5 : Composés identifiés dans l'extrait d'aubier.....	121
Tableau 6 : Composés identifiés dans l'extrait du duramen	136
Tableau 7 : Composés identifiés dans l'extrait de la zone de transition	169
Tableau 8 : Conditions d'analyses en MRM des différents composés sélectionnés.....	176



Introduction générale

Le bois est un matériau qui symbolise le « temps » et « l'âge ». Le temps parce qu'il est produit par les arbres qui deviennent récoltables après une période assez longue de croissance variant selon l'espèce et milieu. L'âge parce qu'il est dans l'histoire, le plus vieux matériau utilisé par l'homme. C'est probablement dû à la faible dépense énergétique (les bois sont coupés, rompus, sciés,...) qui est nécessaire à sa transformation. A cela s'ajoute aussi, le rôle de « forêt-abri » et « forêt nourricière » assuré par la forêt depuis l'origine de l'humanité permettant à l'homme de trouver un refuge et une matière première en abondance [1].

Aujourd'hui, l'utilisation des combustibles fossiles (gaz naturel, pétrole,...) et la déforestation engendrent une augmentation du taux de gaz carbonique dans l'atmosphère qui était de 280 ppm avant la révolution industrielle, en 1750 et est passé aux alentours de 400 ppm en 2015 [2] sans cesser d'augmenter jusqu'en 2017. L'augmentation des gaz à effet de serre est principalement dû au gaz carbonique. La production de bois n'entraîne pas la formation de gaz carbonique mais, elle en consomme. Le bois est un matériaux qui est produit et recyclé naturellement depuis des milliers d'années [1]. Il possède deux caractéristiques importantes qui sont la légèreté structurelle et la résistance mécanique. De plus, certains bois présentent une durabilité naturelle suffisante qui leur permettent de résister aux agressions dus aux insectes (*Cerambycidae*), aux champignons (*Ascomycètes* et *Basidiomycètes*) et termites (*Reticulitermes grassei*) [1]. Les métabolites secondaires (polyphénols et terpènes) contenus dans les bois possèdent diverses propriétés (antifongiques, insecticides, antioxydantes,...) qui sont à l'origine de leur durabilité naturelle. Ainsi, le bois suscite un intérêt croissant dans l'industrie future et plus précisément dans le domaine de la construction.

En Europe, les bois de résineux sont très prisés dans la construction moderne car ils ont la particularité d'être très disponibles (plusieurs forêts de résineux sont répertoriées dans les pays d'occident et d'orient) et économiques. Les bois d'épicéa (*Picea abies*), du pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et du sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) qui sont très répandus en Europe font partie des principaux bois de résineux utilisés dans la construction [3]. Le sapin de Douglas ou *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco est une espèce de conifères (arbres possédant des feuilles en forme d'écailles ou d'aiguilles) originaire d'Amérique du Nord. Il a été introduit en Europe au XIXe siècle [4]. En dehors des sols compacts contenant

du calcaire, le sapin de Douglas peut s'adapter à toutes les formes de sols. C'est l'une des rares espèces d'arbres implantés en Europe qui a acquis une grande importance sur ce continent pour deux raisons : sa productivité élevée et son adaptation physiologique [4]. En France, cette espèce a été introduite avant 1850, mais les plantations de sapin de Douglas se sont réellement développées après la Seconde Guerre Mondiale dans le cadre de programmes de reboisement. En 1993, le reboisement a permis au sapin de Douglas d'obtenir une superficie de 330 000 hectares (ha) [4]. Le bois de Douglas est l'un des bois de construction les plus employés au monde pour ses qualités mécaniques dans des domaines tels que la menuiserie, l'ameublement et l'architecture. Dans la région du Limousin, il est la première essence utilisée comme bois de construction (charpente, parement, plancher, bois collé). Ce bois se distingue de celui d'autres conifères répandus dans les forêts européennes par sa teinte caractéristique. En effet, lorsque le tronc de l'arbre est sectionné, il y a une zone centrale rouge marquée correspondant au bois de cœur entouré de l'aubier jaune pâle. La coloration des bois provient des pigments polyphénoliques qui sont également impliqués dans les mécanismes de défense chimique contre les pathogènes chez les plantes ligneuses. Dans le sapin de Douglas, les métabolites secondaires du bois de cœur seraient à l'origine de la protection du bois contre les insectes (Cerambycidae) et les microorganismes (Ascomycètes, Basidiomycètes,...) externes par des mécanismes complexes [5].

Ainsi, notre objectif est d'identifier dans un premier temps les métabolites secondaires présents dans l'aubier, la zone de transition et le duramen puis, de comparer dans un second temps les profils métaboliques d'échantillons de bois de Douglas prélevés aux 4 saisons afin de mettre en évidence la variabilité de ces composés en fonction des saisons ainsi que le lien potentiel entre la période de récolte du bois et sa résistance aux pathogènes extérieurs (insectes, champignons, bactéries,...). Ce travail fait partie intégrante de la Chaire Ressource Forestières et Usages du Bois (SylvaLIM) qui a pour objectif d'améliorer la durabilité du bois de Douglas en sélectionnant les géotypes les plus résistants. Ce manuscrit se subdivise en 3 parties. Il débute par quelques rappels bibliographiques suivi de la présentation de la partie matériel et méthodes. La troisième et dernière partie a été dédiée à la présentation des résultats obtenus : description des métabolites identifiés suite à la purification des extraits de bois de Douglas et leur analyse par LC-MS/MS ; discussion des résultats issus de la quantification relative des métabolites sélectionnés et présents dans les extraits provenant d'échantillons de bois prélevés aux 4 saisons.

Partie I. Etude bibliographique

I. Le règne végétal

Les végétaux se subdivisent en deux grands embranchements : les cryptogames (fougères, prêles, mousses, champignons, lichens) correspondant aux plantes sans fleurs ni graines et les spermaphytes qui sont des plantes à graines [6].

Gymnospermes et angiospermes

Les spermaphytes sont repartis en deux sous-embranchements qui sont les angiospermes et les gymnospermes. Les angiospermes ont des fleurs évoluées et une graine enfermée dans un fruit. Ils sont scindés en monocotylédones (graines avec un cotylédon ou feuille primitive) et dicotylédones (graines avec deux cotylédons) dont font partie les arbres et arbustes appelés « feuillus ». Les gymnospermes sont des plantes à fleurs primitives appelées cônes avec des graines non protégées par un fruit. Ces derniers comportent majoritairement des arbres appelés « résineux » qui possèdent des feuilles réduites nommées aiguilles.

II. Organisation générale des spermaphytes

Un spermaphyte (figure 1) est composé de :

- Racines qui sont habituellement souterraines et jouent un rôle dans l'absorption de l'eau et des sels minéraux qui sont présents dans le sol, l'accumulation de réserves (amidon, saccharose, inuline) et la fixation de la plante au sol [7].
- Tige qui est un organe aérien ou souterrain correspondant à l'axe plus ou moins ramifiée de la plante [8]. Il contient des tissus de conduction dont la fonction est le transport de la sève. Cette dernière est présente sous deux formes : la sève brute ou ascendante qui est constituée d'eau et de substances naturelles puisées dans le sol et la sève élaborée ou descendante enrichie en métabolites (saccharose, mannitol,..) produits par la photosynthèse (processus qui permet à la plante de synthétiser des molécules organiques à partir de minéraux sous l'influence de la lumière) qui sont acheminés vers les parties inférieures de la plante [8]. Au fil des ans, les tiges durables élaborent des formations secondaires et deviennent des troncs d'arbres encore appelés

bois [8]. Sur un tronc sectionné, il apparaît des cercles concentriques qui correspondent à des couches annuelles d'accroissement appelée cernes.

- Feuilles qui sont des organes aériens portés par la tige. Chez les angiospermes, elles sont caractérisées par un limbe (lame verte) prolongeant un pétiole qui s'insère sur la tige [8] tandis que chez les gymnospermes elles sont en général sous formes d'aiguilles ou d'écailles [6]. Cet organe est pour un grand nombre de plantes le siège de la photosynthèse et de la transpiration (élimination d'eau sous forme de vapeurs chez les végétaux) [7].
- Fleurs qui sont les organes reproducteurs de la plante. Les fleurs d'angiospermes sont évoluées avec la présence de pièces ou verticilles protecteurs (calice et corolle) et reproducteurs (androcée, gynécée) tandis que chez les gymnospermes les organes reproducteurs sont archaïques et sous forme de cônes [7].
- Fruits qui sont des organes issus de la transformation de la fleur après la fécondation (fruits simples) ou de l'inflorescence qui correspond au regroupement de plusieurs fleurs sur un même axe (fruits composés) [7].
- Graines qui sont des organes qui résultent de la fécondation et de l'évolution de l'ovule fécondé de la plante [8].

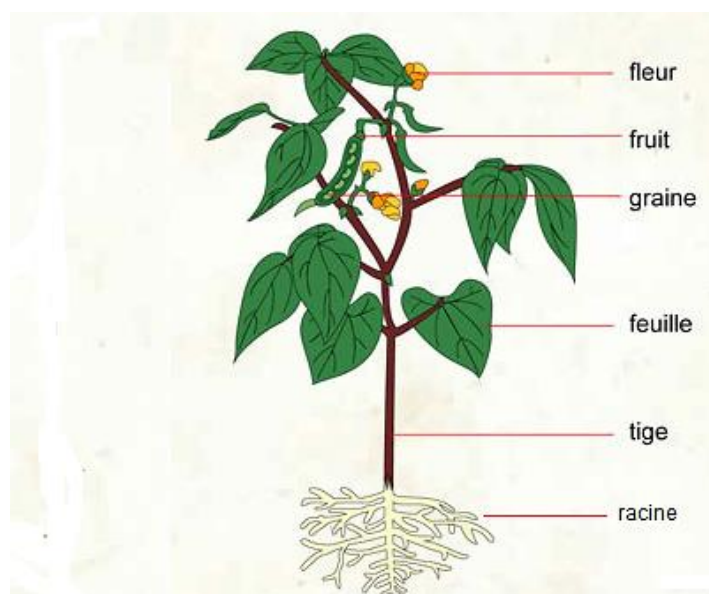


Figure 1 : Schéma général d'une plante à fleurs



III. Les différents tissus de la tige des spermaphytes

La tige comme tous les organes végétaux se forme à partir de tissus spécialisés apparaissant lors de la division cellulaire et appelés méristèmes [9]. Il existe deux grands groupes :

- Les méristèmes primaires présents à l'extrémité des racines et dans les bourgeons qui assurent la croissance des plantes en hauteur.
- Les méristèmes secondaires qui sont formés au cours du développement post-embryonnaire. Ils apparaissent sous forme de couches continues de cellules, appelées assises qui assurent la croissance en largeur par la production de cellules alignées dans le prolongement de la cellule méristématique qui leur a donné naissance.

Au niveau des tiges, l'activité des méristèmes caulinaires (qui font partie des méristèmes primaires) conduit à la mise en place de la structure primaire de la tige [7] composée de 4 grands ensembles (figures 2A et 2B) [10] qui sont :

- L'épiderme qui est une assise de cellules superficielles (cellules de revêtement et cellules stomatiques) permettant le contact avec le milieu atmosphérique (échanges gazeux avec l'atmosphère). Il joue également un rôle dans la protection contre les agressions externes (parasites et autres microorganismes) et la dessiccation (élimination de l'eau contenu dans les tissus et organes végétaux). Une lignification de cellules épidermiques peut se réaliser et entraîner la formation d'un épiderme lignifié.
- Les parenchymes qui constituent la masse principale de l'organe. Ils sont constitués de cellules dont la vacuole est supérieure à 80% du volume cellulaire. Leur paroi est fine et traversée par plusieurs plasmodesmes (orifices présents sur les parois de cellules végétales). Les échanges gazeux sont intenses au niveau de ces tissus et sont principalement assurés par le parenchyme lacuneux. En dessous de l'épiderme est situé le parenchyme cortical. Le parenchyme médullaire encore appelé moelle est présent dans la partie centrale de la tige.
- Les tissus de soutien sont le collenchyme et le sclérenchyme. Le collenchyme est un tissu résistant et extensible qui est présent dans les jeunes tiges et se forme très précocement en périphérie. Il joue un rôle dans l'élongation de la plante. Le

sclérenchyme est un tissu composé de cellules mortes qui possèdent des parois épaissies par un dépôt de lignine à l'origine de la rigidité de la plante.

- Les tissus conducteurs différenciés qui peuvent apparaître chez les dicotylédones et les gymnospermes. Ils constituent le système vasculaire de la plante et assurent une connexion entre les différents organes. Ce sont le xylème I constitué de trachéides ou de vaisseaux permettant le transport de la sève brute et le phloème I composé de cellules criblées qui assurent le transport de la sève élaborée. Les trachéides possèdent des ponctuations (zone mince de la paroi des cellules végétale) qui sont partiellement perméables. Le protoxylème et le métaxylème sont des tissus précurseurs correspondant au xylème primitif.

L'activité des méristèmes primaires peut être suivie de celle des méristèmes secondaires qui vont conduire à la formation des assises concentriques de cellules qui se différencient en tissus secondaires. Ces assises sont le cambium et le phellogène. Le cambium produit le liber ou le phloème II vers l'extérieur et le xylème II vers l'intérieur tandis que le phellogène produit le suber ou liège vers l'extérieur et le pheloderme vers l'intérieur. Le phellogène, le pheloderme et le liège forment un ensemble appelé périderme.

Chez certains résineux (les genres *Pseudotsuga*, *Picea*, *Larix* et *Pinus*), il existe des canaux résinifères qui sont des cavités tubulaires formées par une ou plusieurs couches de cellules de parenchymes dont la plus externe est sécrétrice. Ils se développent en suivant deux directions : axiale et radiale [9].

Dans le cas de la tige évoluée ou bois, il existe des différences entre les angiospermes et les gymnospermes. Chez les angiospermes, le xylème est dit hétéroxylé car il est constitué de fibres qui ont un rôle de soutien dans la plante et de vaisseaux qui conduisent la sève brute. Le xylème des gymnospermes est dit homoxylé, parce qu'il contient uniquement des trachéides qui sont des cellules sclérifiées (mortes) et vidées de leur contenu pour devenir des capillaires de conduction de la sève.



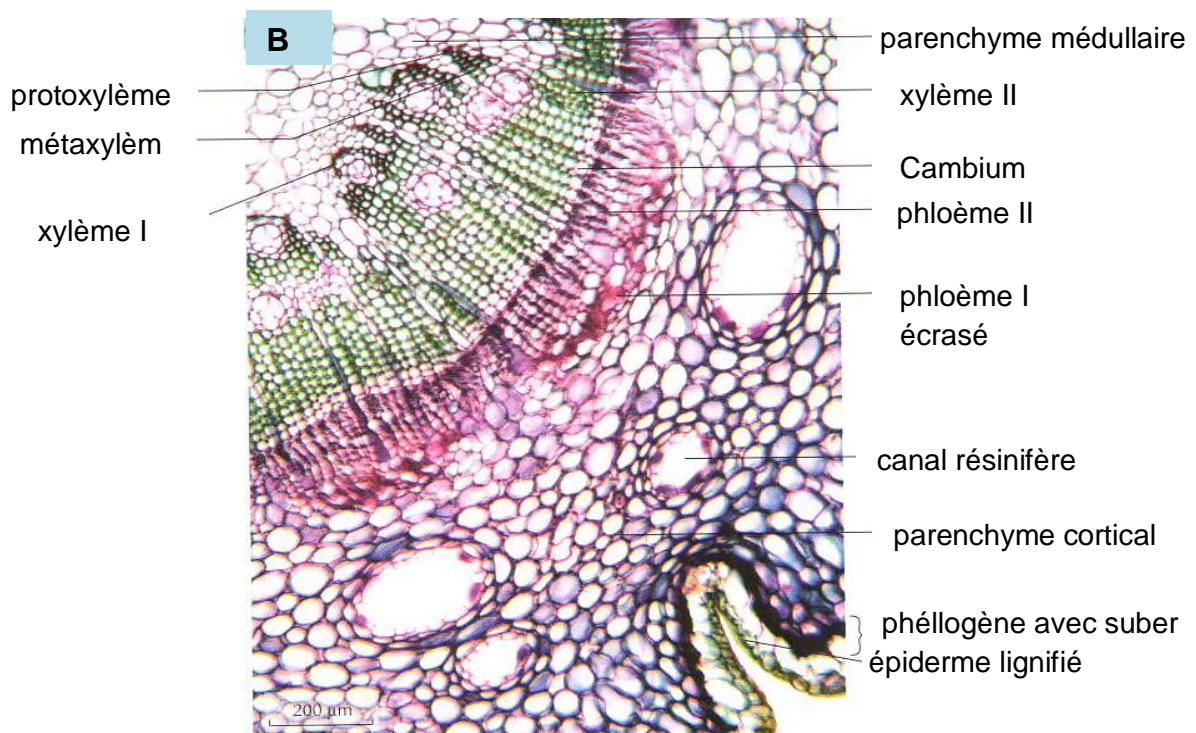
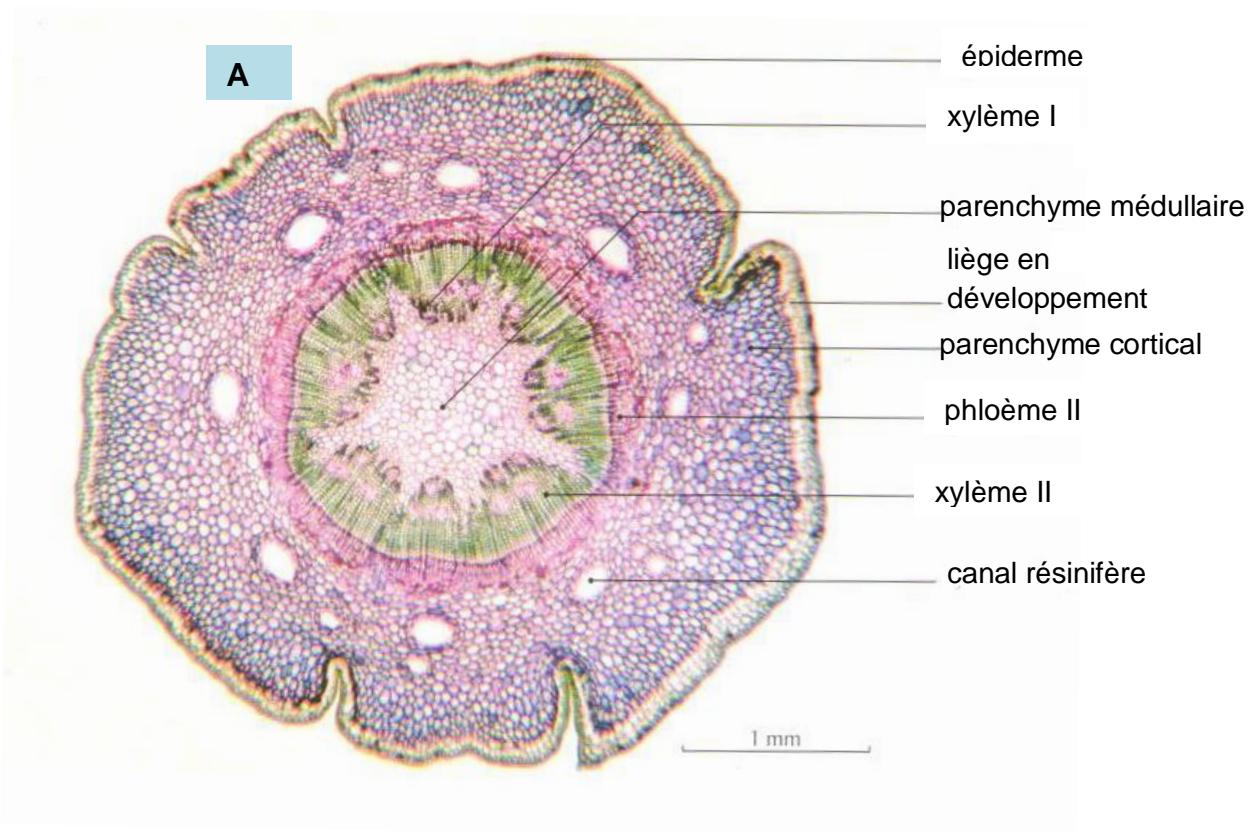


Figure 2 : Coupes transversales d'une tige de pin (coloration carminot vert)

IV. Le bois des gymnospermes

IV.1. Morphologie

La structure du bois de gymnosperme est beaucoup plus simple et homogène que celle des angiospermes. Les trachéides qui servent au soutien et à la conduction de la sève brute constituent 90% du bois de gymnosperme. En fonction du diamètre des trachéides, on peut diviser le bois en deux :

- ✓ Le bois du printemps qui possède des trachéides plus larges en raison de la disponibilité et de son besoin en eau.
- ✓ Le bois d'été qui contient des trachéides plus fines car l'eau est plus rare. Au niveau de leurs extrémités, les trachéides se chevauchent et les ponctuations sont à l'origine de la communication entre trachéides.

D'une manière générale, le bois est constitué de 3 zones principales qui en allant de l'extérieur vers l'intérieur du tronc sont l'aubier, la zone de transition et le duramen (figure 3) [9].

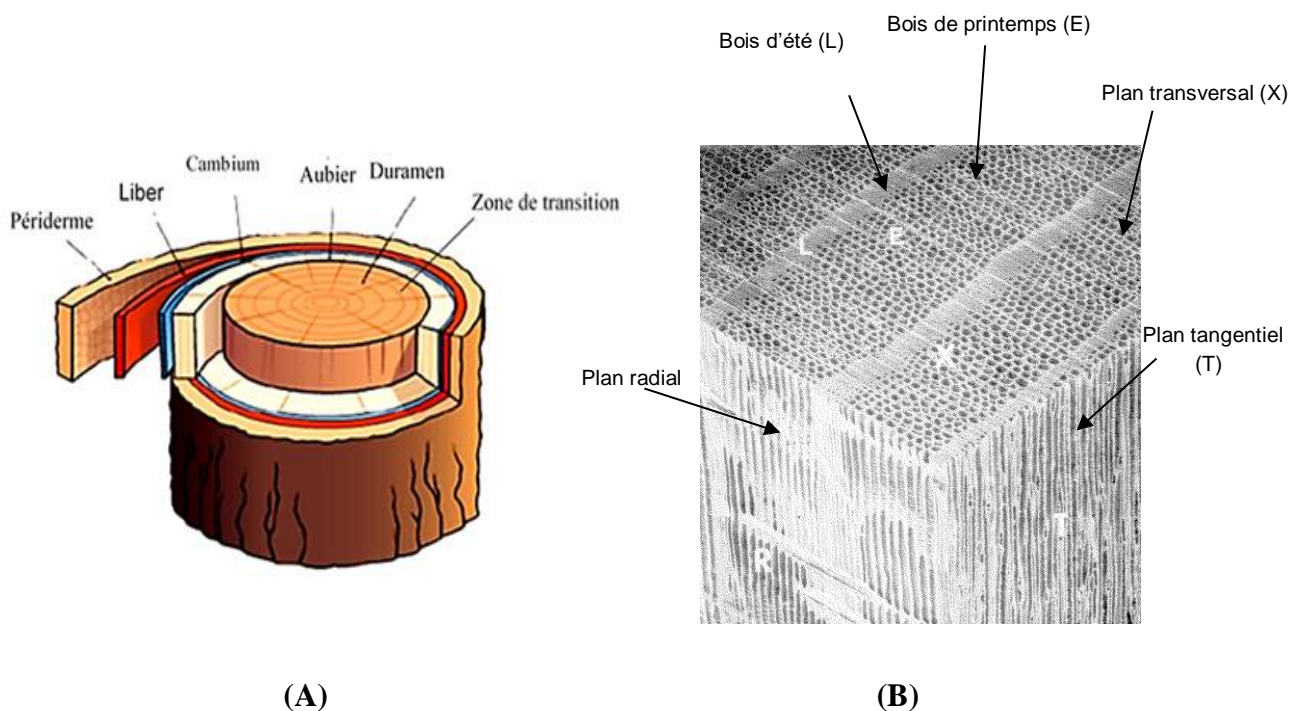


Figure 3 : Coupe transversale du tronc d'un arbre (A) et observation microscopique d'un bois de résineux (B).

IV.1.1. L'aubier

L'aubier correspond aux couches successives de trachéïdes qui apparaissent sous le cambium. Il est situé entre le cambium et la zone de transition. Son épaisseur varie généralement de 4 à 6 cm. La porosité partielle de la paroi des trachéïdes rend l'aubier perméable. L'aubier a tendance à se dégrader facilement car il contient peu de métabolites secondaires de défense (jouent un rôle dans la protection du bois contre les agents pathogènes extérieurs) mais aussi parce qu'il contient des sucres favorables à la nutrition et au développement des champignons [11]. C'est le cas par exemple des champignons de types Ascomycètes et Basidiomycètes qui attaquent l'aubier en provoquant une nécrose et une détérioration des tissus entraînant la décoloration et la décomposition du bois [11].

En effet, les cellules des champignons consomment une grande quantité d'énergie stockée dans l'aubier en réponse à une incision [12]. Après quelques années, les trachéïdes qui constituent l'aubier, cessent d'alimenter l'arbre parce qu'elles commencent à se boucher et à s'entourer de diverses substances telles que les résines et les tanins. Ce processus de transformation entraîne la formation du duramen (duraminisation) qui est la zone la plus interne du bois [13].

IV.1.2. La zone de transition

C'est une partie étroite située entre le duramen et l'aubier. Elle correspond aux 2 à 3 derniers cernes (selon les années) qui délimitent la partie interne de l'aubier [14]. La zone de transition est de couleur pale et constituée de cellules dépourvues d'amidon. Dans certaines espèces de gymnospermes comme le pin, elle contient une faible quantité de métabolites de défense mais bénéficie d'une forte concentration en pyridoxine et biotine [15]. Contrairement à l'aubier, elle a une faible teneur en eau et est souvent imperméable aux liquides [16].

IV.1.3. Le duramen

C'est la zone la plus interne du bois composé de cellules mortes. Il est aussi appelé bois de cœur. Il provient d'une partie du xylème et chez certaines espèces tels que le sapin Douglas (*Pseudotsuga mensiezii*) et le mélèze (*Larix decidua*), il peut avoir une coloration beaucoup plus foncée que l'aubier. D'autres espèces du genre *Picea* ne possèdent pas cette différence de couleur entre l'aubier et le duramen. Pour ces espèces, c'est la porosité qui permet de distinguer ces deux zones du bois, celle de l'aubier étant supérieure à celle du duramen. On note également la présence d'alternance de zones claires et sombres qui



correspondent aux cernes annuels dont chacune d'elle correspondent à la production de cellules de bois au cours d'une année. Ce sont des cellules mortes dans lesquelles les substances de réserves sont absents tandis que d'autres substances sont présentes (tanins, résines, lignines,...).

Le duramen possède des propriétés telles que sa résistance naturelle à la dégradation par les microorganismes et les insectes. Cela peut avoir une grande influence dans l'utilisation et la production du bois [5].

- **Paroi de la cellule végétale : structure et composition**

Une cellule végétale est entourée d'une paroi constituée de polysaccharides, de lignines et de protéines. Le principal composant de la paroi cellulaire végétale est la cellulose représentant 40 à 60 % de la biomasse [17]. Cette paroi évolue selon le stade de développement de la cellule donnant ainsi naissance aux parois primaires et secondaires [18]. La paroi primaire est présente dans toutes les cellules végétales tandis que la paroi secondaire supplémentaire est présente dans certaines cellules spécialisées comme les trachéides, les scléroïdes, les fibres et les vaisseaux [19].

- **La paroi primaire**

La première couche qui se forme est la lamelle moyenne qui permet la liaison entre deux cellules adjacentes. Elle est essentiellement constituée de pectines. La paroi primaire est ensuite élaborée grâce aux cellules méristématiques en phase de croissance. Pendant cette phase, la paroi est fine et flexible favorisant ainsi l'élongation cellulaire [20]. Son squelette est formé par les microfibrilles de celluloses d'environ 3 nm de diamètre ; qui résultent de l'assemblage parallèle de 36 chaînes de celluloses. Elles sont reliées entre elles par des hémicelluloses. Les pectines et les liaisons non covalentes permettent d'associer les hémicelluloses aux microfibrilles et assurent ainsi le maintien de la structure (figure 4) [21].



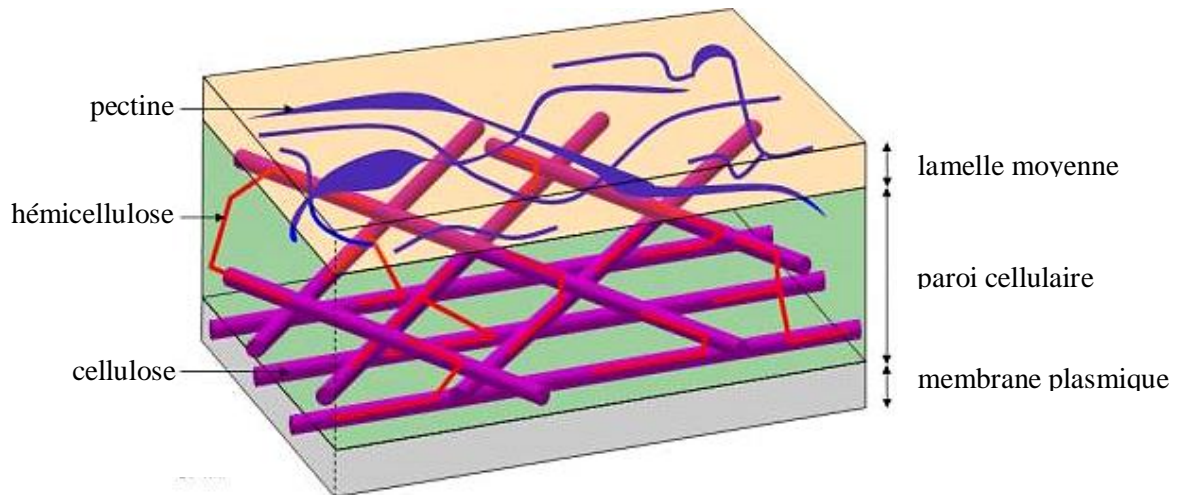


Figure 4 : Organisation des polymères au sein de la paroi primaire.

- La paroi secondaire

Il arrive que dans certains tissus, une paroi secondaire se développe lorsque la croissance cellulaire est achevée. Cette paroi est majoritairement composée d'hémicellulose et de cellulose microcristalline qui sont renforcées par le dépôt de polymères hydrophobes appelés lignines. La paroi secondaire devient alors plus rigide et moins perméable à l'eau. La plupart des cellules meurent après avoir synthétisé la paroi secondaire [18].

IV.2. Composition chimique

Le bois présente une grande hétérogénéité et complexité dans sa composition chimique. Il est constitué de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont les polysaccharides (cellulose, l'hémicellulose, les pectines), les lipides, et les protéines. En dehors des lipides qui sont présents dans la membrane plasmique, les autres polymères sont retrouvés à l'intérieur de la paroi cellulaire et représentent environ 95% de la masse du bois [22]. Les 5% restant de la masse du bois appartiennent aux métabolites secondaires qui sont principalement les polyphénols et les terpènes [22]. Ce sont des molécules de faibles masses moléculaires qui sont déposées à la surface de la paroi cellulaire pendant la formation du duramen (duraminisation) par sécrétion. Ils peuvent également être présents dans les exsudats d'arbres incisés. Malgré leur faible concentration dans le bois, certains métabolites secondaires peuvent être des marqueurs chimiques (taxifoline, quercétine,...) d'espèces d'arbre. Ces métabolites secondaires améliorent la résistance du bois face à la détérioration et sont facilement entraînés par des solvants organiques (éther, acétone, éthanol,

dichlorométhane, ...) [22]. Ils ont également une influence sur d'autres caractéristiques du bois telles que leur parfum [23] et leur couleur [5]. Dans les cendres de bois on retrouve les composés inorganiques. Leur concentration varie entre 0,1 et 1% dans les bois des régions tempérées. Les éléments chimiques que l'on rencontre majoritairement dans ce bois sont le calcium, le potassium, le sodium, le manganèse, le phosphore et le chlore [24].

IV.2.1. Les métabolites primaires

Ce sont des composés qui sont principalement produits par le métabolisme oxydatif (respiration, glycolyse,...) et la photosynthèse [25]. Ils forment généralement des polymères (polysaccharides, lipides et protéines) qui ont un rôle dans l'assimilation des nutriments et le développement des plantes [26].

IV.2.1.1. La cellulose

La cellulose est la molécule organique la plus abondante et correspond à environ la moitié de la biomasse [27]. Elle est également le biopolymère le plus valorisé notamment dans la fabrication de la pâte à papier [27] et les fibres textiles [28]. La cellulose est un homopolymère linéaire de β -D-glucose. L'unité de répétition, le cellobiose, est constitué de deux D-glucopyranose en conformation 1C_4 . Le nombre d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose correspond au degré de polymérisation (DP) qui varie en fonction de sa provenance et sa localisation au niveau de la paroi cellulaire [27]. La cellulose est un polymère de haut poids moléculaire car il peut atteindre $2,5 \cdot 10^6$ Da. Elle est insoluble dans l'eau. Ainsi pour déterminer son DP, la cellulose doit être solubilisée sans être dégradée. Elle peut être solubilisée dans les complexes inorganiques comme la liqueur de schweitzer, les bases comme NaOH et les acides comme acide acétique [29]. Les liaisons covalentes qui relient les unités de β -D-glucose (figure 5) permettent à la cellulose de résister à la traction. Il existe aussi des liaisons hydrogène intramoléculaires qui stabilisent et rigidifient la cellulose ainsi que celles qui sont intermoléculaires et permettent la liaison entre plusieurs macromolécules en les disposant parallèlement. L'association de nombreuses chaînes de celluloses entraîne la formation de structures stables et rigides appelées fibrilles de l'ordre de 3 à 5 nm [27].

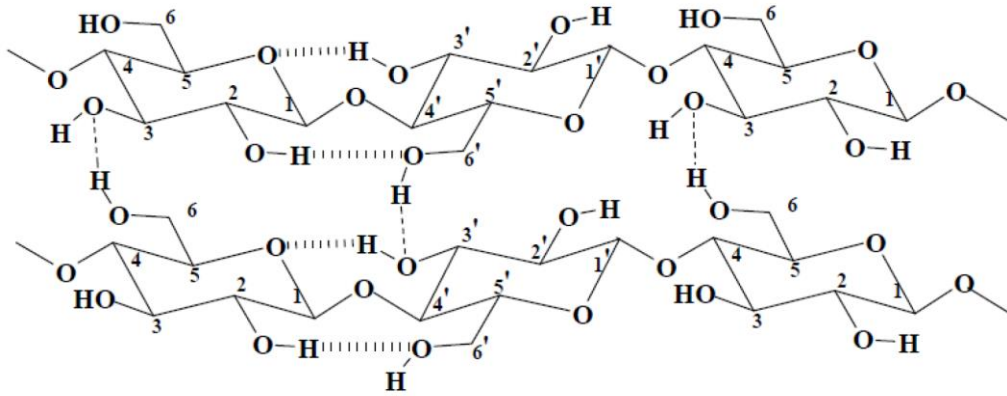


Figure 5 : Structure de la cellulose.

Une fibrille peut être divisée en deux parties : une externe et une interne (figure 6A). On note également la présence de régions cristallines de cellulose (environ 60 nm de longueur) dont la formation est due à l'association entre une grande quantité de liaisons hydrogène et une forte résistance latérale. Les fibrilles de cellulose s'associent entre elles pour former des ensembles appelés microfibrilles dont la section est de l'ordre de 25 à 30 nm. La cellulose possède un degré de cristallinité élevé (entre 60 et 97 %). Ces molécules ont une longueur comprise entre 2500 et 5000 nm et peuvent former plusieurs régions cristallines et amorphes (figure 6B) [30].

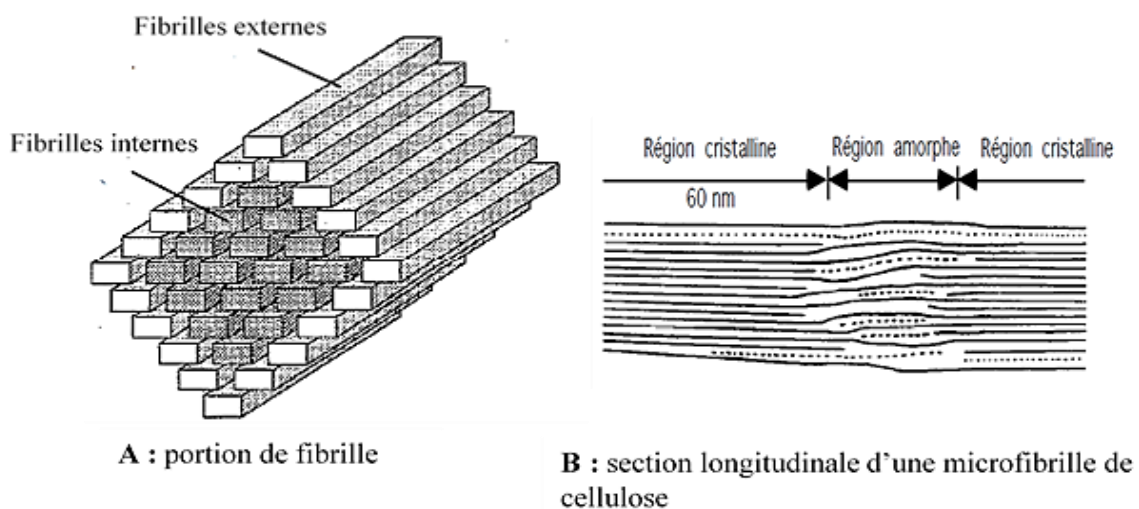


Figure 6 : Structures générales de la fibrille et de la microfibrille d'une cellulose

IV.2.1.2. L'hémicellulose

C'est le deuxième polysaccharide le plus abondant après la cellulose. L'hémicellulose possède une masse moléculaire plus faible que celle de la cellulose et sa structure chimique est moins régulière en raison de la présence d'unités osidiques différentes dans ses chaînes

polysaccharidiques [31]. C'est donc un polymère constitué d'unités osidiques différents (pentoses, hexoses, acide uroniques et déoxyhexoses) reliées entre elles par des liaisons osidiques β [32]. Il existe plusieurs familles d'hémicellulose comme les glucogalactomannanes et des arabinoglucuronoxylanes qui sont représentatifs du sapin de Douglas [33]. L'hémicellulose est amorphe et possède une chaîne principale avec des ramifications latérales. Mais lorsqu'elle est associée à la cellulose elle peut montrer une certaine cristallinité.

IV.2.1.3. Les pectines

C'est un groupe d'hétéropolysaccharides peu abondants dans le bois. Elles sont composées d'une structure polymérique dont la chaîne principale est constituée d'unités d'acide α -D-galacturonique appelées également région homogalacturonane au niveau duquel s'insèrent des résidus α -L-rhamnosyles (figure 7) [34].

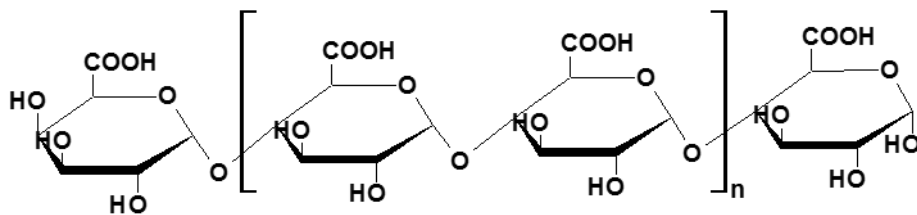


Figure 7 : Structure chimique de la région homogalacturonane.

Sur les unités d'acides galacturoniques ou de rhamnoses peuvent se fixer des chaînes latérales d'oses neutres (L-arabinoses, D-galactose, D-xylose, ...) qui formeront plusieurs ramifications rendant la molécule plus complexe [35]. Les pectines peuvent donc être subdivisées en deux domaines : les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes (figure 8) [36].



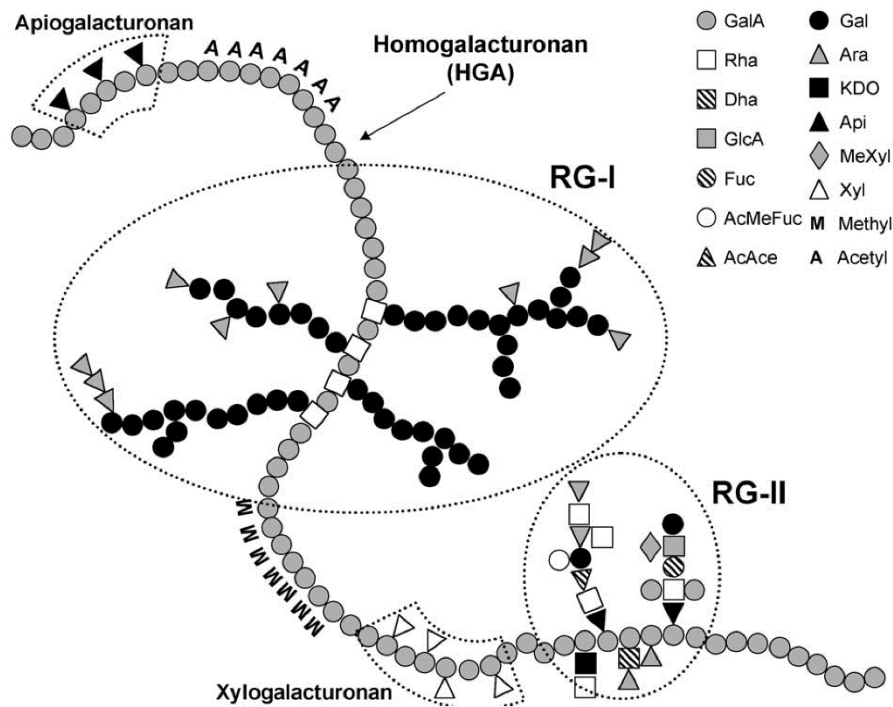


Figure 8 : Structure primaire des pectines.

IV.2.1.3.1. Les homogalacturonanes

Ce sont des polymères d'acides galacturoniques qui après estérification des fonctions acides carboxyliques par le méthanol peuvent être répartis en deux groupes en fonctions de leur degré de méthylestérification (DM) [37]. Ainsi à l'aide du DM qui correspond au pourcentage d'acide galacturonique estérifié, on peut identifier des pectines faiblement méthylestérifiées (FM) de DM < 50 et des pectines hautement méthylestérifiées (HM) de DM > 50.

La liaison entre deux chaînes d'homogalacturonane se réalise, par l'intermédiaire du calcium, à partir des fonctions acides et 4 fonctions alcool : on obtient une structure nommée « egg-box » ou « boîte à œuf » (figure 9) [37]. Les carbones anomériques et hémiacétaliques peuvent également contribuer à la stabilisation des chaînes homogalacturonanes par des liaisons de faible énergie comme celles de Van der Waals. Le DM joue un rôle majeur sur l'extractibilité des pectines. En effet, les pectines HM ne pouvant pas être stabilisées sont extraites avec de l'eau chaude tandis que les pectines FM stables seront extraites en utilisant des chélateurs de calcium tel que l'EDTA.

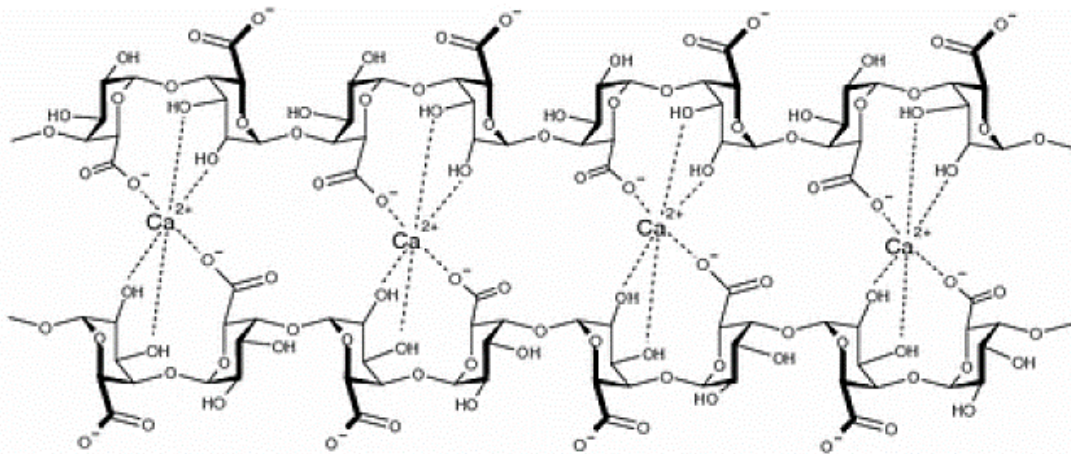


Figure 9 : Deux chaînes homogalacturonanes stabilisées par des ions calcium formant une structure en « egg-box ».

IV.2.1.3.2. Les rhamnogalacturonanes

Il existe deux types de rhamnogalacturonanes : les rhamnogalacturonanes de I (RGI) et les rhamnogalacturonanes II (RGII). Les RGI qui sont majoritaires, constitués d'enchaînement de résidus α -D-galactopyranosyles intercalés par des résidus α -L-rhamnopyranosyles qui sont liés respectivement en O-4 et O-2. Cependant, environ 50% des résidus rhamnosyles sont substitués en O-4 par des chaînes latérales qui peuvent correspondre à des arabinanes, arabinogalactanes ou des galactanes [38].

Les RGII possèdent une structure très complexe composée d'une chaîne principale comportant uniquement des acides galacturoniques substitués par 4 chaînes latérales désignées par A, B, C, D. Ces chaînes latérales qui présentent également des ramifications sont constituées de plusieurs résidus glycosylés différents ainsi que des sucres rares tels que le 2-O-méthylfucose et le 2-O-méthylxylose [34].

IV.2.1.4. Les lipides

Ils sont constitués d'acides gras insaponifiables, de triglycérides (esters d'acides gras) et d'alcools. Les acides oléique (C_{18}) et linoléique (C_{18}) sont les acides gras les plus abondants tandis que le lignocérol (C_{24}), l'arachinol (C_{20}) et le béhénol (C_{22}) sont les alcools les plus représentatifs (figure 10) [39]. Une grande quantité de triglycérides est synthétisée par les cellules du parenchyme que l'on retrouve au sein de l'aubier [40]. Cependant lors de la formation du duramen, les triglycérides sont hydrolysés par des enzymes lyases entraînant l'augmentation de la quantité d'acides gras libres dans cette zone du bois. La zone de

transition contient plus de triglycerides que le duramen mais renferme peu d'acides gras libres [41].

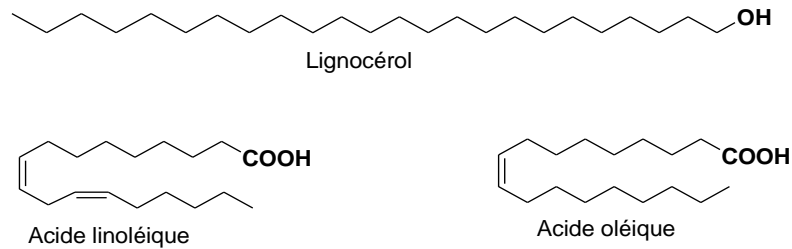


Figure 10 : Structure chimique de composés aliphatiques présents dans le bois de gymnospermes.

IV.2.1.5. Les protéines

Ce sont principalement les protéines riches en glycine (GRPs), arabinogalactane (AGPs), en proline (PRPs), les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs) ou extensine et les protéines chimériques (association de plusieurs protéines différentes) [42]. Elles ont des fonctions structurales tel que leur rôle dans le développement des tissus vasculaires mais peuvent également jouer un rôle important dans la défense contre les agressions extérieures (incisions du bois) et les facteurs environnementaux (sécheresse) [43].

IV.2.2. Les métabolites secondaires

Ce sont des composés issus d'un métabolisme complexe et sont souvent produits en réponse aux contraintes environnementales. Ils permettent aux plantes de développer une résistance face aux agents pathogènes extérieurs, stress abiotiques et d'autres facteurs [25].

IV.2.2.1. Les terpènes

Ce sont des composés biosynthétisés par la voie du mévalonate par condensation des unités isopréniques. Il existe plusieurs classes de terpènes qui se différencient par le nombre de carbones constituant la molécule. Ainsi, on distingue les monoterpènes (10 carbones), sesquiterpènes (15 carbones), diterpènes (20 carbones), sesterterpènes (25 carbones), triterpènes (30 carbones), tétraterpènes (40 carbones) et les polyterpènes (supérieur à 40 carbones). Les classes de terpènes retrouvées principalement dans le bois de gymnospermes [44] sont les monoterpènes comme le limonène et le myrcène [45], les sesquiterpènes tel que

le δ -sélinène et les diterpènes dont les plus courants sont les dérivés d'acides abiétique (figure 11) [46].

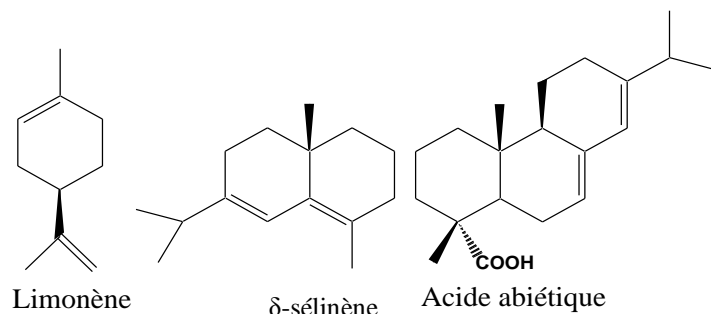


Figure 11 : Structure chimique de terpènes retrouvés dans le bois des gymnospermes.

Ces terpènes jouent un rôle important dans la défense contre les pathogènes fongiques [46] et les insectes herbivores [47]. Au niveau du bois de gymnosperme, la quantité de terpènes varient selon la zone concernée. En effet, une étude réalisée sur le pin de Monterey (*Pinus radiata*) a montré que la concentration en terpènes dans le duramen était élevée, et diminuait au fur et à mesure que l'on allait vers les zones les plus externes du bois (aubier et écorce) [48].

Les phytostérols

Ce sont des terpénoïdes (composés organiques qui dérivent de terpènes) appartenant à la famille des stérols (C₂₇) qui sont biosynthétisés en grande quantité par les cellules du parenchyme médullaire contenus dans l'aubier. On les retrouve également en très faible quantité au niveau de la zone de transition [41]. Le plus répandu est le sitostérol [49] mais on peut retrouver d'autres phytostérols comme le campestérol, le campestanol et le β -sitostanol (figure 12) [50].

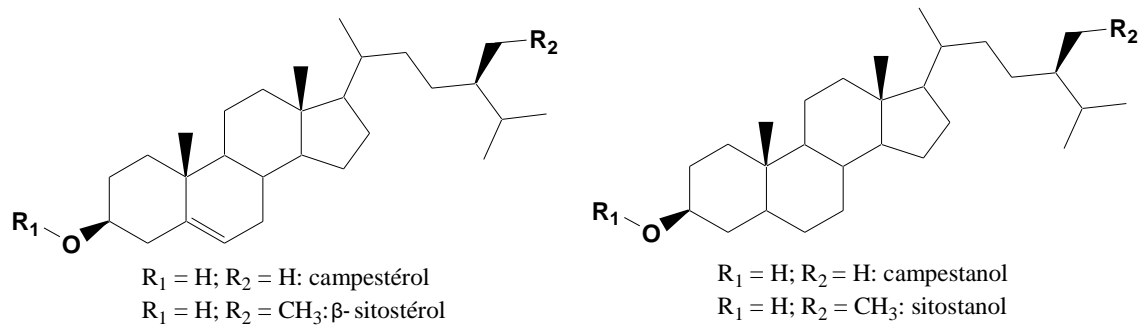


Figure 12 : Structure chimique de phyostérols présents dans le bois de gymnosperme.

IV.2.2.2. Les polyphénols

Dans le bois des gymnospermes, les polyphénols que l'on rencontre principalement sont les stilbènes, les lignanes, les flavonoïdes et les tanins [51]. Ces polyphénols ont un rôle dans la résistance du bois face aux agents pathogènes extérieurs [52].

IV.2.2.2.1. Biosynthèse

Les polyphénols se forment dans les cellules parenchymateuses du bois en cours de duraminisation et entraînent la disparition de l'amidon de réserve [51]. Ces cellules vont dégénérer puis entraîner une intense activité métabolique aboutissant à la formation de polyphénols. Ainsi les précurseurs biosynthétiques des composés phénoliques sont les oses qui sont convertis en acide shikimique puis en phénylalanine au niveau des cellules de l'aubier. La voie métabolique dont dérive ces précurseurs biosynthétiques est celle de shikimate aboutissant au D-érythrose-4-phosphate qui donnera ensuite l'acide shikimique. La majorité des flavonoïdes et des lignanes dérivent de la phénylalanine respectivement par l'intermédiaire des acides cinnamiques et des alcools [53]. Ces polyphénols sont synthétisés dans les cellules de la zone de transition car les précurseurs biosynthétiques des polyphénols sont produits en masse aux alentours de cette zone. Il a été également montré que la transformation du glucose en précurseur des polyphénols est très importante dans la zone de transition [54]. Pendant, la phase de duraminisation la biosynthèse des polyphénols est donc accentuée [55]. Deux enzymes sont impliquées dans la biosynthèse des polyphénols : la phénylalanine ammonia lyase (PAL) et la chalcone synthase (CHS). La PAL est le catalyseur de la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique qui donnera à son tour l'acide p-

coumarique (figure 11). La condensation de trois unités d'acide malonique et d'une unité d'acide *p*-coumarique pour obtenir le 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone est catalysée par la CHS (Figure 13).

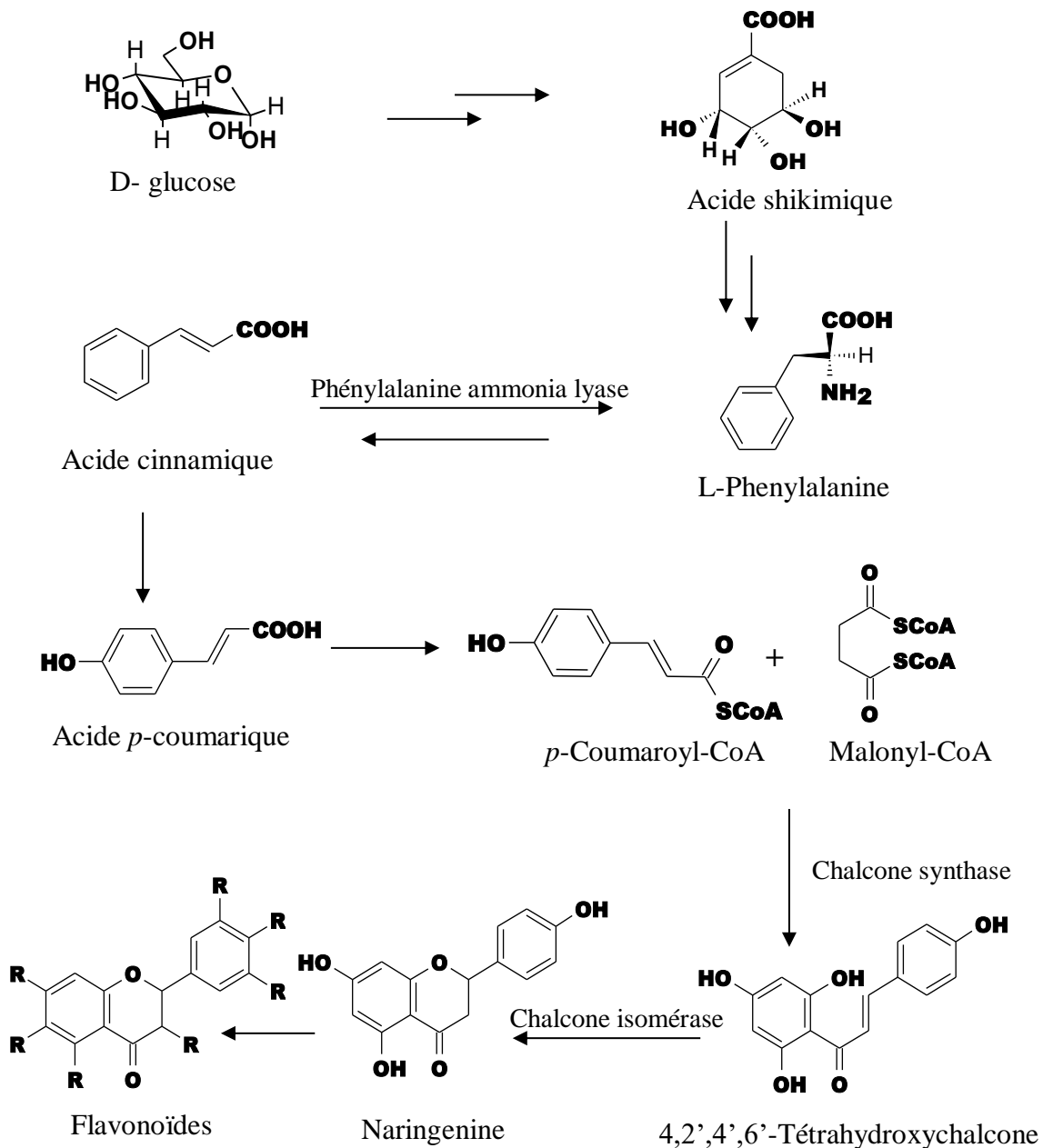


Figure 13 : Schéma général de la biosynthèse des flavonoïdes.

Le 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone et la naringénine (obtenue grâce à l'action de la chalcone isomérase sur le 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone) sont les précurseurs de tous les flavonoïdes. Dans certains bois de gymnosperme, la PAL est exprimée dans la zone de l'aubier la plus proche du cambium où sont synthétisés les alcools cinnamiques qui sont les

précurseurs des lignines tandis que dans la zone de transition, elle catalyse la synthèse des polyphénols présents dans le duramen [56]. Il a été mis en évidence chez certaines espèces, une augmentation des substances polyphénoliques, spécifiques à ce type de tissu, pendant l'automne et l'hiver [54]. Ainsi, on peut suggérer que les enzymes participant à la biosynthèse des composés phénoliques sont actifs et la formation du duramen se réalise au cours de ces deux saisons qui correspondent à la période de dormance de l'arbre. Cependant, les mécanismes responsables de la biosynthèse des composés phénoliques dans le bois ne sont pas encore définis avec exactitude. Dans le bois, la répartition des polyphénols n'est pas homogène chez les conifères car on note une augmentation de la teneur en composés phénoliques lorsque l'on se dirige vers les zones plus internes du bois. Ainsi l'aubier et la zone de transition sont moins riches en polyphénols par rapport au duramen [56].

IV.2.2.2.2. Les stilbènes

Leur structure moléculaire de base est constituée de deux noyaux aromatiques reliés par un pont éthane ou éthène. Les deux noyaux aromatiques possèdent des fonctions hydroxyles qui peuvent être glycosylées ou méthylées. Parmi les 27 stilbènes répertoriés jusqu'à présent dans les gymnospermes du genre *Pinus* et *Picea* ; la pinosylvine (A) et son monométhyléther (B) sont les plus répandus. On retrouve également des stilbènes hydrogénés dans le genre *Pinus* (figure 14). Ils peuvent donc être considérés comme des marqueurs chimiques dans les bois de pins. Leur biosynthèse est catalysée par les stilbène synthases (STS) qui synthétisent les phytoalexines de stilbène en réponse à une incision ou une attaque par des microorganismes. La pinosylvine et ses dérivés ont des propriétés antifongiques et les stilbènes seraient susceptibles de jouer un rôle dans la défense du bois contre les dégradations microbiennes [57].

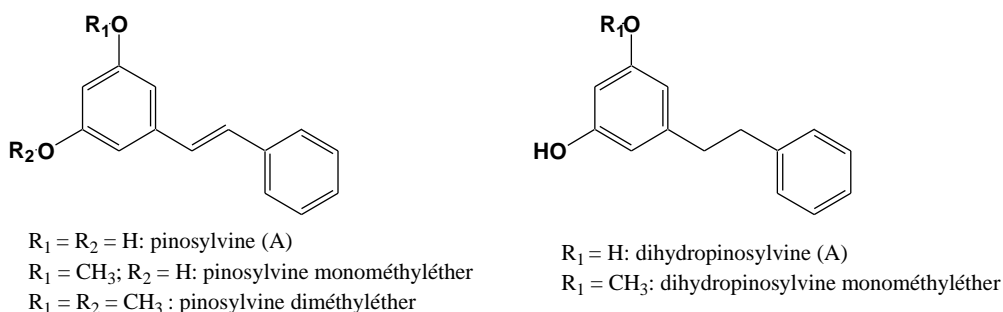


Figure 14 : Structures chimiques de stilbènes présents dans le bois de gymnospermes.

IV.2.2.2.3. Les lignanes

La condensation de deux unités en C₆ et C₃ de type monolignols (phénylpropane) constituent un lignane [58]. Les liaisons entre les deux sous unités varient et entraînent une diversité structurale de lignanes. Les lignanes se subdivisent en 8 sous-groupes selon la position de l'oxygène dans la chaîne aliphatique et le motif de cyclisation. Ainsi, on distingue des lignanes de types furofuranes, furanes (avec ou sans oxygène en C-9 et C-9'), dibenzylbutyrolactones, dibenzylbutyrolactols, aryltétralines (avec ou sans oxygène en C-9 et C-9'), arylnaphtalènes, dibenzocyclooctadiènes (avec ou sans oxygène en C-9 et C-9'), dibenzylbutirolactol, les dibenzylbutanes (avec ou sans oxygène en C-9 et C-9') (figure 15) [59].

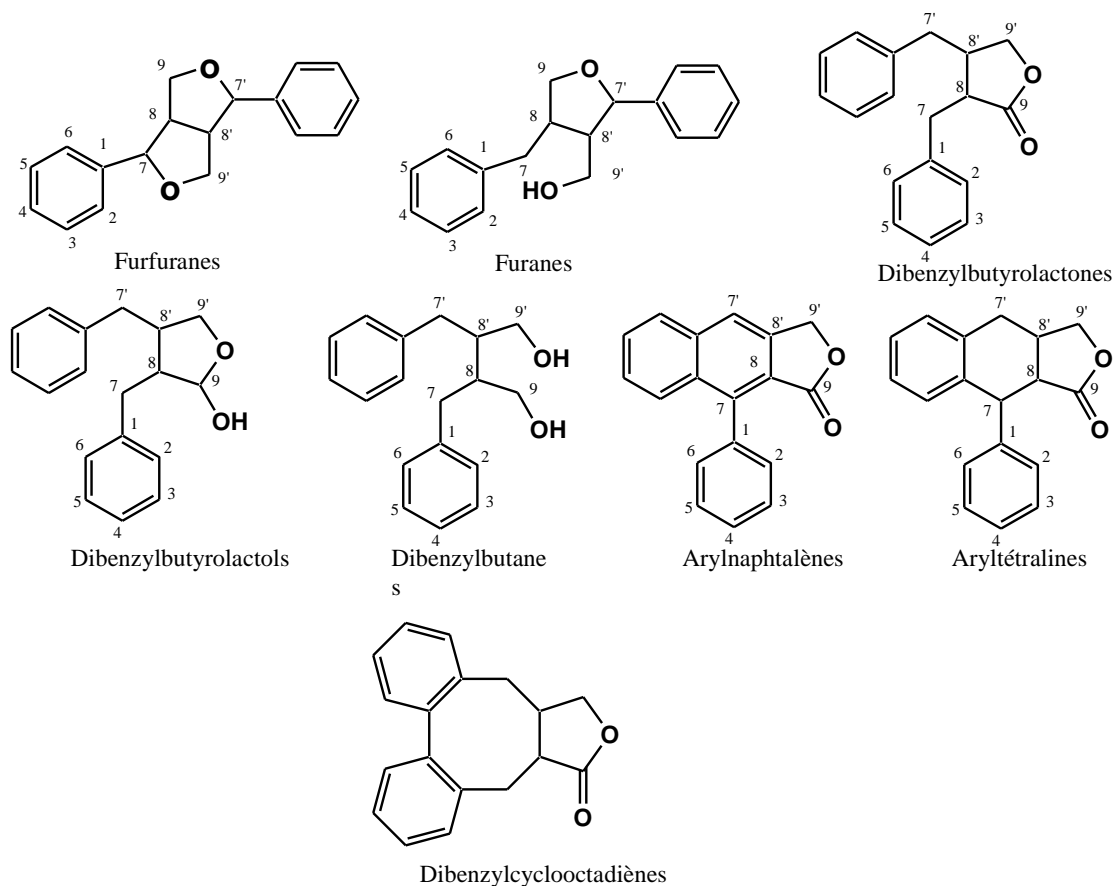
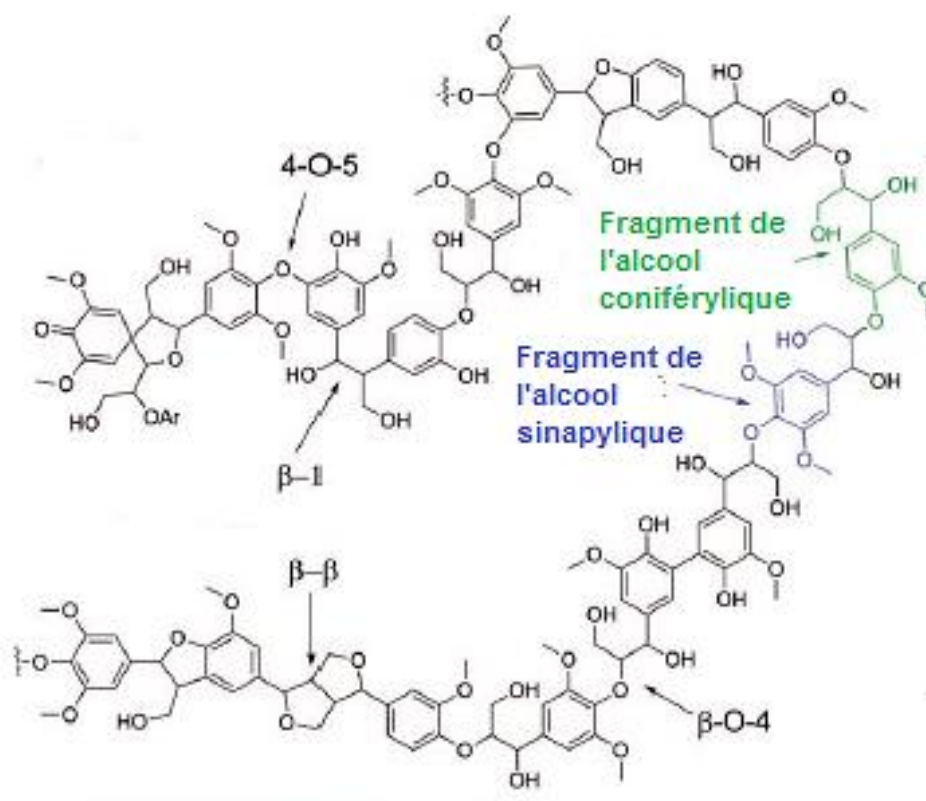


Figure 15 : Structure générale des principaux sous-groupes de lignanes.

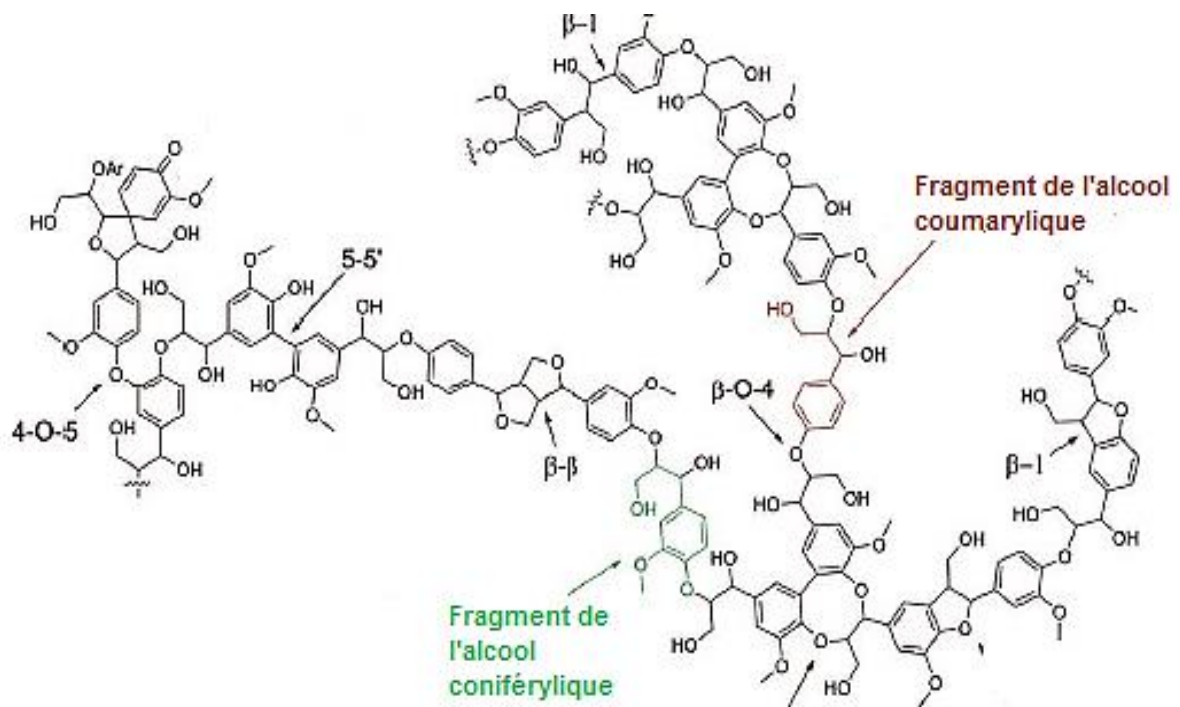
Les lignanes de chaque sous-groupe varient légèrement lorsque les deux cycles aromatiques et la chaîne latérale propylique sont oxydés. Ces lignanes peuvent donc être classés en trois catégories en fonction de l'état d'oxydation des carbones qui se situent sur la chaîne latérale propylique en C-9 et C-9'. On distingue des lignanes présentant des groupes

hydroxyles en C-9 et C-9', ceux sans groupes hydroxyles en C-9 et C-9' et ceux possédant des groupes carboxyles en C-9 et C-9'. Généralement ce sont des groupes hydroxyles en C-9 et C-9' sauf dans le cas de certains lignanes de types furane, dibenzylbutane et dibenzocyclooctadiènes. Ils sont biosynthétisés à partir de monomères correspondants à des phénylpropanoïdes avec ou sans groupe hydroxyle en C-9 [59].

Les unités de bases permettent aussi aux végétaux de synthétiser un long polymère réticulé (figure 16) : la lignine. Les trois monolignols qui entrent dans sa composition sont les alcools coumarylique (unité H : hydroxyphényle), coniférylique (unité G : guaiacyle) et sinapylique (unité S : syringyle) (Figure 16A et B) [60].



(A)



(B)

Figure 16 : Structure chimique des lignines

La biosynthèse des lignanes avec des groupements hydroxyles en C-9 et C-9' est la plus connue et elle débute par une dimérisation énantioselective de deux unités d'alcool coniférylique qui donnera le pinorésinol. Ce dernier est réduit en lariciresinol puis en sécoisolaricirésinol grâce aux pinorésinol ou laricirésinol réductase. Le sécoisolaricirésinol est à son tour oxydé en matairésinol par le sécoisolaricirésinol déshydrogénase (figure 17). C'est la voie de biosynthèse générale des lignanes car la conversion de l'alcool coniférylique en matairésinol a été démontrée chez plusieurs espèces végétales [59].

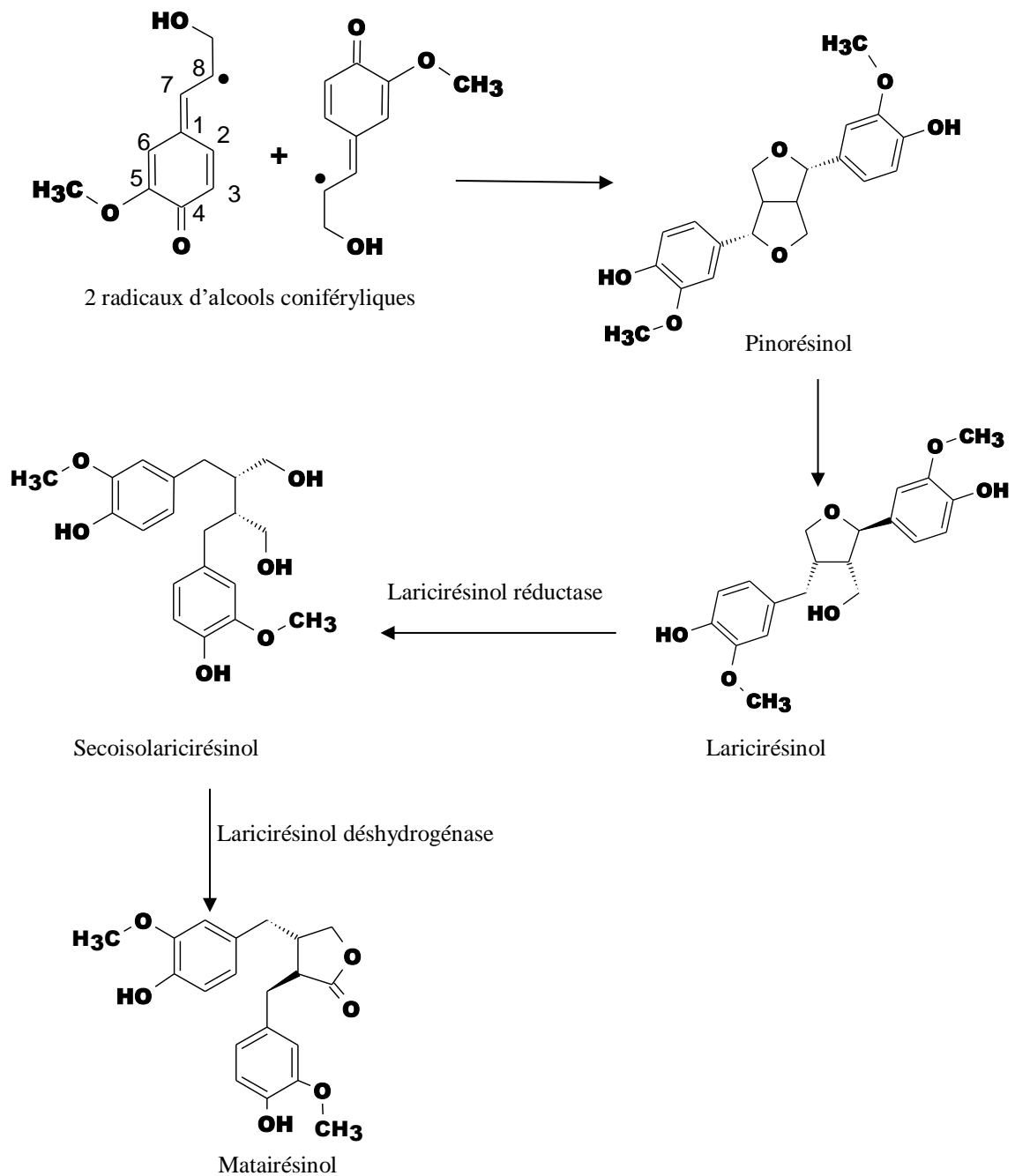


Figure 17 : Biosynthèse générale des lignanes

Les lignanes sont souvent biosynthétisés en quantité importante au niveau de la zone correspondant au duramen pour probablement protéger le bois contre sa détérioration causée par les champignons [61]. Le cyprès d'Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) est un arbre qui a longtemps été utilisé dans la construction au Japon. Son bois possède un duramen qui contient une quantité importante d'hinokinine (figure 18), un lignane qui présente de nombreuses propriétés thérapeutiques (anticancéreuses, antiinflammatoires, antimicrobiennes, ...) [62].

Certains lignanes ont également des propriétés antimitotiques et antivirales [63]. Dans le duramen d'autres espèces de gymnospermes [59], ont été isolés des lignanes telles que l'isotaxirésinol, l'hydroxysugirésinol et l'hibalactone [64] (figure 18).

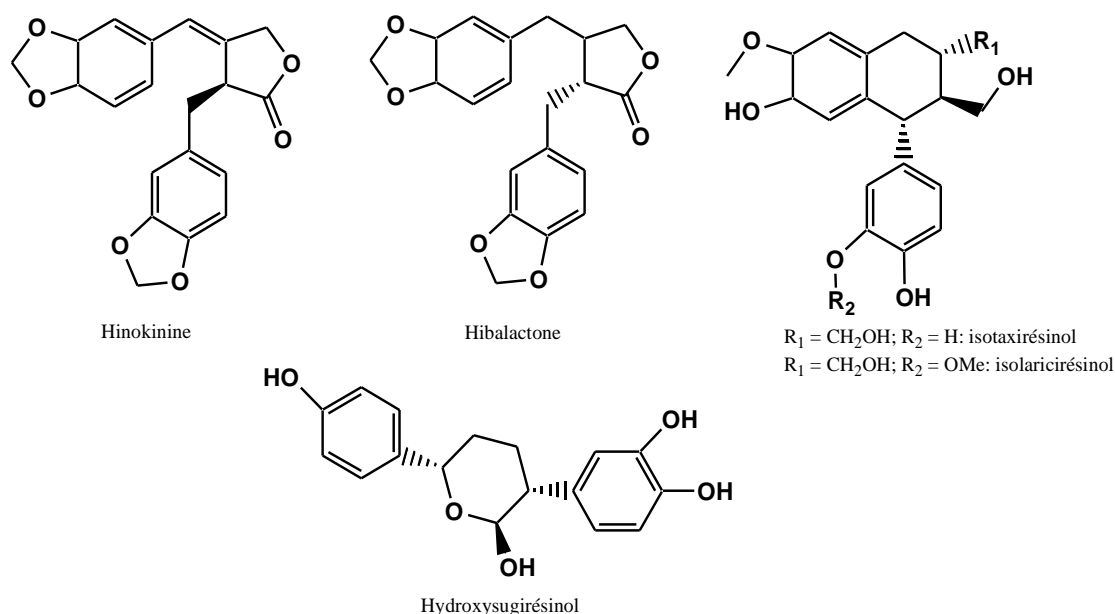


Figure 18 : Structures chimiques de lignanes identifiés dans le bois de gymnospermes.

IV.2.2.2.4. Les flavonoïdes

Ce sont des polyphénols très répandus dans le monde végétal [53]. Leur structure moléculaire de base est un noyau 2-phénylchromane ou de 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one (figure 19) dont la fonctionnalisation engendre les différentes familles de flavonoïdes et permet une répartition des composés. Ainsi on distingue les groupes suivants : les flavones, les flavonols, les dihydroflavonols, les flavanones, les flavonols, les flavan-3-ols, les flavan-3,4-diols, les isoflavones, les néoflavonoïdes, les anthocyanidines, les chalcones, les dihydrochalcones et les auronnes (figure 19) [65].

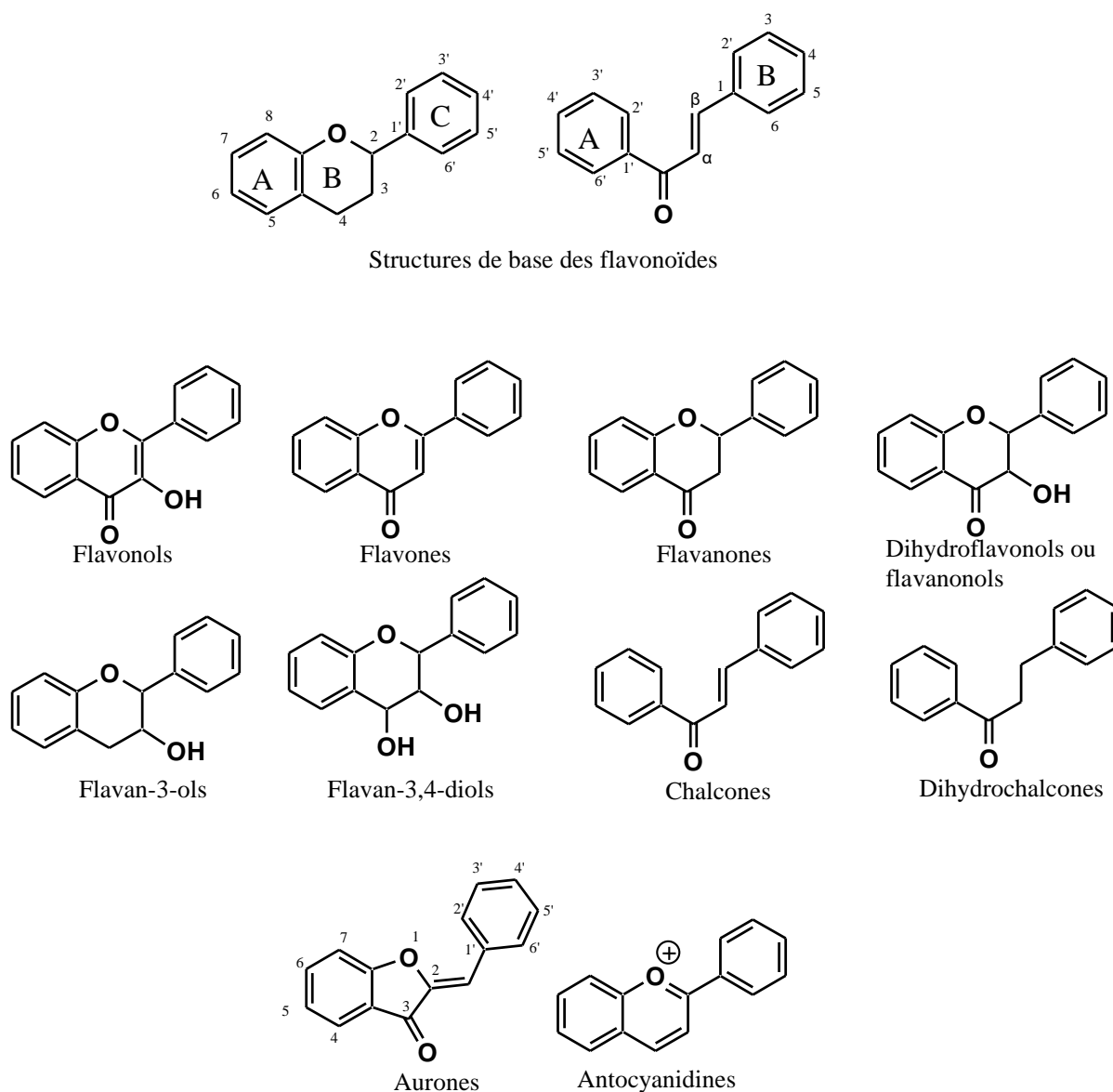


Figure 19 : Structures générales des différentes des classes de flavonoïdes.

Parmi les groupes de flavonoïdes cités, seules les aurones et les dihydrochalcones n'ont pas été décrits dans les gymnospermes. Les néoflavonoïdes et les isoflavonoïdes sont peu répandus dans le bois de gymnospermes [53]. Les flavonoïdes sont parfois liés à des sucres, des lignanes ou des acides phénoliques par des liaisons carbone-carbone, ester ou éther. Ils peuvent également former des oligomères ou des polymères tels que les proanthocyanidines ou tanins condensés qui proviennent de la polymérisation des flavan-3,4-diols et flavan-3-ols. Ces composés sont dits « condensés » en référence aux liaisons carbone-carbone reliant les unités flavaniques. La structure des proanthocyanidines est variable d'un



tissu à l'autre ou au niveau d'un même tissu. Ces tanins condensés ne sont pas retrouvés à l'état pur dans le bois de gymnospermes contrairement aux autres flavonoïdes. Ils sont souvent présents dans des extraits de fractions hétérogènes complexes de couleur brune désignées sous le nom de phlobaphènes [66]. Dans l'aubier de la plupart des espèces, on retrouve fréquemment des flavonoïdes glycosylés. Mais on peut également en trouver dans le duramen de certains bois comme ceux d'*Abies amabilis* et *A. concolor*. La taxifoline (dihydroquercétine) et le dihydrokaempférol sont deux dihydroflavonols (figure 20) qui sont considérés comme les flavonoïdes les plus répandus chez les gymnospermes [65]. En effet, il a été rapporté que ces deux composés sont présents sous leur forme aglycone ou glycosylé dans le bois de toutes les espèces étudiées, à l'exception de certains pins comme le pin noir de Nouvelle Zélande (*Podocarpus spicatus*) [67].

Il existe également des flavonoïdes qui jouent le rôle de marqueurs chimiotaxonomiques chez certaines espèces. C'est le cas par exemple du cèdre de l'himalaya (*Cedrus deodara*) qui est le seul conifère connu dont le bois contient de la cédeodarine et la cédrine qui sont des dérivés 6-méthylés de la taxifoline et de la dihydromyricétine. Les teneurs en flavonoïdes simples varient selon les espèces de gymnospermes. Généralement, elles sont inférieures à 1% (m/m), sauf dans le cas du bois de cœur du mélèze et du sapin de Douglas. Par ailleurs, certaines espèces comme *Abies pinsapo*, *A. alba* ou *A. concolor* possèdent un bois dépourvu de flavonoïdes [68].

Les flavonoïdes sont des puissants antioxydants et possèdent de nombreuses autres activités dont des propriétés antifongiques et antibactériennes [69].



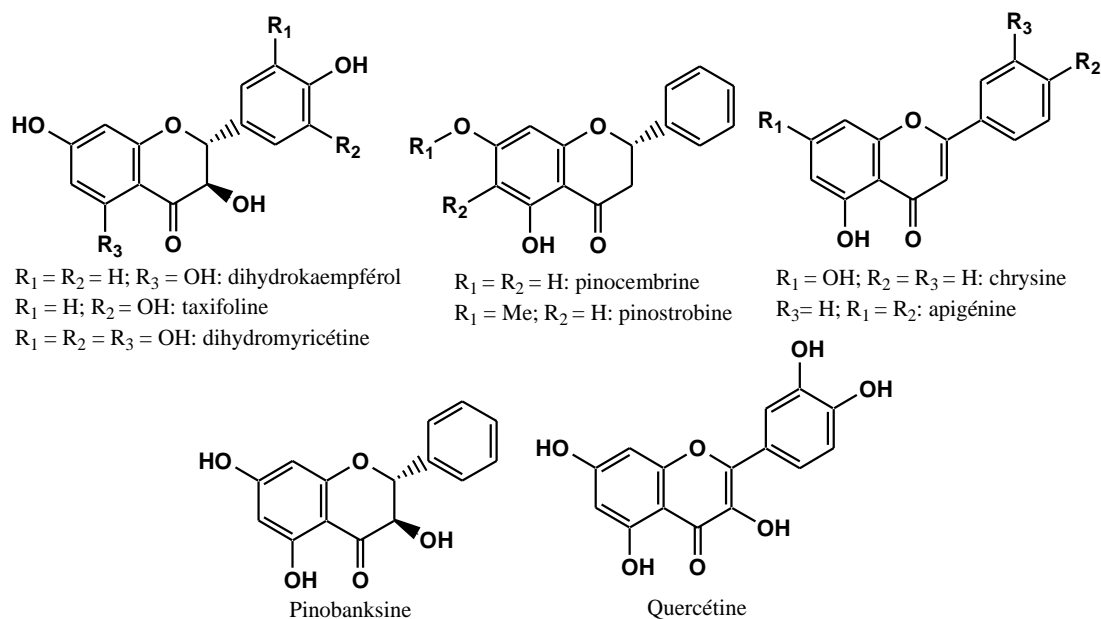


Figure 20 : Structures chimiques de flavonoïdes retrouvés dans le bois de gymnospermes

IV.2.2.2.5. Les tanins

Ce sont des biopolymères polyphénoliques ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 5000 Da. Ils sont subdivisés en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [70] (figure 21). Les tanins condensés sont des polymères de flavonoïdes. Les flavan-3-ols tels que catéchine et epicatéchine sont les unités de flavonoïdes que l'on retrouve dans ces polymères (**A**). Les tanins hydrolysables sont présent chez les dicotylédones (angiospermes) et considérés comme des polyesters de sucres, dont le monosaccharide principal est le glucose, liés à plusieurs acides phénoliques. Les tanins hydrolysables les plus simples sont des polygalloyl esters de glucoses appelés gallotanins (**B**). L'hydrolyse des liaisons ester est réalisable sous l'action d'enzymes, d'acide ou de base. Elle entraîne la formation des monomères constitutifs tels que le glucose, l'acide ellagique ou l'acide gallique.

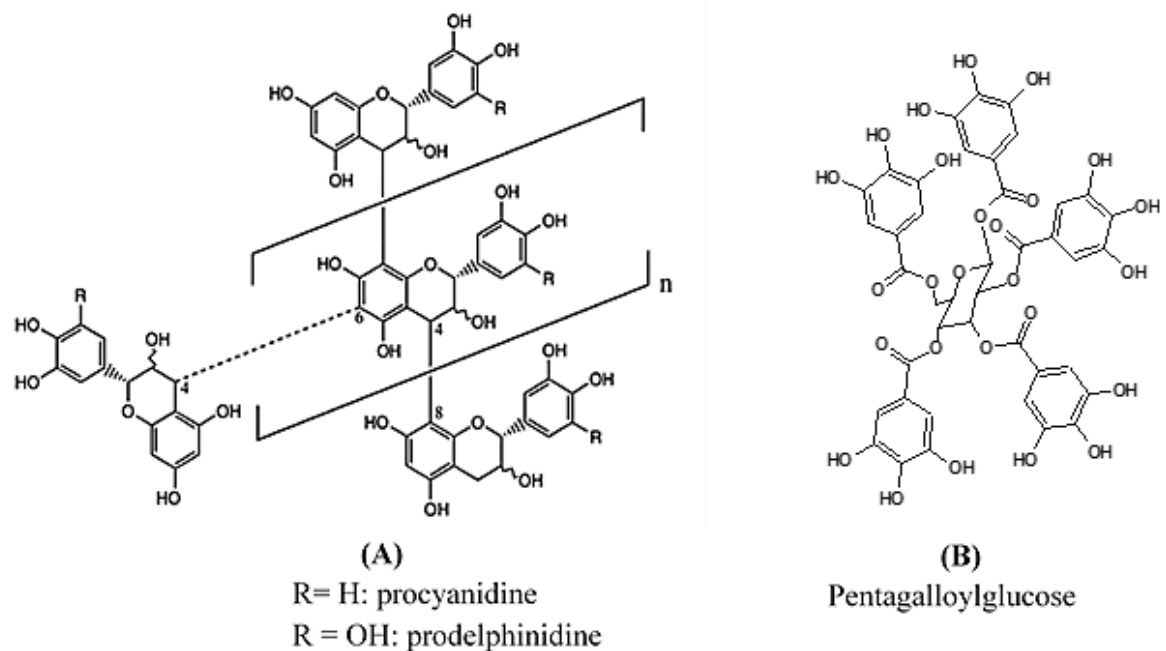


Figure 21 : Structures de tanins condensé (A) et hydrolysable (B).

V. Le sapin de Douglas

V.1. Description

Le sapin de Douglas ou *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco est une espèce appartenant à la famille des *Pinaceae* (*Pinopsida*) (figure 22). C'est un arbre originaire d'Amérique du nord qui a été implanté en Europe il y a environ 150 ans [71]. Il peut atteindre des hauteurs de 60 mètres en Europe si l'environnement est favorable. Mais à l'est des Etats-Unis où l'on retrouve les phénotypes les plus âgés, cet arbre peut atteindre 100 mètres de hauteur [72]. Son écorce est vert noirâtre ou gris brun foncé avec la présence de cloques de résines. En vieillissant, elle devient écailleuse et rugueuse avec des fissures longitudinales profondes. Les rameaux sont initialement jaunes clairs puis deviennent rouges bruns et légèrement pubescents lorsqu'ils sont secs. Les aiguilles sont vertes foncées ou glauques et contiennent deux bandes de stomates abiaxiales, gris blanc, et un apex acuminé ou obtus. Les cônes sont bruns, brillants et ont une forme ellipsoïde-ovoïde. Le sapin de Douglas contrairement aux autres conifères possède des strobiles (cônes males terminaux avec des bractées fendues en trois parties).

Pseudotsuga menziesii

Classe : Pinopsida

Ordre : Pinales

Famille : Pinaceae

Genre : Pseudotsuga

Espèce : *Pseudotsuga menziesii*

(Mirb) Franco, 1950



Figure 22 : *Pseudotsuga menziesii*.

Les plus grandes qualités du sapin de Douglas sont sa vitesse de croissance et sa plasticité (capacité de s'adapter aux modifications des conditions environnementales). Ses plantations sont capables de produire 20 mètres cube de bois par an à l'hectare lorsque le site est favorable à la croissance. Le bois de Douglas est utilisé dans la construction et l'ameublement [3]. Il se distingue des autres gymnospermes d'Europe par la différence de coloration de ses deux grandes zones : l'aubier qui est de couleur jaune clair et le duramen coloré en rouge [5].

Les différents usages du sapin de Douglas

- Dans l'alimentation

Les jeunes pousses sont parfois utilisées comme arôme [73] dans aliments cuits tandis que les jeunes aiguilles sont riches en vitamine C et peuvent remplacer le café ou le thé.

- En médecine

Le tronc de l'arbre peut produire une résine ayant des propriétés antiseptiques. Elle est utilisée dans le traitement des toux, des saignements d'intestin et des problèmes d'estomac

[74]. Une infusion des pousses de Douglas peut être utilisée dans le traitement des problèmes vésicaux et rénaux [74].

- Dans la construction

Le bois de Douglas est utilisé dans la construction de façades [75], de charpentes et de murs à ossatures en bois [76]. Ses qualités de durabilité naturelle favorisent également son usage dans la construction de terrasse en bois [77]. Il est très apprécié pour les aménagements intérieurs (plafonds, sols, murs intérieurs,) car il émet très peu de polluants volatils et possèdent des propriétés d'isolation thermique et phonique considérables

- Autres usages

L'écorce qui est une source de tanins peut être utilisée comme engrais. La résine obtenue à partir du tronc est utilisée comme fixateur dans les savons et la parfumerie [78]. Elle est également employée dans la fabrication de colles et de bougies [79]. Des études récentes prennent en considération l'utilisation de la biomasse du sapin de Douglas pour l'élaboration de biocarburants [50] et d'autres bioproduits à valeur ajoutée [80].

V.2. Métabolites secondaires et propriétés du bois de Douglas

Les principaux métabolites secondaires qui sont retrouvés dans le sapin de Douglas sont les terpènes, les polyphénols, les acides gras, les lipides et les phytostérols.

V.2.1. Structure et localisation

V.2.1.1. Les terpènes

Les familles de terpènes qui ont été identifiés dans le sapin Douglas sont les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes [81]. Les monoterpènes et les diterpènes, principalement identifiés dans les résines de l'arbre, sont les plus abondantes. Ils sont généralement retrouvés dans les résines du bois [82]. Plusieurs composés terpéniques ont également été identifiés en quantité importante dans l'oléorésine produite par le bois de Douglas, en particulier suite à une exposition aux champignons ou insectes nuisibles. Dans l'oléorésine provenant de l'aubier, on retrouve des monoterpènes tels que le β -pinène et probablement le limonène. Au niveau de l'oléorésine issu du bois de cœurs, on note la présence de monoterpènes comme l' α -pinène et en très faible quantité de limonène et de terpinéol [44].

Des sesquiterpènes ayant des structures proches ont été identifiés dans le duramen. Il s'agit du dihydrotodomatuate de méthyle, les acides todomatuique, ar-todomatuique, dihydrotodomatuique, le pseudotsugonal, le ar-pseudotsugonal et le dihydropseudotsugonal (figure 23) [83]. Ces composés sont capables d'inhiber l'évolution de certains insectes car ils sont ovocides (empêchent le développement embryonnaire) chez certains insectes [83].

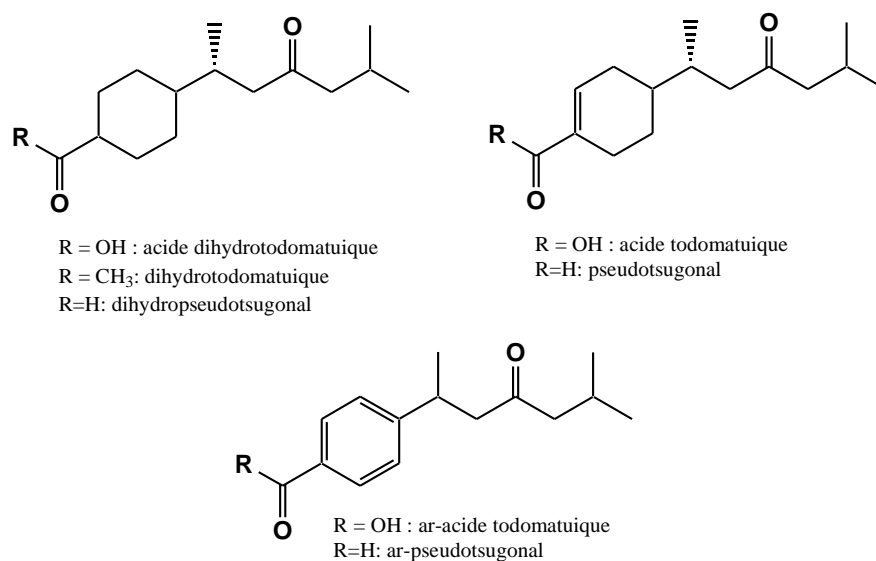


Figure 23 : Structures chimiques des sesquiterpènes présents dans le bois de Douglas.

Des triterpénoïdes ont été identifiés dans l'aubier du Douglas ; Ce sont le 24R-cycloeucalanol, le cycloeucalénol et le 24R-methylphenol (figure 24) [81].

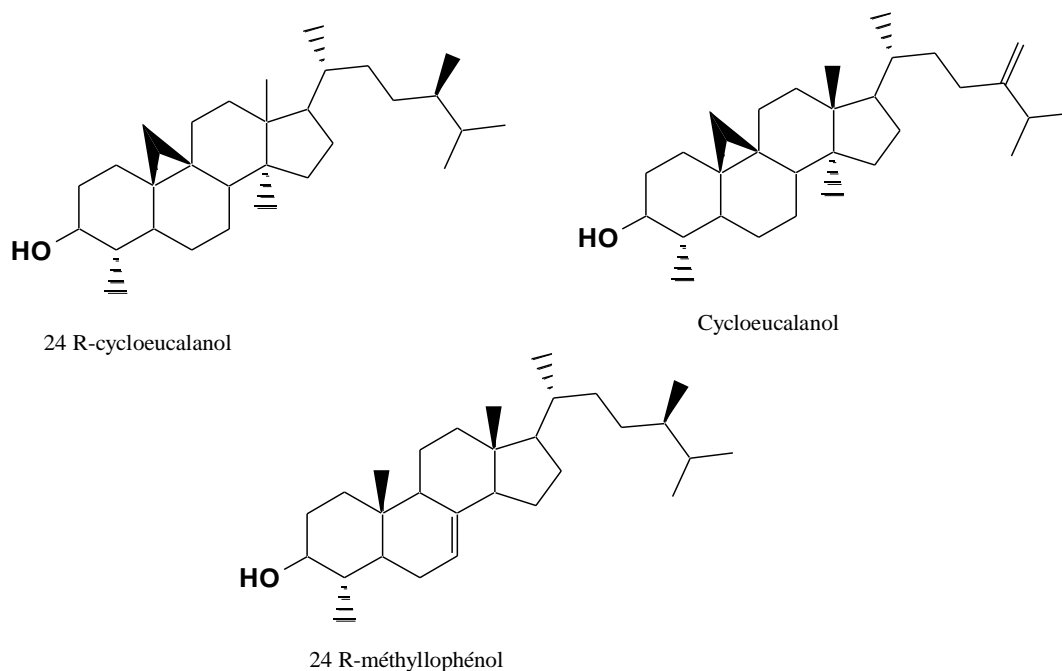


Figure 24 : Structures chimiques des triterpènes identifiés dans le bois de Douglas.

Le campesterol, le β -sitosterol, le campestanol, le sitostanol, le 24-méthylèncycloartanol et le cycloarténol ont été identifiés dans les différentes zones du bois de Douglas. Ces sont des terpénoïdes appartenant à la famille des phytostérols. Ils sont également présents sous forme d'ester d'acide gras (AG) (figure 25) [84].

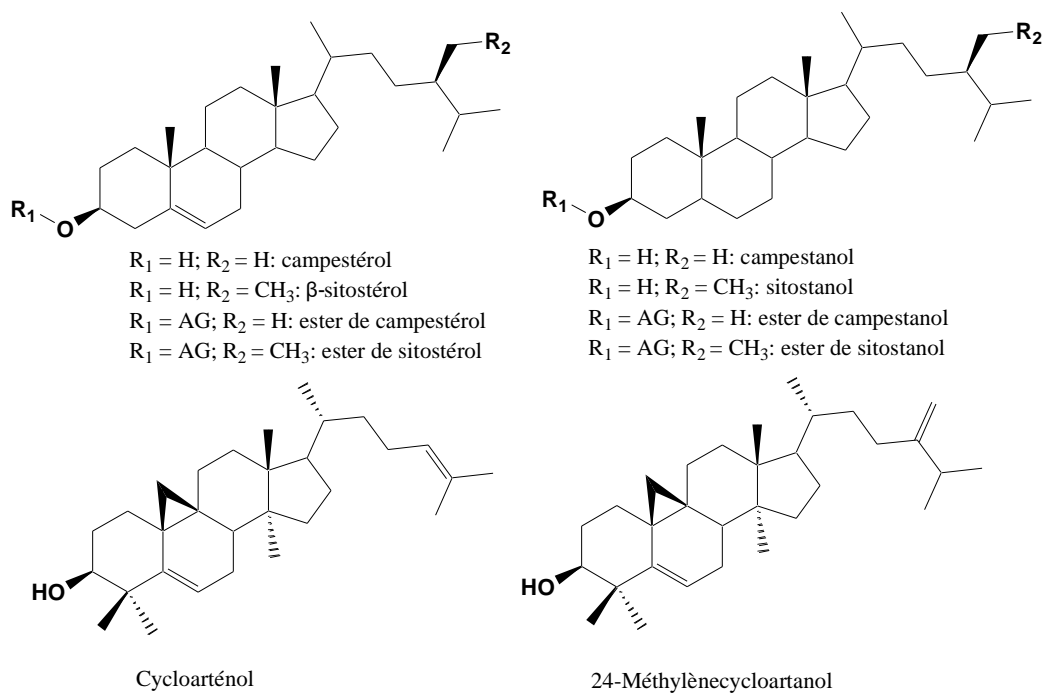


Figure 25 : Structures chimiques de phytostérols identifiés dans le bois Douglas.

V.2.1.2. Les polyphénols

Les groupes de polyphénols retrouvés dans le sapin de Douglas sont les flavonoïdes [85], les tanins condensés [86] et lignanes [87]. Les flavonoïdes sont présents dans presque tout l'arbre (écorce, aiguilles, bois) [85]. Les tanins condensés ont été identifiés dans l'écorce [86] et les aiguilles [88]. Les lignanes sont retrouvés dans les résines, l'aubier et l'écorce [87]. Un flavonolignane nommé pseudotsuganol a été identifié dans l'écorce [89]

Dans le bois de Douglas, les polyphénols les plus abondants sont les flavonoïdes et il se distingue des autres gymnospermes par des teneurs élevées (2% m/m) en taxifoline dans le duramen. D'autres flavonoïdes tels que la myricétine, la pinobanksine, la quercétine, le dihydrokaempférol, le kaempférol, la pinocembrine ainsi que le biflavonoïde (5',5')-bidihydroquercétine sont également présents en quantité relativement importante dans le duramen (figure 26) [5] [90]. Dans l'aubier, des formes glycosylées de quercétine et de taxifoline ont été identifiés tandis que des phlobaphènes sont retrouvés à la fois dans l'aubier et le duramen.

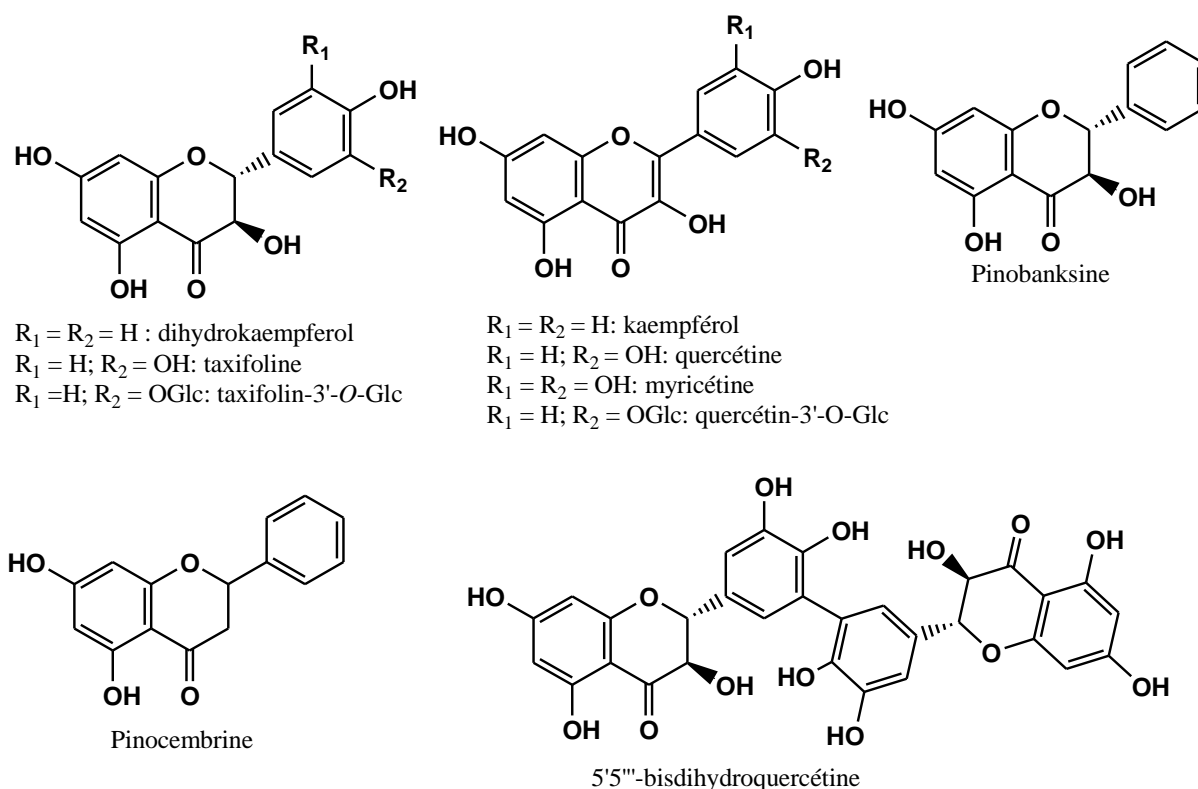


Figure 26 : Structures chimiques de polyphénols présents dans le bois Douglas.

D'autres polyphénols tels que les lignanes, des tanins condensés et les polymères phénoliques ont été identifiés au sein du bois de Douglas [5]. Les composés tels que la taxifoline et la quercétine ont des propriétés antioxydantes et antifongiques [69].

V.3. Propriétés

V.3.1. Résistance mécanique

Le *Pseudotsuga menziesii* fait partie des conifères qui possèdent les meilleures propriétés mécaniques car il est le seul résineux courant qui allie une forte largeur de cernes à de très bonnes caractéristiques mécaniques (compression, traction, flexion). Contrairement aux autres conifères, l'élargissement des cernes annuels a une influence peu significative sur la densité du bois de Douglas entraînant ainsi un peuplement intensif sans impacter la qualité du bois [3]. Il se distingue également des autres résineux par une excellente stabilité dimensionnelle (aptitude du bois à ne pas gonfler ou modifier ses dimensions en fonction de son taux d'humidité).

V.3.2. Durabilité naturelle du bois

Selon la norme Européenne EN 350, la durabilité naturelle est « la résistance inhérente du bois à l'attaque par les organismes détruisant le bois ».

V.3.2.1. Les agents pathogènes destructeurs

La durabilité naturelle fait partie des propriétés qui caractérisent une essence forestière. Elle détermine la faculté du bois à résister à la dégradation due aux agents biologiques [91] qui sont :

- Les champignons de type Ascomycètes et Basidiomycètes sont à l'origine de la pourriture qui entraîne une modification irréversible du bois [92]. Ce sont des champignons lignivores qui en transformant les éléments constitutifs du bois en substances assimilables, digèrent le bois et entraîne sa destruction. L'action de ces champignons est favorisée s'ils bénéficient d'une température favorable, d'un approvisionnement en eau (humidité du bois entre 35 et 40%) et en air suffisant. Les espèces les plus fréquemment infectés sont l'épicéa (*Picea abies*), les pins et mélèzes de diverses espèces [93].

- Les termites sont également responsables de la dégradation du bois. Ils sont subdivisés en deux groupes : les termites de bois secs et les termites souterrains. Les termites de bois secs ne dépendent pas du sol et vivent en colonies peu denses dans les bois qu'ils dégradent tandis que les termites souterrains forment des grandes colonies et dépendent du sol qui est leur milieu de vie. Parmi les termites souterrains qui attaquent le bois on distingue des espèces comme *Reticulitermes grassei*, *R. lucifugus* et *R. urbis* [94]. Les termites de bois sec que l'on rencontre le plus souvent en Europe sont de l'espèce *Kalotermes flavicollis*[94]
- Les insectes de la famille des *Cerambycidae* sont responsables de vermoulures qui sont des traces laissées par les insectes sur le bois après l'avoir rongé. En Europe ces insectes sont à l'origine de ces dégradations chez les conifères [95].

V.3.2.2. Conditions favorisant la détérioration du bois

Selon les conditions dans lesquelles se trouve le bois, il sera exposé à un agent de détérioration spécifique. Ainsi le bois peut se retrouver dans quatre conditions [91] :

- ***En contact permanent avec le sol ou une source d'humidité mais également exposé aux intempéries***

Ces conditions qui sont favorables à des risques permanents de dégradation par les termites et la pourriture correspondent au bois utilisé comme poteaux télégraphiques, palissades, portes d'écluse, traverses de chemin de fer,

- ***Sans contact avec le sol mais exposé aux intempéries***

Dans ces conditions, le bois est beaucoup moins exposé aux champignons car son exposition à l'humidité n'est plus permanente. Cependant, la pourriture peut apparaître si l'eau des pluies arrive à s'accumuler et stagner dans un endroit en maintenant une humidité élevée.

- ***Sans être en contact avec le sol et ni exposé aux intempéries***

Ces conditions concernent les menuiseries intérieurs (les portes, les escaliers, parquets) dont le bois est le plus souvent exposé qu'au seul risque d'attaque par les insectes. Le bois peut exceptionnellement être aussi dégradé par les champignons s'il se trouve dans un milieu insalubre.

- *Immergé dans l'eau*

Lorsque le bois est immergé dans l'eau douce, il ne court aucun risque d'attaque terrestre et marine. Dans ces conditions, le bois se conserve très bien mais peut toutefois être souvent altéré par certains champignons lorsqu'une partie du bois est émergé (exposé à la pourriture si le milieu est humide en permanence). Dans l'eau de mer, le bois n'est pas placé dans de bonnes conditions car il est exposé aux xylophages marins.

V.3.2.3. Les différents mécanismes de défenses

Pour faire face à ces agents biologiques, les différentes zones du bois mettent en place un certain nombre de mécanismes de défense. Dans le cas de l'aubier, trois modèles de mécanisme de défense ont été proposés [11] : la compartimentation des pourritures dans les arbres (CODIT), le modèle de la zone de réaction et la restriction micro environnementale.

- *Le modèle de CODIT (Compartementalization of Decay in Trees)*

Le CODIT est un modèle de défense qui a été proposé pour expliquer la décoloration et la décomposition du bois [96]. Ce modèle considère que les lésions sont délimitées par des barrières qui portent les noms de murs allant de 1 à 4 permettant d'isoler les lésions à l'intérieur d'un compartiment défini. Les trois premiers murs sont formés à partir du bois présent au moment de l'incision ou de l'infection. Ces murs jouent le rôle d'obstacles fixes évitant la propagation de l'infection. Le premier empêche la propagation de l'infection axiale qui se forme par le colmatage des tissus conducteurs qui sont les trachéïdes. Le deuxième limite la propagation radiale due à des critères anatomiques tels que le parenchyme terminal ou l'épaisseur du bois final (bois d'été). Le mur 3 limite la propagation latérale des composés des rayons du parenchyme. Enfin, le mur 4 contrairement aux autres murs est formé par le cambium pendant l'incision et contient des cellules parenchymateuses traumatiques. C'est le mur le plus solide et plus durable.

- *Le modèle de la zone de réaction*

C'est un modèle développé par Shain qui considère qu'il existe une zone de réaction correspondant à une zone de réponse active du bois qui se situe au niveau d'une interface dynamique entre l'aubier vivant et le bois infecté par les pathogènes [97]. Le modèle de la zone de réaction est observé dans les bois du *Pinus taeda* et du *Picea abies* où se forme un tissu nécrotique enrichi en oléoresine et en composés phénoliques antifongiques. La zone de



réaction est encerclée par la zone de transition, qui contient la plupart des cellules vivantes et métaboliquement actives du parenchyme. La formation de la zone de réaction a lieu après une réponse non spécifique dans les arbres infectés ou incisés par des agents pathogènes.

- ***Le modèle de la restriction microenvironnementale***

C'est un modèle alternatif proposé pour la restriction des champignons dans le bois vivant. Dans ce modèle, c'est l'environnement micro interne des arbres comme la teneur élevée en humidité et une faible teneur en oxygène qui empêche une colonisation fongique sans défenses actives de l'hôte [98].

V.3.2.4. Caractère chimique de la réaction de défense

Au sein de l'aubier, il existe 4 types de composés chimiques qui peuvent intervenir lors de la défense contre les agents pathogènes extérieurs : les inhibiteurs constitutifs, les inhibiteurs induits, la résine et les minéraux.

V.3.2.4.1. Les inhibiteurs constitutifs

Ce sont des composés préformés que l'on retrouve chez un grand nombre d'espèces de gymnospermes mais qui sont peu abondants dans l'aubier et surtout spécifiques du duramen. Ces inhibiteurs peuvent être des alcools diterpéniques, des lignanes, des aldéhydes, des acides gras et résiniques [11]. La résistance des certains arbres peut être liée à la concentration de ces composés au sein de l'aubier. C'est le cas par exemple de *Pinus radiata* et *P. densiflora* dont les différences de résistance à *Heterobasidion annosum* (champignon basidiomycète) sont influencées par la quantité de pinosylvine et ses dérivés [99].

V.3.2.4.2. Les inhibiteurs induits

Ces inhibiteurs induits ou phytoalexines sont des composés antimicrobiens de faible poids moléculaires (acides gras, terpènes et polyphénols) mais dont les quantités augmentent lors d'une infection microbienne [100]. Ainsi, une grande partie des composés inhibiteurs comme certains stilbènes et lignanes deviennent plus abondants au niveau de l'aubier après une attaque microbienne [101]. D'autres composés tels que les résines, les acides gras, les phenylpropanoïdes et les flavonoïdes peuvent également intervenir lors de la réaction de défense [102].

V.3.2.4.3. La résine

Dans le xylème de conifères, on observe une production importante d'oléorésine qui est un mélange constitué de terpènes volatils, d'acides gras et terpéniques. L'importance de la résine dans la résistance face aux agents pathogènes extérieurs n'est pas clairement définie (on suppose que le rôle de cette résine est de protéger les arbres contre les insectes, les incisions et les microorganismes pathogènes) [11]. La présence de résine est surtout caractéristique des pins qui en produisent en grande quantité après l'infection de l'arbre [103]. L'action principale de la résine serait d'inhiber la croissance des champignons [104]. On distingue deux types de résine selon leur origine et leur composition : les résines primaires et secondaires.

La résine primaire qui est préformée permet une réponse rapide lors d'une infection ou une incision. La résine secondaire serait originaire des cellules vivantes des rayons du xylème, du parenchyme et du phloème [105]. Elle a une action plus importante dans la résistance à une attaque due aux agents pathogènes. En effet, lorsque les arbres sont agressés par les champignons ou les coléoptères, il s'ensuit une exsudation très importante de résine. Ce phénomène est appelé résinose [106].

V.3.2.4.4. Les minéraux

Il est probable que les minéraux associés à des taux élevés en pH prennent part à la défense de l'aubier contre la croissance des champignons. En effet on observe une augmentation du pH et une importante accumulation des minéraux tels que Ca, Mn, Mg, Zn et K pendant l'infection. Mais le mécanisme d'accumulation des minéraux est jusqu'à présent peu connu [11].

Contrairement à l'aubier, dans le duramen les métabolites secondaires ont un rôle plus important dans la protection de l'arbre contre les champignons et la dégradation du bois en raison de leur capacité à avoir à la fois des activités fongicide et antioxydante (piégeurs de radicaux libres) [5]. Cette double défense provient de l'hypothèse selon laquelle les champignons qui attaquent le bois utilisent certaines espèces de radicaux libres qui peuvent initialement entraîner une perturbation de la paroi cellulaire dans le but d'augmenter la taille des pores permettant ainsi une entrée massive d'enzymes fongiques extracellulaires. C'est donc cette première étape du processus de dégradation du bois qui peut être inhibée par les

propriétés antioxydantes des métabolites secondaires du duramen [107]. Cette durabilité naturelle élevée du duramen est également liée à sa grande diversité métabolique due à la présence des flavonoïdes, terpènes, stilbènes, lignanes,... [108]

Par ailleurs, il a été constaté que le duramen jeune était plus résistant à la détérioration que le duramen âgé. Cette perte de durabilité observée chez le duramen âgé serait due en partie à une lente autoxydation des métabolites secondaires réduisant ainsi leur toxicité et diminuant leur capacité antioxydante [107].

V.4. Utilisation du bois dans la construction

Trois grands types de bois sont utilisés dans la construction : les bois exotiques ou tropicaux [109], les bois de feuillus et les bois de résineux [76]. Les bois exotiques sont très demandés en raison de leur dureté, la diversité de leur aspect et leur facilité à s'adapter en milieu humide. Ils sont principalement utilisés en menuiserie, platelage et parqueterie. Les bois de feuillus qui étaient auparavant très appréciés dans la construction d'ossature à colombage et de charpente sont désormais employés en menuiserie, parqueterie ou ébénisterie. Les bois de résineux sont principalement utilisés en menuiserie, parqueterie, charpente, aménagement et mobilier d'extérieur.



Objectif du travail

Comme le montre l'étude bibliographique, le bois des gymnospermes contient une grande variété de métabolites ayant des structures diverses et possédant de nombreuses propriétés biologiques permettant au bois de résister aux agressions environnementales (champignons, insectes, ...).

Le sapin de Douglas est une espèce de gymnosperme qui bénéficie de l'un des bois de construction les plus utilisés en Europe en raison de ses excellentes propriétés mécaniques (compressions, flexions et tractions). Le bois de Douglas présente également une durabilité naturelle qui lui permet de résister à l'attaque des insectes et d'autres micro-organismes extérieurs tels que les champignons et les bactéries. D'après la littérature, les métabolites secondaires (terpènes et polyphénols) contenus dans le duramen seraient à l'origine de la protection du bois contre les agents pathogènes extérieurs par des mécanismes complexes [5]. Cependant, il n'a pas encore été montré de façon convaincante l'implication des métabolites dans les mécanismes de défense contre les agressions environnementales [110]. De plus il existe très peu d'informations sur la répartition de ces métabolites dans le bois (duramen, aubier, zone de transition) et leur variabilité saisonnière (c'est-à-dire aux différentes périodes de l'année).

La Chaire d'excellence « Ressources Forestières et Usages du Bois » dont l'un des objectifs est d'améliorer la durabilité du bois de Douglas a décidé d'engager cette étude sur les métabolites de défense. Cependant, plusieurs facteurs pourraient avoir une influence qualitative ou quantitative sur les métabolites. C'est dans ce contexte, que notre étude a consisté à identifier les métabolites de défense contenus dans le bois de Douglas. Elle a été réalisée selon un objectif divisé en deux grandes étapes :

- La première étape a été d'identifier les métabolites majoritaires présents dans les trois zones de bois en utilisant des procédés d'extraction, de purification et d'analyse (RMN, LC-MS/MS)
- La seconde étape a été de comparer les profils métaboliques des échantillons de bois prélevés aux 4 saisons de l'année en procédant à la quantification relative par LC/MS/MRM des métabolites majoritaires présents dans les extraits.



Partie II. Partie expérimentale

I. Matériel végétal

Il s'agit des rondelles de tronc de bois de Douglas issues des arbres appartenant à l'institut technologique FCBA (Forêt Cellulose Bois Construction Ameublement). Ils proviennent d'un site situé à Gimel dans le département de la Corrèze. Les arbres du génotype 1039 ont été sélectionnés parmi ceux qui ont été répertoriés (1039, 80315, 80189, 80145) sur le site. Un arbre a été abattu à chaque saison puis des rondelles ont été prélevées à moins de 1m 30 du collet. Les prélèvements ont été effectués le 14 octobre 2013, le 9 janvier 2014, le 17 avril 2014 et le 23 juillet 2014. Cela a permis d'obtenir 4 rondelles différentes provenant de chaque saison (automne, hiver, printemps et été) (figures 27 et 28).

Dans le cas de la saison d'automne, nous avons travaillé sur deux rondelles. La première rondelle (Automne N°1) (figure 27) a été utilisée dans le but d'isoler les métabolites secondaires présents dans le bois de Douglas et ensuite d'identifier les métabolites dans chacune des zones du bois. La deuxième rondelle (Automne N°2) (figure 28) a été utilisée pour la quantification relative des métabolites majoritaires identifiés dans le bois de Douglas.

Pour les autres saisons de l'année, une seule rondelle a également été utilisée pour la quantification relative de métabolites majoritaires (figure 28).

Elles ont été dans un premier temps refroidies à -20°C pour bloquer l'activité métabolique puis conservées au congélateur. Après lyophilisation, chaque rondelle a été découpée pour séparer les différentes zones du bois qui sont : l'écorce, l'aubier (A), la zone de transition (T) et le duramen (D). La découpe de ces différentes rondelles de bois s'est réalisée au moyen d'une micro-scie (figures 27 et 28).



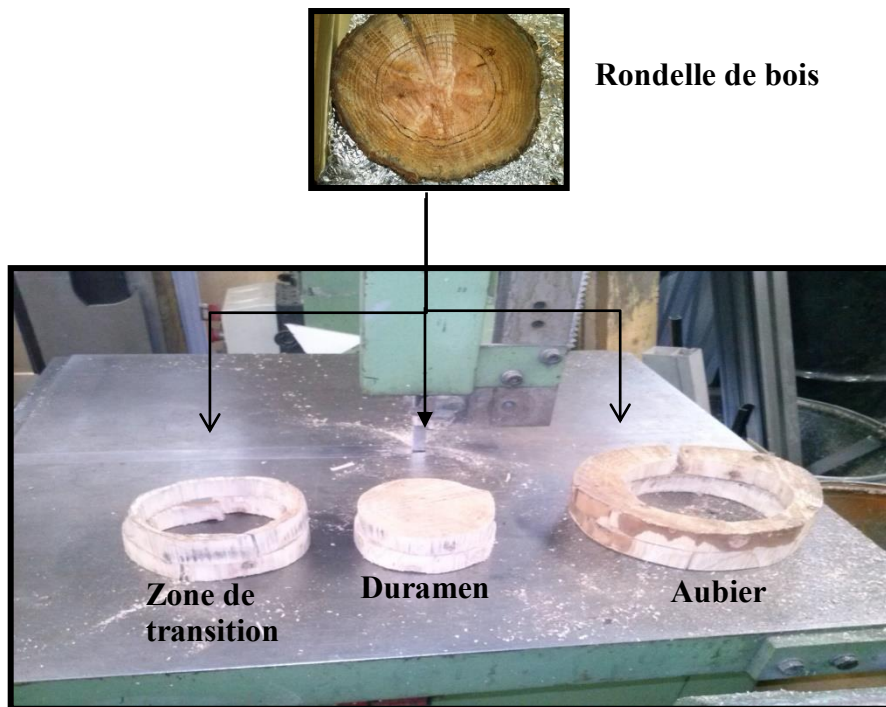


Figure 27 : Les trois zones de la rondelle de bois d'automne N°1.

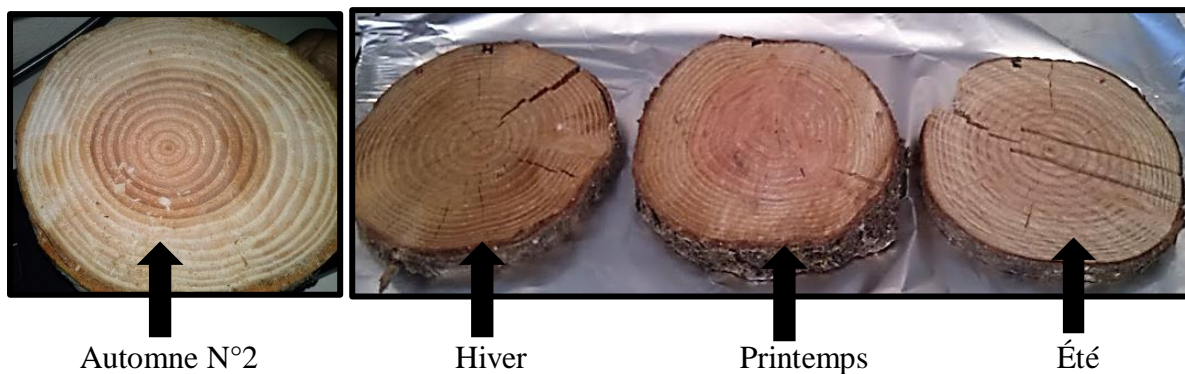


Figure 28 : Les rondelles de bois prélevées aux différentes saisons de l'année.

Les morceaux d'écorce obtenus ont été stockés et mis de côté, car cette zone du bois n'est pas utilisée lors de la construction. Les morceaux de bois séchés de l'aubier, de la zone de transition et du duramen obtenu ont été broyés à l'aide d'un broyeur à couteaux haute performance SM 2000 RETSCH (taille d'alimentation maximale : 60x80 mm ; récipient collecteur : 5 L ; Débit : 0,2-50 kg/h).

Les masses des rondelles de bois prélevées aux différentes saisons de l'année sont résumés dans le tableau suivant :

Rondelles	Zone (masse en g)		
	A	T	D
Automne N°1 (494 g)	290	51	130
Automne N°2 (341 g)	225	28	63
Hiver (324 g)	137	11	140
Printemps (505 g)	191	30	110
Été (231 g)	185	17	78

II. Choix du solvant et du type d'extractions

Des copeaux de bois de Douglas (site Gimel, Corrèze, automne 2013) d'une masse de 80 g ont été broyés à l'aide d'un broyeur à couteaux MICROTON MB550[®] Kinematica. Le broyat obtenu a été réparti dans 8 flacons contenant 10 g de poudre de bois de Douglas préalablement pesées. Ces copeaux de bois ont été utilisés pour réaliser des essais d'extractions avec des solvants de polarités croissantes afin de déterminer le solvant approprié pour extraire une quantité maximale de métabolites.

II.1. Extractions avec des solvants de polarités croissantes.

Dans un erlenmeyer, la poudre de bois (10 g) est extraite par 50 mL de solvant afin de réaliser une extraction par macération à froid. Le mélange a été mis sous agitation magnétique pendant 2h puis filtré sur du papier filtre. Le filtrat obtenu a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le marc restant est séché et soumis également à une extraction dans les mêmes conditions que précédemment, mais en utilisant cette fois-ci un solvant plus polaire. La série d'extraction a été effectuée avec trois solvants : l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Trois extraits ont ainsi été obtenus. Ce sont les extraits hexanique (E1), d'acétate d'éthyle (E2) et méthanolique (E3) (figure 29).

II.2. Délipidation et partition liquide-liquide

Pour cette série d'extraction, la poudre de bois a été extraite par de l'hexane donnant un extrait hexanique (E4). Le marc obtenu a été extrait par du méthanol puis concentré afin d'obtenir un extrait méthanolique (E5). Cet extrait a été redissout dans un mélange eau/acétate d'éthyle pour effectuer une partition liquide-liquide conduisant à l'obtention de la fraction d'acétate d'éthyle (E6). Du n-butanol a ensuite été ajouté à la phase aqueuse restante pour



effectuer une deuxième extraction liquide-liquide permettant d'obtenir une fraction butanolique (E7). La fraction aqueuse a été concentrée (E8) (figure 29).

II.3. Extraction avec du méthanol puis partition liquide-liquide

Une première extraction méthanolique par macération à froid a été réalisée et a abouti à l'obtention d'un extrait méthanolique (E9) ($m = 95$ mg). Cet extrait a été redissout dans l'eau puis des extractions liquide-liquide ont été réalisées et successivement avec l'hexane, acétate d'éthyle et le n-butanol. Trois fractions ont été obtenues : hexanique (E10), d'acétate d'éthyle (E11) et butanolique (E12) (figure 29).



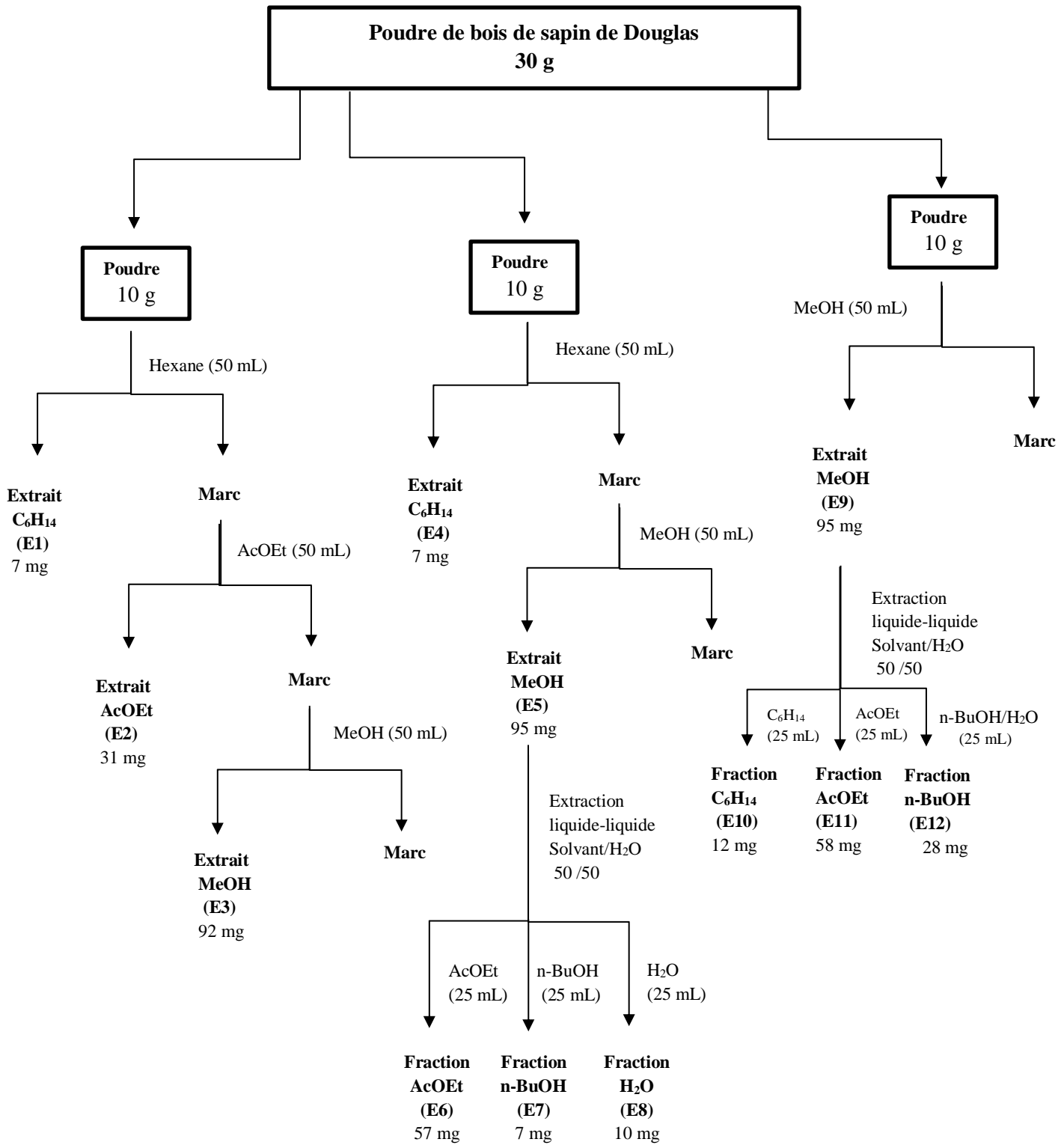


Figure 29 : Représentation schématique des extractions réalisées.



II.4. Extraction avec l'acétone aqueux.

Quatre échantillons de poudre de bois de Douglas ($m = 10\text{ g}$) ont été extraits par 50 mL d'un mélange acétone/eau à différents pourcentages de dilution (50/50 ; 70/30 ; 90/10 ; 100/0). Les extraits obtenus sont E13, E14, E15 et E16 (figure 30).

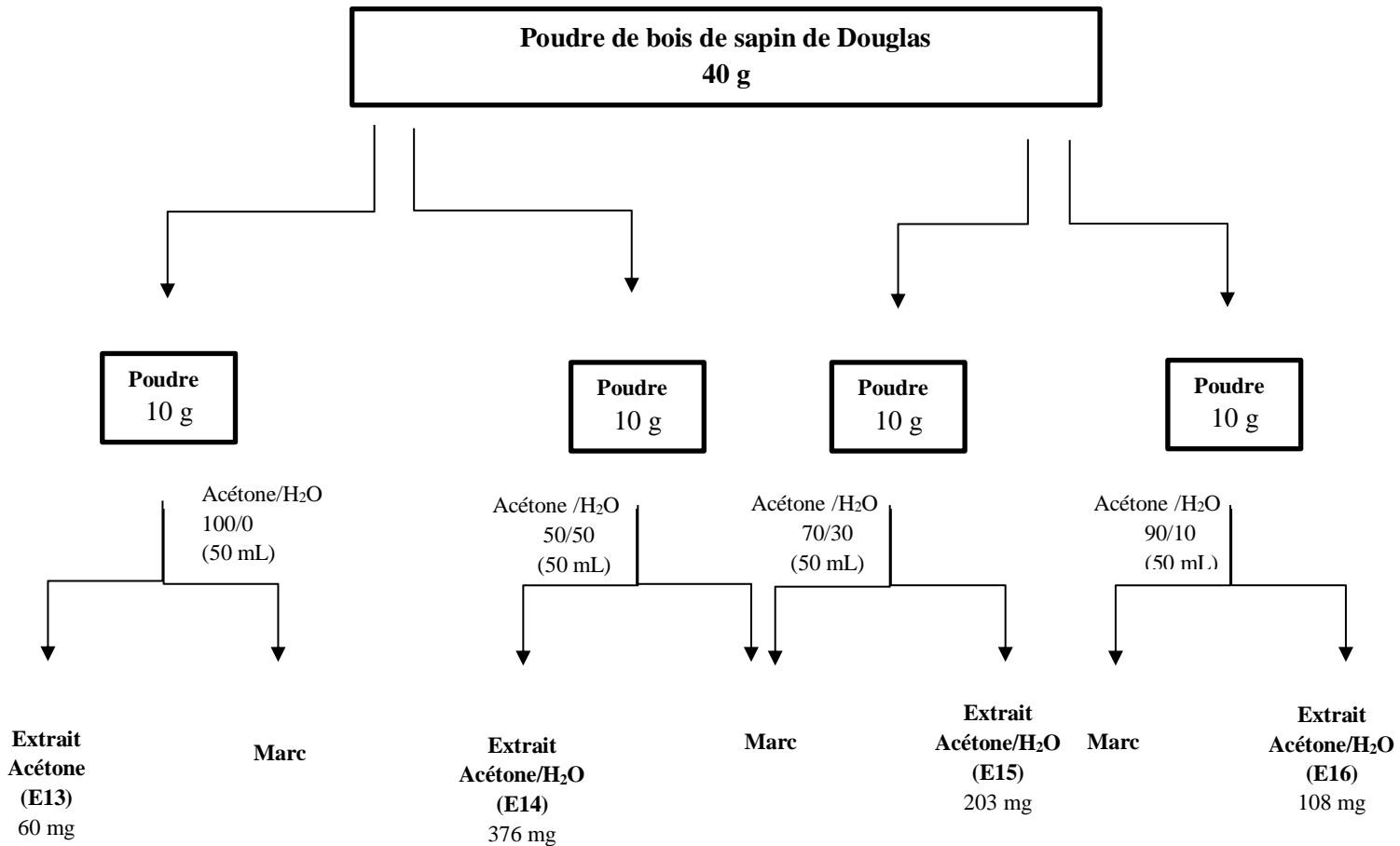


Figure 30 : Schéma présentant les extractions réalisées avec l'acétone et le mélange acétonique aqueux.

III. Méthodes d'extractions

III.1. Extraction par macération à froid

✓ Principe

Elle consiste à laisser en contact pendant une durée déterminée, un échantillon solide dans un solvant organique pour extraire les composés solubles.

✓ Conditions expérimentales

C'est l'échantillon de bois issu du broyage de la rondelle d'automne N°1 qui a été utilisée. Le mélange acétone/H₂O (70/30) a été employé comme solvant. L'ensemble a été mis sous agitation magnétique pendant 6 heures avant d'être filtré sur papier filtre. L'extraction a été renouvelée 4 fois sur le même échantillon de bois en utilisant à chaque fois 200 mL de solvant. Le filtrat a été concentré à sec avec un évaporateur rotatif. Les extraits de l'aubier et du duramen (tableau 2) ont été, par la suite fractionnés sur colonne de gel de Sephadex LH20®.

Tableau 1 : Résultats des extractions réalisées à partir d'échantillons d'aubier et de duramen.

Rondelles	Automne N°1	
	A	D
Zone	A	D
m _{bois} (g)	280	130
m _{ext} (g)	5	7
(%)	1,8	5,4

III.2. Extraction liquide sous pression

✓ Principe

L'ASE (Extraction Accélérée par Solvant) est une technique d'extraction qui utilise des températures et des pressions élevées afin de pouvoir effectuer des extractions de courtes durées. L'appareil utilisé est l'ASE 150® (DIONEX) (figure 31).



- ❶ Réservoir à solvant
- ❷ Cellule pour l'échantillon
- ❸ Four
- ❹ Panneau de contrôle
- ❺ Levier d'ouverture de l'enceinte contenant le four
- ❻ Flacon pour les déchets
- ❼ Commutateur (up/down)
- ❽ Flacon qui collecte l'extrait liquide
- ❾ Bac de récupération de fuites de liquides

Figure 31 : L'extracteur ASE 150[®] et ses principaux composants.

✓ Conditions expérimentales

- T = 100°C
- P = 10 bars (valeur recommandée par le manuel d'utilisation de l'appareil)
- m = 5 g
- Temps statique (temps pendant lequel la température reste constante) = 5 min
- Solvant : acétone/H₂O (70/30)
- Volume de solvant = 22 mL
- Volume de rinçage (quantité de solvant utilisé pour le rinçage de la cellule) = 13,2 mL
- Temps de purge (temps pendant lequel la cellule est purgée avec de l'azote) = 70 sec
- Cycle statique (nombre de cycle d'extraction et de rinçage effectué) = 1
- Nombre d'extraction = 3

Au niveau de la rondelle d'automne N°1, une masse de 5 g de poudre a été prélevée au niveau des échantillons de l'aubier, de la zone de transition et du duramen pour réaliser l'extraction. Les extraits obtenus ont été analysés par LC-MS/MS (tableau 3).

Tableau 2 : Résultats des extractions effectués avec l'ASE 150[®].

Rondelle	Automne N°1		
	A	T	D
m _{ext} (mg)	39	11	289
(%)	0,8	0,2	5,8



Dans le cas des échantillons de bois issu du broyage des rondelles prélevés aux quatre saisons de l'année, 5 g de poudre ont été prélevés pour réaliser les extractions. Chaque échantillon de bois a été extrait par un mélange acétone/eau (70/30)

Tableau 3 : Résultats des extractions réalisées sur les échantillons de bois prélevés aux 4 saisons de l'année.

Rondelles	Automne N°2 (341 g)			Hiver (324 g)			Printemps (505 g)			Été (231 g)		
	A	T	D	A	T	D	A	T	D	A	T	D
m_{bois} (g)	225	28	63	137	11	140	191	30	110	185	17	78
m_{ext} (mg)	470	180	190	213	164	236	152	169	289	123	265	117
(%)	9,4	3,6	4,3	4,3	3,3	4,7	3	3,4	5,8	2,5	5,3	2,3

IV. Fractionnement et purification des extraits issus du bois d'automne

IV.1. Extrait d'aubier

Les extraits obtenus précédemment à partir de chaque zone étudiée sont ensuite fractionnés sauf dans le cas de l'extrait provenant de la zone de transition qui a été directement analysé en spectrométrie de masse en tandem. Dans le cas de l'aubier, l'extrait acétone-eau ($m = 5$ g) a été fractionné à l'aide d'une colonne ($h = 100$ cm ; $d = 3,5$ cm) sur gel de Sephadex LH20[®] (masse de gel = 80 g). C'est une élution par gradient de solvants qui a été réalisée. Les solvants d'élutions qui ont été utilisés sont successivement : l'éthanol (100%) ($v = 100$ mL), le mélange méthanol/dichlorométhane (70/30 et 30/70) ($v = 100$ mL), l'acétone (100%) ($v = 100$ mL) et le mélange acétone/H₂O (70/30) ($v = 100$ mL). Au total, 15 fractions ont été obtenues (figure 32). Deux composés ont été isolés après repurification sur une colonne de gel de Sephadex LH20[®] ($h = 30$ cm ; $d = 2$ cm ; solvant : méthanol : $v = 100$ mL ; masse de gel = 24 g) à partir des fractions F7, F8 et F9 : les composés **P1** ($m = 11$ mg et $m = 9$ mg) et **P2** ($m = 8$ mg). Ces deux composés ont été caractérisés par RMN 2D et leurs structures ont été confirmées après avoir réalisé une analyse par LC-MS/MS des sous-fractions F8d et F9f dont ils sont issus. Les autres fractions de l'extrait d'aubier n'ont pas été

exploitées, car elles sont constituées de mélanges de plusieurs composés très polaires dont la purification est complexe. Cela a été démontré par les analyse en CCM (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5 ; révélateur : anisaldéhyde sulfurique). Ces fractions ont été analysés par LC-HRMS pour identifier des métabolites. L'une des sous-fractions (F6f) issue de la repurification de la fraction F6 sur une colonne de gel de Sephadex LH20[®] (h = 30 cm ; d = 2 cm ; solvant : méthanol : v = 100 mL ; masse de gel = 24 g) a également été analysée par LC-MS/MS.

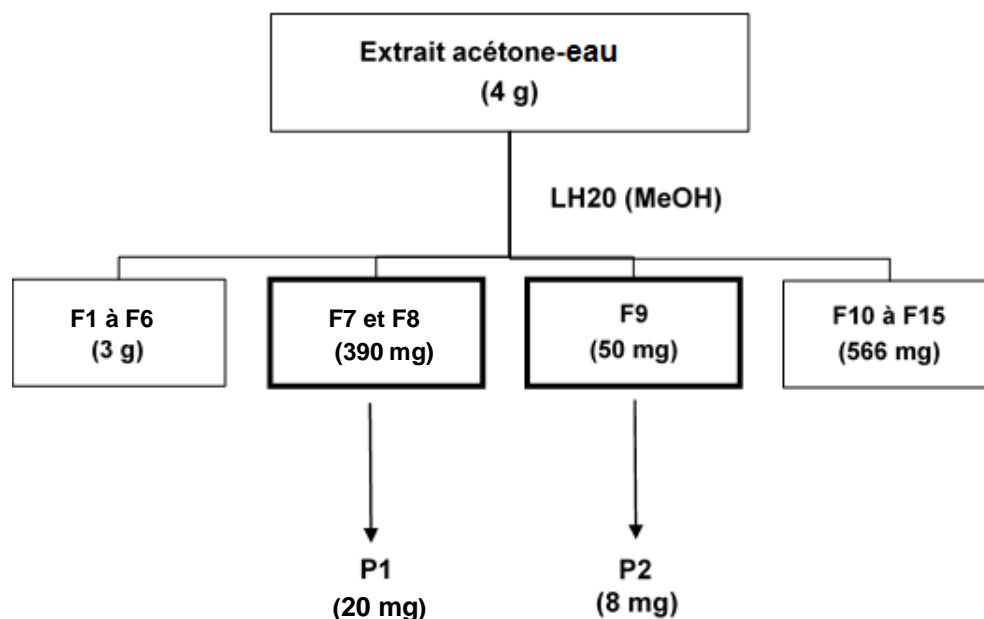


Figure 32 : Schéma général du fractionnement et de la purification de l'extrait d'aubier.

IV.2. Extrait de duramen

Au niveau du l'extrait de duramen, une étape d'extraction liquide-liquide a été réalisée avant d'effectuer le fractionnement afin d'isoler les composés en fonction de leur polarité (figure 33). L'extrait a été redissous dans l'eau afin d'effectuer des extractions liquide-liquide avec successivement l'éther d'éthyle, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Quatre fractions correspondantes ont été obtenues : d'éthyle (m = 3 g), d'éthyle (m = 2 g), butanolique (m = 1 g) et aqueuse (m = 1 g). La fraction d'éther d'éthyle qui a été repurifiée en premier à l'aide d'une colonne (h = 100 cm ; d = 3,5 cm) de gel de Sephadex LH20[®] (masse de gel = 80 g), a été éluée par le méthanol. Le fractionnement a permis d'obtenir 9 sous fractions et les produits **P3** et **P4** ont été isolés puis caractérisés par RMN 2D au niveau des sous fractions F3

et F5 (figure 32). Les sous-fractions au niveau desquelles des composés n'ont pas été isolés, ont été analysées par LC-MS/MS pour identifier des métabolites.

La seconde fraction à être purifiée est celle de l'acétate d'éthyle. La purification a été effectuée sur une colonne de silice ($h = 100 \text{ cm}$; $d = 3 \text{ cm}$; masse de silice = 90 g) avec une élution par gradient de solvants (dichlorométhane/méthanol : 95/5 à 80/20) et 8 sous fractions ont été obtenues. Après avoir rassemblé les sous fractions F2 et F3 qui se sont révélées être identiques d'après les résultats de l'analyse par CCM (éluant : $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{AcOEt}$: 80/20 ; révélateur : anisaldéhyde sulfurique), le produit **P4** a été isolé. Les autres sous fractions ont été analysées par LC-MS/MS pour identifier les composés qui n'ont pas été isolés.

Les fractions butanoliques et aqueuses n'ont pas été purifiées car les résultats de l'analyse par CCM ont montré la présence de composés très polaires qui ne peuvent pas être isolés avec les méthodes de purifications utilisées. L'analyse par LC-MS/MS de ces fractions a été réalisée pour identifier ces composés.



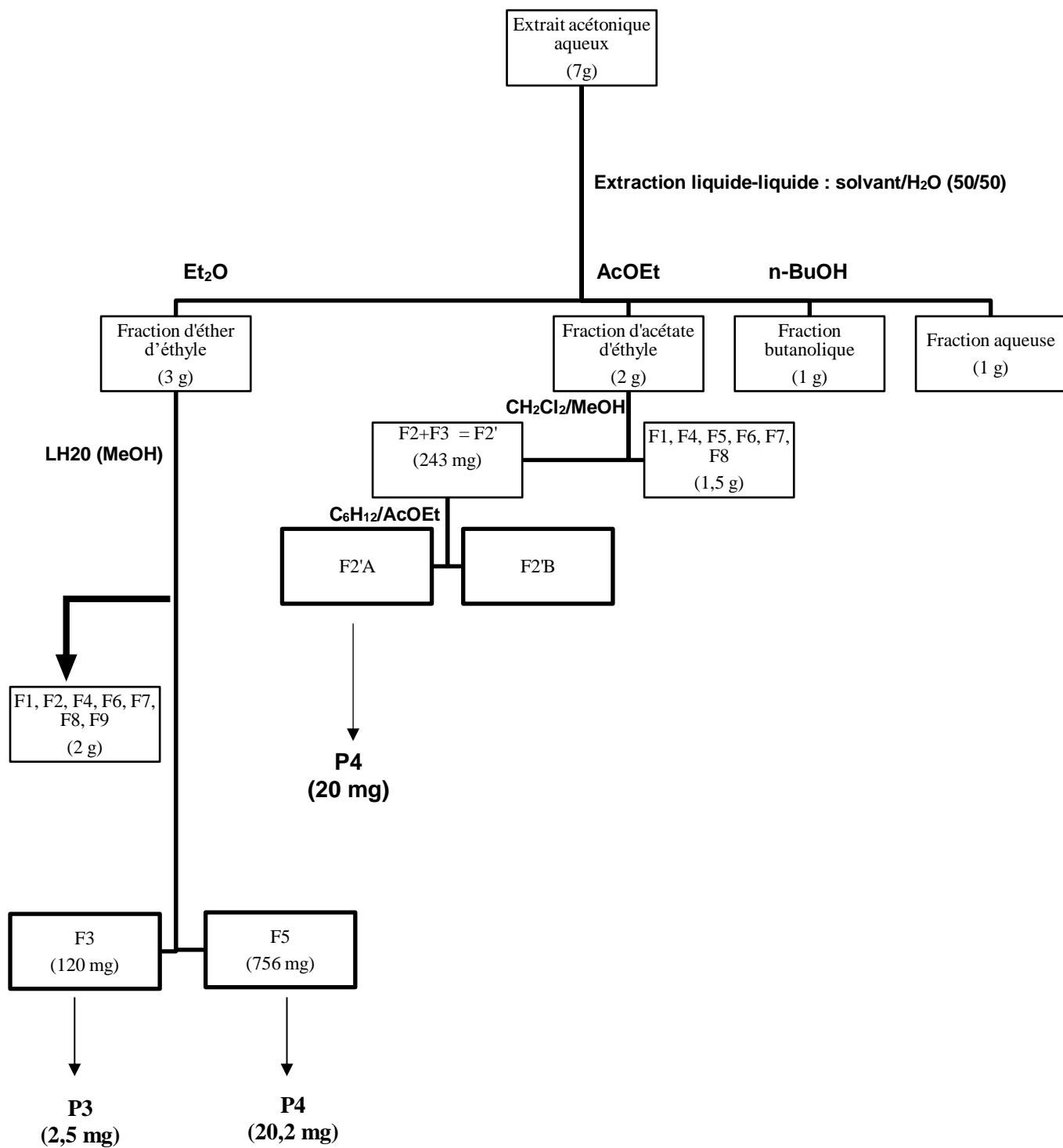


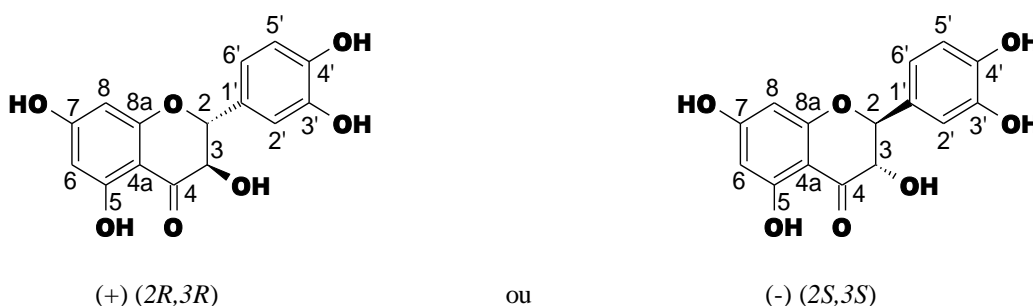
Figure 33 : Schéma général du fractionnement et de la purification de l'extrait du duramen.



IV.3. Description des produits isolés

Quatre composés ont été isolés après purification des extraits de l'aubier et du duramen. Les produits isolés sont :

- Le produit **P1** a été isolé dans les fractions F7 et F8 de l'extrait acétone aqueux de l'aubier. Ce produit a été identifié comme étant la taxifoline [5] par analyse en RMN 1D et 2D. Il existe 4 diastéréoisomères [111] possibles de ce composé dont deux ont été isolés dans les fractions (le majoritaire pour F7 et en mélange de deux composés pour F8). Ce produit est une poudre d'aspect brun clair. L'analyse par LC-MS/MS de la sous-fraction a été également effectuée pour confirmer la structure du composé (figure 31).



Diastéréoisomères majoritaires de la taxifoline

Formule brute : $C_{15}H_{12}O_7$.

Masse molaire : 304 g/mol.

Point de fusion : 220°C.

UV (analyse CLHP-UV) λ_{\max} : 288 nm.

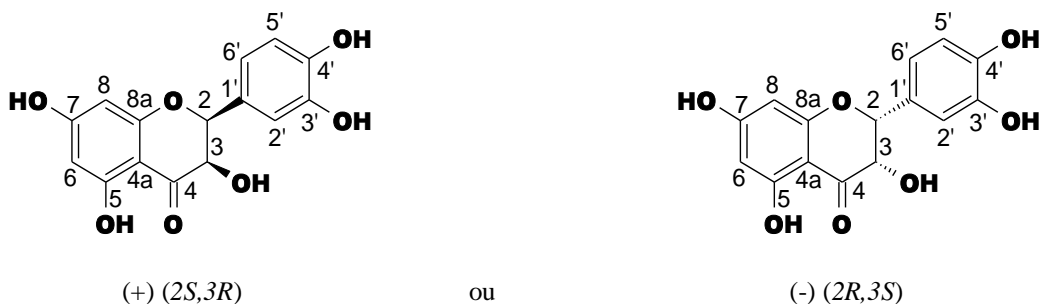
CCM : $R_f = 0,24$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95/5).

Révéléateur : anisaldehyde sulfurique (coloration : brun clair).

Fraction F7 : diastéréoisomère majoritaire.

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD) : 6,96 (d, H-2', $J = 1,6$ Hz) ; 6,83 (dd, H-6', $J = 1,6$ et 8,2 Hz) ; 6,74 (d, H-5', $J = 8,2$ Hz) ; 5,92 (d, H-6, $J = 1,9$ Hz) et 5,88 (d, H-8, $J = 1,9$ Hz) ; 4,89 (d, H-2, $J = 11,5$ Hz) ; 4,48 (d, H-3, $J = 11,5$ Hz).

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 198,6 (C-4) ; 165,5 (C-5) ; 168,7 (C-7) ; 164,7 (C-8a) ; 147,3 (C-4') ; 146,5 (C-3') ; 130,0 (C-1') ; 121,0 (C-6') ; 116,2 (C-5') ; 116,0 (C-2') ; 102,0 (C-4a) ; 97,5 (C-6) ; 96,4 (C-8) ; 85,3 (C-2) ; 73,8 (C-3).



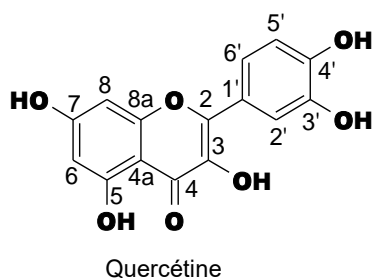
Diastéréoisomères minoritaires de la taxifoline

Fraction F8 : diastéréoisomère minoritaire.

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD) : 6,99 (d, H-2', *J* = 1,6 Hz) ; 6,83 (dd, H-6', *J* = 1,6 et 8,2 Hz) ; 6,77 (d, H-5', *J* = 8,2 Hz) ; 5,95 (d, H-6, *J* = 2,0 Hz) et 5,90 (d, H-8, *J* = 2,0 Hz) ; 5,29 (d, H-2, *J* = 2,5 Hz) ; 4,18 (d, H-3, *J* = 2,5 Hz).

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 196,7 (C-4) ; 168,8 (C-7) ; 164,7 (C-5) ; 164,6 (C-8a) ; 146,7 (C-4') ; 146,3 (C-3') ; 128,9 (C-1') ; 120,2 (C-6') ; 116,2 (C-5') ; 116,1 (C-2') ; 101,9 (C-4a) ; 97,3 (C-6) ; 96,4 (C-8) ; 83,1 (C-2) ; 73,3 (C-3).

- Le produit **P2** qui a été isolé dans la fraction F9 de l'extrait d'aubier. Il a été identifié comme étant la quercétine[5] par RMN 1D et 2D. Ce composé se présente sous la forme d'une poudre jaune. L'analyse par LC-MS/MS de la sous-fraction a été réalisée pour confirmer la structure de ce composé.



Formule brute : C₁₅H₁₀O₇.

Masse molaire : 302 g/mol.

Point de fusion : 316°C.

UV (analyse CLHP-UV) λ_{max} : 254 nm, 370 nm.

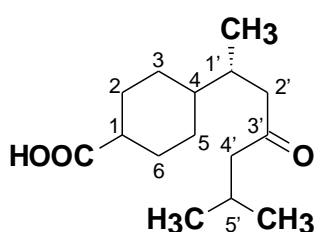
CCM : R_f = 0,36 (CH₂Cl₂/MeOH 95/5).

Révéléateur : anisaldéhyde sulfurique (coloration : jaune) ou au chlorure ferrique.

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD) : 7,73 (d, H-2', *J* = 2,0 Hz) ; 7,62 (d, H-6', *J* = 2,0 et 8,5 Hz) ; 6,87 (d, H-5', *J* = 8,5 Hz) ; 6,38 (d, H-8 et H-6, *J* = 2,0 Hz).

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 177,5 (C-4) ; 162,7 (C-7) ; 165,8 (C-5) ; 158,4 (C-8a); 148,1 (C-4') ; 146,4 (C-3') ; 124,3 (C-1') ; 121,8 (C-6') ; 116,4 (C-5') ; 116,1 (C-2') ; 104,7 (C-4a) ; 99,4 (C-6) ; 94,6 (C-8) ; 137,4 (C-2) ; 148,0 (C-3).

- Le produit **P3** a été isolé dans la fraction d'éther d'éthyle du duramen. Ce produit qui se présente sous la forme d'une poudre incolore a été identifié comme étant l'acide dihydrotodomatique[83].



Acide dihydrotodomatique

Formule brute : C₁₅H₂₆O₃.

Masse molaire : 254 g/mol.

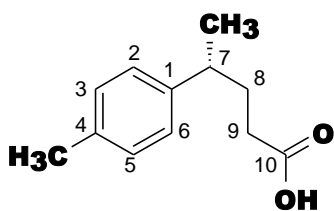
CCM : R_f = 0,42 (C₆H₁₄/AcOEt 80/20).

Révéléateur : anisaldehyde sulfurique (Coloration : bleue).

RMN¹H (400 MHz, CD₃OD): 2,66 (s él., H-1) ; 2,25 (d, H-4', J = 2,0 Hz) ; 2,07 (m, H-2 et H-6) ; 2,07 (m, H-2') ; 2,07 (m, H-5') ; 1,90 (m, H-1') ; 1,51 (m, H-3 et H-5) ; 1,22 (m, H-4) ; 0,91 (d, CH₃-5', J = 2,8 Hz) ; 0,89 (d, CH₃-5', J = 2,8 Hz) ; 0,82 (d, CH₃-1', J = 6,8 Hz).

RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD) : 211,1 (C-3') ; 180,0 (COOH) ; 52,4 (C-4') ; 48,0 (C-2') ; 41,8 (C-4) ; 39,3 (C-1) ; 33,1 (C-1') ; 27,0 (C-2 et C-6) ; 26,6 (C-3 et C-5) ; 24,5 (C-5') ; 22,6 (CH₃-5') ; 22,5 (CH₃-5') ; 16,8 (CH₃-1').

- Le produit **P4** a été isolé dans les fractions d'éther d'éthyle et d'acétate d'éthyle du duramen. Ce produit qui est une poudre incolore a été identifié comme étant l'acide-4-(4-méthylphényl)pentanoïque [112] ou acide 4-p-tolylvalérique [113] après l'analyse de la fraction par RMN 2D.



Acide 4-p-tolylvalérique

Formule brute : $C_{12}H_{16}O_2$.

Masse molaire : 192 g/mol.

CCM : $R_f = 0,39$ ($C_6H_{12}/AcOEt$ 80/20).

Révéléateur : anisaldéhyde sulfurique (coloration : marron).

RMN¹H (400 MHz, CD_3OD) : 7,05 (m, H-2, H-3, H-5 et H-6) ; 2,64 (m, H-7) ; 1,81 (m, H-8) ; 2,09 (ddd, H-9, $J = 12,1$ Hz, 5,9 Hz et 1,5 Hz) ; 2,29 (s, CH_3 -4) ; 1,22 (d, CH_3 -7, $J = 6,9$ Hz).

RMN¹³C (100 MHz, CD_3OD) : 179,6 (C-10) ; 145,1 (C-1) ; 136,7 (C-4) ; 130,2 (C-3 et C-5) ; 128,1 (C-2 et C-6) ; 40,6 (C-7) ; 35,3 (C-8) ; 34,8 (C-9) ; 22,9 (CH_3 -7) ; 21,2 (CH_3 -4).

V. Méthodes de séparations et techniques analytiques

V.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

✓ Principe

C'est une technique de chromatographie permettant de séparer des mélanges de composés en se basant sur les différences d'affinité des composés à l'égard d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. La phase stationnaire est solide et est fixée sur plaque en aluminium. La phase mobile correspond à l'éluant qui peut être un mélange de solvant. Le mélange à séparer est déposé en faible quantité sur la phase stationnaire. Ensuite cette phase fixe est mise en contact avec la phase mobile qui va migrer vers le haut de la plaque par capillarité et entrainer les constituants du mélange. Chaque composé est caractérisé par son rapport frontal (R_f) qui correspond au rapport entre la distance de migration du composé sur celle du front de solvant.

$$R_f = \frac{\text{Distance de migration du composé}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

✓ Conditions expérimentales

Chaque CCM a été réalisée sur une phase stationnaire qui correspond à une plaque d'aluminium recouverte d'un gel de silice (Si₆₀ F₂₅₄) avec un indicateur de fluorescence MERCK®. Le solvant d'éluion ou la phase mobile utilisée est un mélange de solvant qui diffère selon la polarité de l'extrait ou de la fraction étudiée. Après migration, la plaque est observée sous une lampe UV à 254 et 365 nm puis révélée avec l'anisaldéhyde sulfurique (révélateur universel).

V.2. Chromatographies sur colonne

V.2.1. Chromatographie sur colonne de silice

✓ Principe

C'est une technique qui permet de séparer des produits en fonction de leur polarité et affinité sur silice. L'éluion des composés est effectuée des moins polaires aux plus polaires.

✓ Conditions expérimentales

La phase stationnaire utilisée est le gel de silice (POLYGOPREP 60-20 ; 15-25 µm ; Art .711240.1000) dont la masse est 100 fois supérieure à celle de l'extrait ou de la fraction à purifier, et d'une phase mobile à savoir un mélange d'éluant (dichlorométhane/méthanol ou cyclohexane/acétate d'éthyle) dont les gradients d'éluions sont : dichlorométhane/méthanol/95/5 et cyclohexane/acétate d'éthyle/80/20 à 100% d'acétate d'éthyle. Le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire a été effectué soit en solution ou soit par dépôts à sec. Les fractions obtenues ont été recueillies soit dans des tubes à hémolyse (5 mL), soit dans des tubes pour collecteur de fraction (Spectra/Chrom® CF-2 Fraction collector).

V.2.2. Chromatographie liquide à moyenne pression

✓ Principe

C'est une technique qui permet de séparer des produits en fonction de leur polarité en utilisant un solvant soumis à une pression de l'ordre de 10 à 20 bars.

✓ Conditions expérimentales

Le système de chromatographie est constitué d'une phase stationnaire qui est une colonne remplie de silice (POLYGOPREP 60-20 ; 15-25 μm ; Art .711240.1000) et une phase mobile qui est un mélange de solvant ($\text{C}_6\text{H}_{12}/\text{AcOEt}$) mis sous pression à l'aide d'une pompe BUCHI (Pump manager C-15, Sepacore®). La taille de la colonne ainsi que le volume de la phase stationnaire varient selon la quantité d'échantillon à purifier (20 à 50 cm de hauteur). L'échantillon est déposé sur la phase stationnaire soit en solution ou par dépôt à sec.

V.2.3. Chromatographie d'exclusion stérique

✓ Principe

Cette technique de purification utilise un gel de dextrane qui apparaît sous la forme de billes poreuses. Il existe plusieurs types de gel de Sephadex qui se différencient par la taille et la porosité des billes. Cette méthode chromatographique permet de séparer les composés en fonction de leur taille. Les petites molécules pourront pénétrer à l'intérieur des billes de Séphadex car elles possèdent un diamètre inférieur à celui des pores du gel. Les grosses molécules ne pourront pas pénétrer dans les billes et seront exclues du gel à cause de leur grande taille. Ainsi les grosses molécules seront éluées en premier, car elles auront un trajet plus court tandis que les petites molécules seront éluées en dernier parce qu'elles auront une plus longue distance à parcourir pour atteindre le bas de la colonne.

✓ Conditions expérimentales

Le gel de Sephadex qui a été utilisé est de type LH-20® (SIGMA-ALDRICH ; diamètre des billes : 25-100 μm), car il est adapté aux solvants organiques pour la séparation des métabolites (les terpènes, les composés phénoliques, les lipides et des peptides) de faibles poids moléculaires. Le choix des colonnes sur lesquelles a été déposé le gel sephadex, varie en fonction de la quantité d'extrait à purifier. Il s'agit des colonnes allant de 23 à 100 cm de hauteur avec un diamètre interne de 2 ou 3 cm. L'extrait solide a été préalablement solubilisé dans le solvant d'éluion (méthanol) avant d'être déposé sur le gel.

V.3. Chromatographie liquide haute performance couplée avec un détecteur UV-visible

✓ Principe

Elle permet de séparer des composés en fonctions de leur affinité avec une phase stationnaire. Si la phase stationnaire est apolaire, les produits polaires seront élués en premier tandis que les produits peu polaires seront élués en dernier.

✓ Conditions expérimentales

Une colonne de silice phase inverse (Hibar® 250-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm)) a été choisie comme phase stationnaire pour réaliser la séparation chromatographique à un débit de 0,8 mL/min. Les solvants d'élution utilisés sont :

- Solvant A : H₂O
- Solvant B : ACN

Les gradients d'élution utilisés au cours de l'analyse sont résumés sur le tableau ci-dessous :

T(min)	%B
0	10
60	60
65	10

Chaque fraction ou extrait a été solubilisé dans l'ACN à une concentration de 1mg/mL, puis un aliquote de chacune d'entre elles a été transvasé dans des tubes de 2 mL (KIMBLE®, vial, clear, Autosampler). Ces tubes ont ensuite été placés dans un appareil HPLC alliance (HPLC waters 2690 Alliance) couplé à un détecteur à barrettes de photodiodes (Waters 996 Photodiode Array Detector). L'appareil muni d'un injecteur automatique a ensuite été configuré) pour injecter 10 µL de chaque échantillon et permettre à la phase mobile de parcourir le système chromatographique avec une pression de 1600 Psi. Enfin les spectres UV ont été observés entre 210 et 395 nm.



V.4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Le système HPLC consiste en une pompe Shimadzu LC 10 ADvp (Japon) avec un auto-injecteur SIL-Ht et un four CTO-10ASvp (plateforme SCRABL). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Atlantis T3 (100 Å, 5 µm, 2,1 mm x 100 mm) (Waters) à un débit de 0,2 mL/min.

- Solvant A : Eau / 0,1% acide formique
- Solvant B : acétonitrile / 0,1% acide formique

L'élution est réalisée comme suit : équilibration à 5% de solvant B, augmentation à 95% de B en 30 min, 95% de B maintenu pendant 5 min, enfin diminution à 5% de B en 2 min et rééquilibration de la colonne pendant 8 min.

La détection est effectuée par un spectromètre de masse hybride triple quadrupole / trappe d'ions linéaire 4000 Q-TRAP® équipé d'une source d'ionisation Electrospray turbo Ion Spray (ESI) et contrôlé par le logiciel Analyst 1.5 (plateforme SCRABL).

L'ionisation est effectuée en mode négatif avec les paramètres suivants :

- Voltage Ion Spray (IS), -4 500 V
- Température de source : 500°C
- Curtain gas, 15 unités arbitraires
- Ion source gas 1 et 2, respectivement 20 et 30 unités
- Declustering Potential (DP), -50 V
- Gaz de collision : azote

L'acquisition est réalisée en mode IDA (Information-Dependent Acquisition) : le spectromètre de masse alterne en continu entre un survey scan en mode Enhanced MS (scan MS avec accumulation des ions dans la trappe linéaire) et un à trois dépendant scan en mode EPI (Enhanced Product Ion scan) : les 3 ions les plus intenses de chaque spectre MS sont sélectionnés comme ions parents (sans autres critères de sélection), et sont fragmentés en EPI (Collision Energy (CE), $-40V \pm 15 V$) pour obtenir les spectres de fragmentation (MS/MS)

spécifiques à chaque molécule sélectionnée (ensemble des « ions fragments »). Chaque ion peut être sélectionné pour un maximum de 2 occurrences consécutives, il est ensuite exclu pendant 30 secondes. Cette exclusion a pour but de limiter la sélection des ions majoritaires et de descendre en sensibilité.

La durée d'analyse est de 45 min avec les gammes de masses (m/z) 100-600 Da (sous-fractions de l'aubier) et 50-1000 Da (extraits des trois zones du bois et fractions du duramen). Chaque analyse a permis d'obtenir un courant ionique total ou Total Ion Current (TIC) qui est un spectre montrant les intensités des ions présents dans l'échantillon analysé en fonction de leur temps de rétention (t_R). Ce sont les spectres MS/MS des composés présentant des valeurs d'intensité de TIC supérieure ou égale à 1^5 (ou 1×10^5) qui ont été pris en compte pour l'identification parce qu'ils sont majoritaires dans l'échantillon.

V.5. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Le système HPLC correspond à une pompe Dionex Ultimate® 3000 RSLC (Allemagne) (plateforme HRMS ICOA d'Orléans). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Acclaim® RSLC 120 C18 (120 Å, 2,2 µm, 2,1 mm x 250 mm) (Dionex) à un débit de 500 µL/min.

- Solvant A : Eau / 0,1% acide formique
- Solvant B : acétonitrile / 0,08% acide formique

L'élution est réalisée comme suit : équilibration à 3% de solvant B, augmentation à 70% de B en 30 min, 95% de B maintenu pendant 7 min, enfin diminution à 3% de B en 1 min et rééquilibration de la colonne pendant 5 min.

La détection est effectuée par un spectromètre de masse hybride quadrupole / temps de vols d'ions Q-TOF® équipé d'une source d'ionisation Electrospray (ESI) et contrôlé par le logiciel DataAnalysis 4.1 (plateforme HRMS ICOA d'Orléans).

L'ionisation est effectuée en mode négatif avec les paramètres suivants :

- Voltage Ion Spray (IS), -4 500 V
- Température de source : 200°C



La Méthode d'acquisition utilisée est : CYC - Small MW - 2013-07-25 - LCMS-NEG.m. La durée d'analyse est de 40 min avec la gamme de masse (m/z) 50-2500 Da. La recherche des formules brutes des composés a été ensuite effectuée à partir des données de spectrométrie de masse et en utilisant plusieurs critères qui sont la tolérance en masse (3 ppm), la parité électronique (les ions radicaux sont exclu), le nombre d'atomes de C, H, O (le nombre minimal de C est déterminé automatiquement par la distribution isotopique, le ratio H/C est compris entre 0 et 3 , le nombre d'insaturations inférieur à 80 et nombre maximum d'atome est illimité) et d'atome de N (le nombre maximum est 6).

V.6. Quantification relative par MRM.

✓ Principe

La MRM (Monitoring réaction multiple) ou suivi de réactions multiples est une technique qui utilise la spectrométrie de masse en tandem pour quantifier des molécules d'intérêts en se basant sur l'abondance d'un ou plusieurs ions fragments caractéristiques. Ce type d'analyse est effectué avec un spectromètre de masse de type QTRAP couplé à un système de chromatographie liquide. L'analyse comprend deux étapes de sélection d'ions de m/z prédéfinis. Au cours de la première étape un ion précurseur de m/z prédéfini est sélectionné dans le premier quadrupole de l'appareil. L'ion est ensuite fragmenté dans le deuxième quadrupole par collision avec un gaz puis un fragment spécifique de l'ion précurseur prédéfini est sélectionné dans le troisième quadrupole. L'intensité du signal généré par ce fragment est utilisée pour la quantification du composé analysé. La combinaison de la valeur m/z du composé à quantifier (ion précurseur) et la valeur m/z du fragment forme un ensemble appelé « transition ». Ces valeurs sont définies avant l'analyse et sont utilisées pour paramétrer le spectromètre de masse.

✓ Conditions expérimentales

Le système qui a été employé pour l'analyse est un spectromètre de masse PerkinElmer à triple quadrupole QTRAP 4000 (AB-Sciex) couplé à une pompe Shimadzu LC 10 ADvp avec un auto-injecteur SIL-Ht et un four CTO-10ASvp (plateforme SCRABL). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Atlantis T3 (100 Å, 5 μ m, 2,1 mm x 150 mm) (Waters) à un débit de 0,2 mL/min.

Les gradients d'élution utilisés au cours de l'analyse sont résumés sur le tableau ci-dessous :

T (min)	%B ACN + 0,1% acide formique	%A H₂O + 0,1% acide formique
0	5	95
2	20	80
17	40	60
22	75	85
23	95	5
28	95	5
35	5	95

Les spectres MS/MS obtenus ont permis de mettre en place la méthode de quantification en sélectionnant les 2 ou 3 fragments les plus intenses.

V.7. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un appareil Brücker DPX-400, respectivement à une fréquence de 400,13 MHz pour le proton et de 100,62 MHz pour le carbone (plateforme SCRABL). Les paramètres relevés sur les spectres 1D (¹H et ¹³C) sont les déplacements chimiques δ exprimés en ppm en prenant le tétraméthylsilane comme référence interne et les constantes de couplage J exprimées en Hz et calculées d'après la multiplicité du signal. Les abréviations retenues pour nommer les figures sont ; s (singulet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). Les figures élargies comportent un « él » en indice.

La RMN 2D (2 dimensions) regroupe les spectres HMBC, HSQC et COSY. Le spectre HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) qui permet d'établir la corrélation directe entre le proton et le carbone qui le porte (couplage ¹H-¹³C). Le spectre COSY (CORrelated SpectroscopY) permet de déterminer les couplages homonucléaires ²J ou ³J entre protons vicinaux et adjacents et enfin le spectre HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) montre les corrélations proton-carbone à travers 2 à 4 liaisons (²J, ³J ou ⁴J).

Les solvants utilisés sont le chloroforme deutéré (CDCl₃) et le méthanol deutéré (CD₃OD).

VI. Méthode d'évaluation biologique

Mesure de l'activité antioxydante par résonance paramagnétique électronique

Principe

Elle a été effectuée sur un spectromètre RPE (Résonance Paramagnétique Electronique). Il existe deux types de techniques de mesure : le spin-labelling [114] et le spin-trapping [115]. La technique qui a été utilisée est le spin labelling qui consiste à mettre l'échantillon à étudier en présence d'un composé radicalaire ou spin-label qui est stable au cours du temps et donne un spectre caractéristique en RPE.

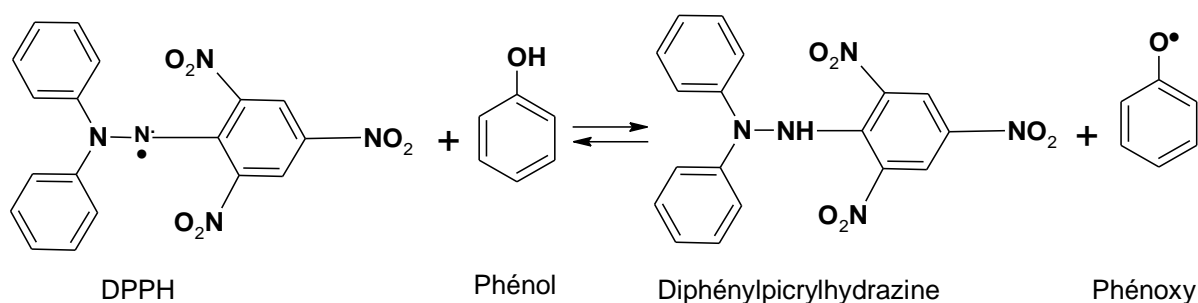


Figure 34 : Réaction chimique du DPPH avec un phénol.

La mesure de l'activité antioxydante d'un composé présent dans un échantillon est déterminée par l'aptitude du composé à capter le radical en le transformant en un composé non radicalaire sans réponse en RPE (figure 34). Ainsi la réduction du radical se caractérise par la diminution de l'amplitude du signal mesuré. Le DPPH (1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazyl) est le radical qui a été choisi pour réaliser les mesures de l'activité antioxydante des extraits car il est compatible avec tous les solvants utilisés et présente les caractéristiques d'un bon spin-label.

Détermination de l'activité antioxydante des extraits de bois de Douglas

Une solution éthanolique du radical DPPH à une concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M a été mélangé, à volume égal, au solvant d'extraction pour obtenir le signal de référence.

Ensuite une nouvelle mesure a été effectuée avec la solution de l'extrait à tester et la solution du radical DPPH à volume égal. Cette mesure permet de diminuer le nombre de radicaux libres et entraîne une baisse du signal.

Et enfin une nouvelle mesure de la double intégrale du signal correspondant au mélange des solutions d'extrait et de DPPH a été effectuée pour quantifier l'activité antioxydante. Chaque mesure a été effectuée à trois reprises. Les résultats qui sont exprimés en pourcentage d'inhibition du signal de référence, s'obtiennent par la formule suivante :

$$\%inhibition = \frac{ref - extrait}{ref - bdf}$$

ref = double intégrale du signal de référence

extrait = double intégrale pour le mélange DPPH+extrait

bdf = bruit de fond

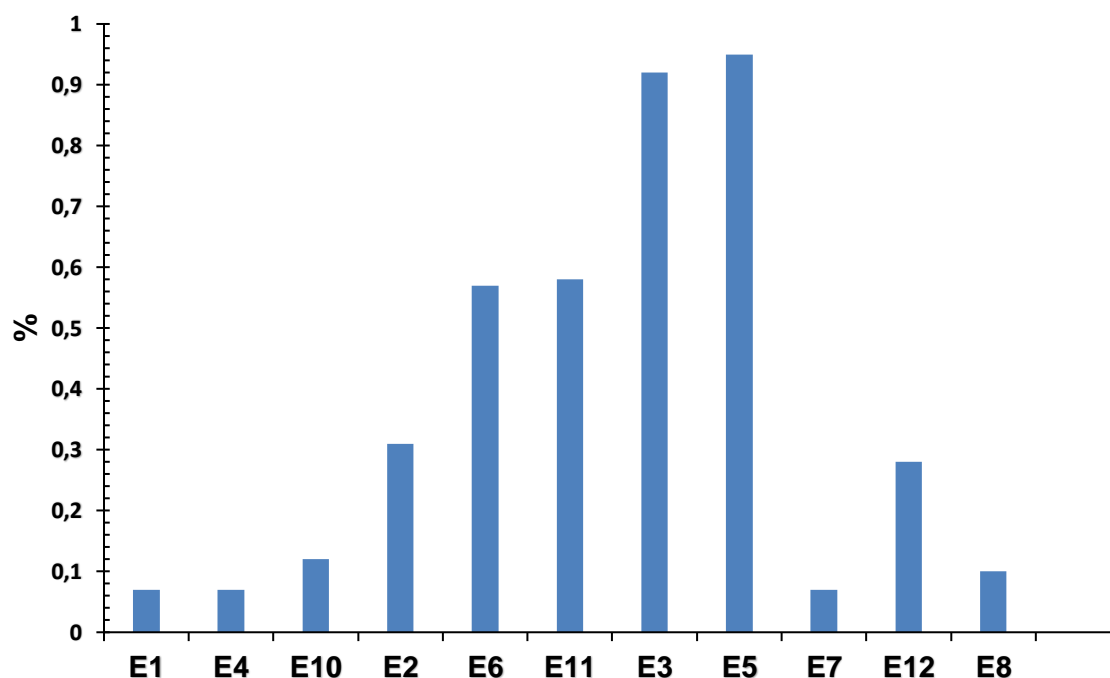


Partie III. Résultats et discussions

I. Choix du solvant d'extraction

Les extractions ont été effectuées par macération à froid en utilisant soit des solvants des polarités croissantes soit un solvant polaire après délipidation ou non suivie d'une partition liquide-liquide ont permis d'obtenir 16 extraits (E1 à E16) (figures 29 et 30).

Après avoir déterminé les pourcentages massiques, on remarque une variation relativement importante de la quantité des molécules extraites en fonction de la polarité du solvant. Avec un solvant apolaire (hexane) de faibles pourcentages massiques sont obtenus (E1, E4, E10) tandis que dans le cas des solvants polaires, ils sont relativement élevés (E2, E3, E5 à E16) (figures 35A et B).



(A)



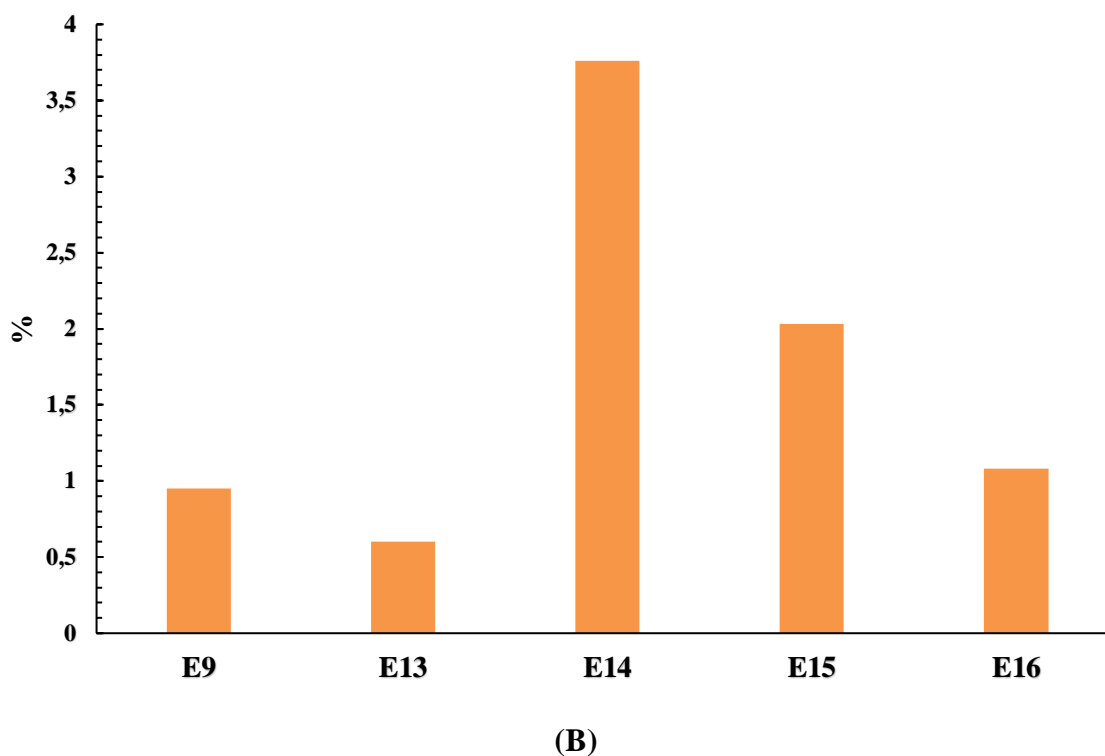


Figure 35 : Pourcentages massiques des extractions effectuées.

Les extractions les plus efficaces sont celles qui ont été réalisées avec les solvants moyennement polaires ou polaires tels que l'acétone (E13), le MeOH (E9), et les mélanges acétone/eau (E14, E15 et E16) (figure 35B) sans passer préalablement par des étapes de délipidation ou de partition liquide-liquide (E1 à E12). Le pourcentage massique le plus élevé est obtenu avec le mélange acétone/eau (50/50) (figure 35A). Cela est dû à la polarité des métabolites secondaires présents dans le bois de Douglas. En effet, il contient une proportion importante de polyphénols qui sont majoritairement de polarité intermédiaire [5]. Avec le MeOH seul, ce sont uniquement des produits polaires qui sont extraits tandis que l'acétone entraîne les produits apolaires et moyennement polaires. La combinaison de l'acétone et l'eau est un bon compromis pour extraire les composés de différentes polarités.

L'activité antioxydante des extraits obtenus a été également mesurée par RPE (Résonance Paramagnétique Electronique). Cette activité est la capacité d'un composé appelé antioxydant à piéger un radical en le transformant en un composé non radicalaire. Ces antioxydants sont capables de piéger et d'inhiber les « Espèces Réactives de l'Oxygène » (ERO) qui favorisent la détérioration du bois par oxydation [116].

C'est la raison pour laquelle dans notre étude nous avons voulu déterminer prioritairement les extraits qui présentent une activité antioxydante intéressante. Cette mesure est basée sur la

détermination de la capacité de chaque extrait à inhiber le radical DPPH. Les résultats (figure 36) ont montré que ce sont les extraits E3, E6, E12, E14 et E16 qui ont les meilleures activités antioxydantes avec un pourcentage d'inhibition du radical DPPH > 75% (l'activité antioxydante est efficace lorsque le pourcentage d'inhibition du DPPH est > 50%) [117]. Les extraits E3, E6 et E12 sont issus de l'extraction directe avec le MeOH ou après partition avec l'AcOEt et le n-BuOH et contiennent des produits moyennement polaires et polaires [118].

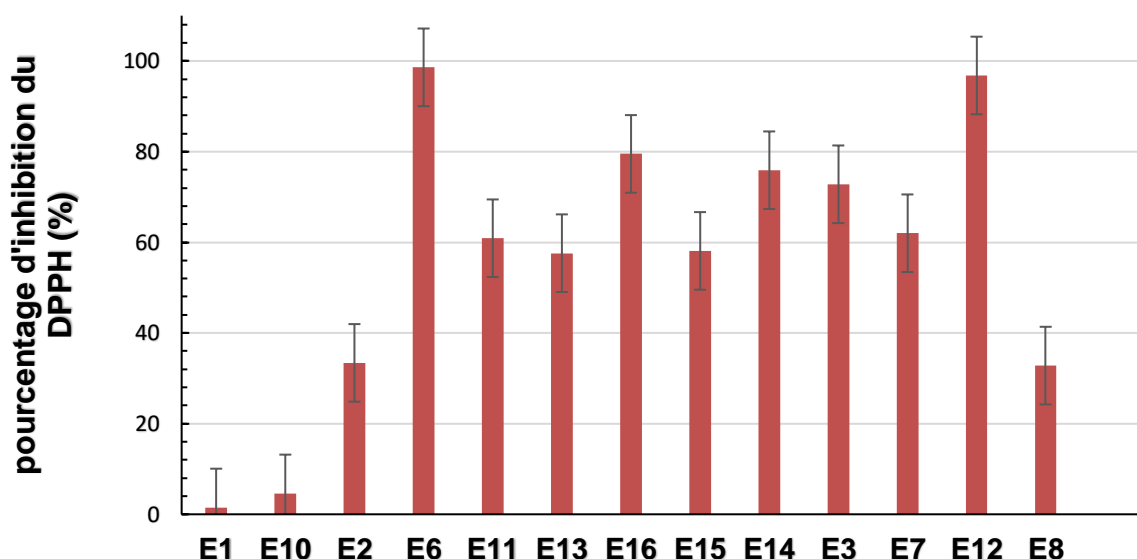


Figure 36 : Résultats de la mesure de l'activité antioxydante des extraits.

Après avoir effectué plusieurs extractions en utilisant des solvants ayant des polarités différentes et mesuré l'activité antioxydante des extraits obtenus, le solvant choisi pour l'extraction des métabolites du bois Douglas est le mélange acétone/eau (70/30) (E15). Avec ce solvant, un pourcentage important de molécules présentant une activité antioxydante intéressante (pourcentage d'inhibition du DPPH de 79,5%) et des polarités différentes (présence de produits peu polaires et polaires) d'après le chromatogramme observé en CLHP UV-Visible (qui permet d'exclure le mélange acétone/eau 90/10 et 50/50) (figure 37) sont extraites.

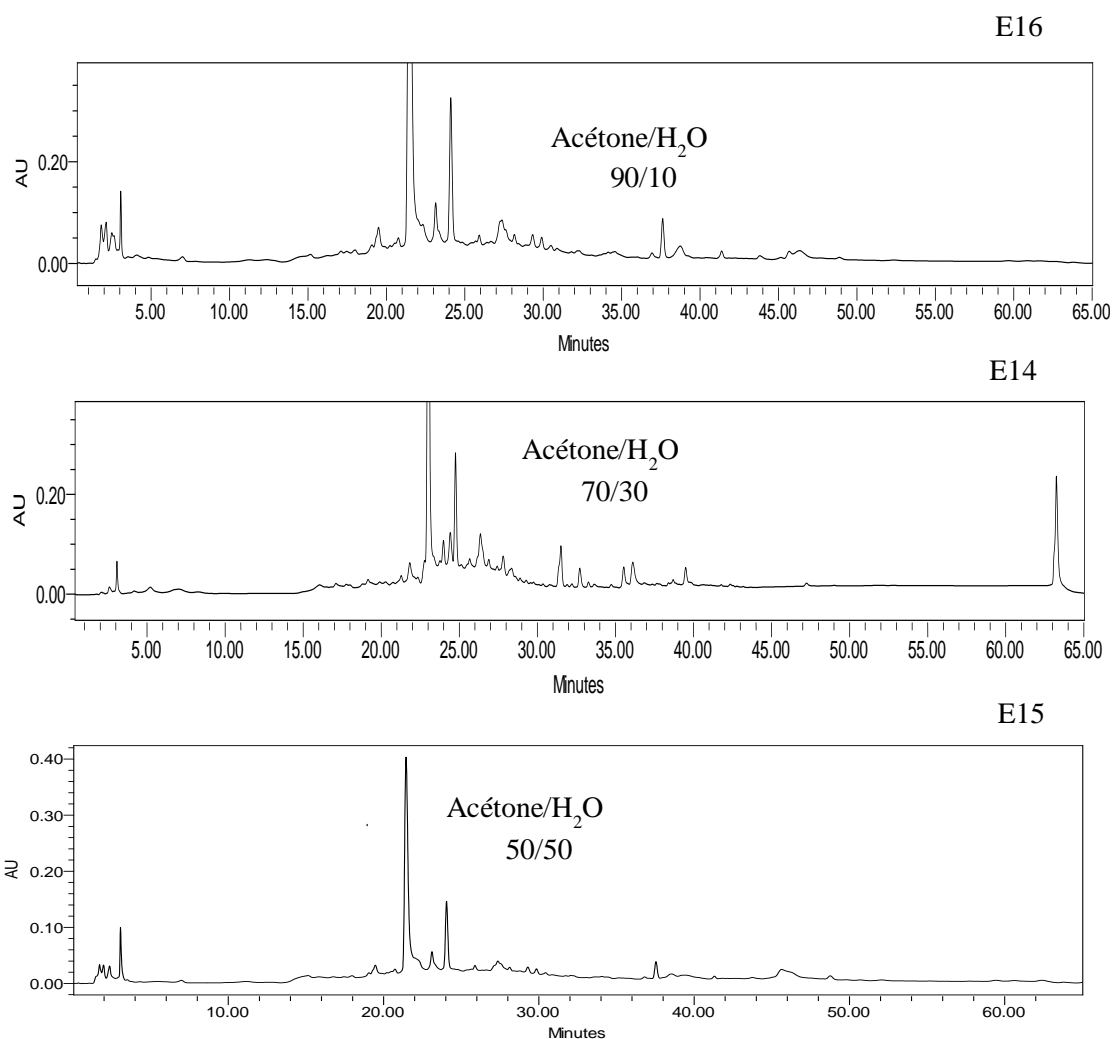


Figure 37 : Chromatogramme obtenus par CLHP UV-Visible des extraits E14, E15 et E16 (à 218 nm).

Au niveau des chromatogrammes (figure 37) un pic intense à 22 minutes correspondant au produit majoritaire est observé. Ce qui limite l'observation des autres composés.

II. Choix de la méthode d'extraction

L'extraction manuelle (par macération à froid) et l'extraction liquide sous pression réalisée avec l'extracteur ASE ont été comparées afin de déterminer la méthode la plus efficace pour extraire les métabolites présents dans le bois de Douglas. Un échantillon de poudre de la zone de transition a été prélevé pour réaliser les différentes extractions. Chaque extraction a été réalisée avec 5 g de poudre. Pour l'extraction manuelle 4x200 mL d'un mélange acétone/eau (70/30) a été utilisé comme éluant. Avec l'extracteur ASE, 22 mL du mélange acétone /eau (70/30) a servi d'éluant pour réaliser une extraction accélérée à une

température de 60°C et une pression de 10 bars. Les résultats ont montré que l'extracteur ASE est plus efficace car avec un volume de solvant environ 10 fois inférieur le pourcentage massique proche de celle de l'extraction manuelle. Le temps d'extraction, la température et la pression qui sont les paramètres qui favorisent l'extraction des métabolites en dénaturant et provoquant la rupture des parois végétales permettent d'expliquer l'efficacité de l'extraction avec l'ASE 150 (tableau 4). Les CCM réalisées à partir des deux extraits obtenus ont révélé que leurs profils métaboliques sont relativement similaires. Ainsi, les méthodes d'extractions utilisées n'ont pas d'influence sur la composition chimique des extraits obtenus.

Avec l'extracteur ASE, deux conditions d'extraction ont été comparées afin d'optimiser l'extraction des métabolites. La première méthode est une extraction réalisée à 100°C tandis que la deuxième méthode a été réalisée à 60°C. Les résultats ont montré que la première méthode est la plus efficace (tableau 4). Cela pourrait s'expliquer par l'élévation de la température qui favorise la rupture de la paroi végétale et la libération des métabolites. Les CCM réalisées sur les extraits provenant des deux méthodes d'extractions ont montré qu'ils avaient le même profil chromatographique. La variation de la température n'est donc pas un facteur qui influence la nature des profils métaboliques des extraits obtenus.

Tableau 4 : Résultats des extractions réalisées sur la zone de transition en utilisant l'extraction manuelle et l'extracteur ASE 150.

Mode d'extraction	V _{solvant} (mL)	(%)
T°A	4 x200	5,5
T° = 100°C ; P = 10 bars	22	5,8
T° = 60°C ; P = 10 bars	22	4,0

III. Extraction, fractionnement et isolement des composés majoritaires

III.1. Analyse des extraits

Les extraits obtenus (aubier, zones de transition et duramen) après avoir réalisé les différentes extractions sur un échantillon de bois ont été analysés en CLHP UV-Visible (figure 38). Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence des composés majoritaires dans chacun des extraits.

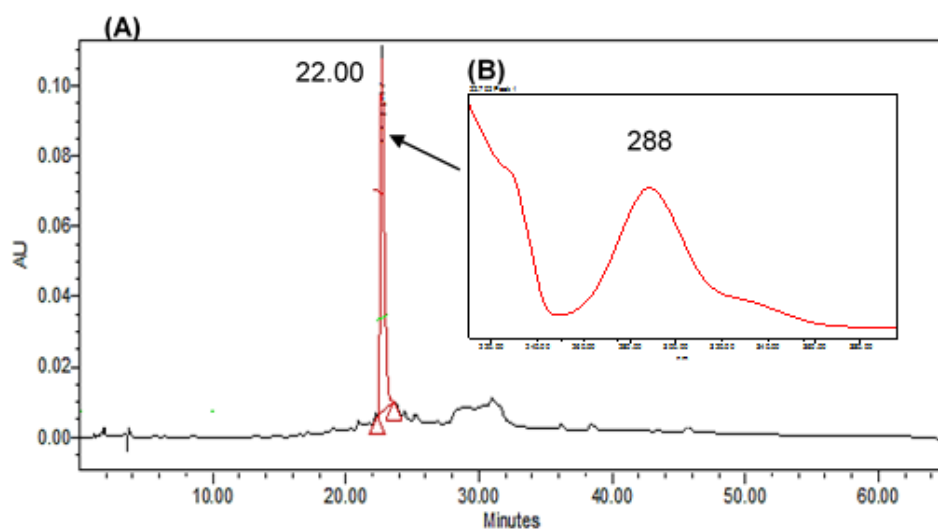


Figure 38 : Résultat de l'analyse en CLHP UV-Visible des extraits.

Les chromatogrammes (A) obtenu après l'analyse des trois extraits de bois par CLHP-PDA, (figure 37) présentent toujours un seul pic intense à 21,54 min dont le spectre UV-Visible (B) est caractéristique de la taxifoline ($\lambda_{\text{max}} = 288 \text{ nm}$). Cela permet de confirmer que la taxifoline est le métabolite majoritaire retrouvé dans l'aubier [5].

Les fractions et sous-fractions des extraits d'aubier et de duramen qui ont été sélectionnées pour l'analyse en LC-MS/MS ont été préalablement analysées en CLHP UV-Visible (figure 38). Cela a permis d'avoir une estimation de la nature des composés présents dans ces fractions ou sous-fractions.

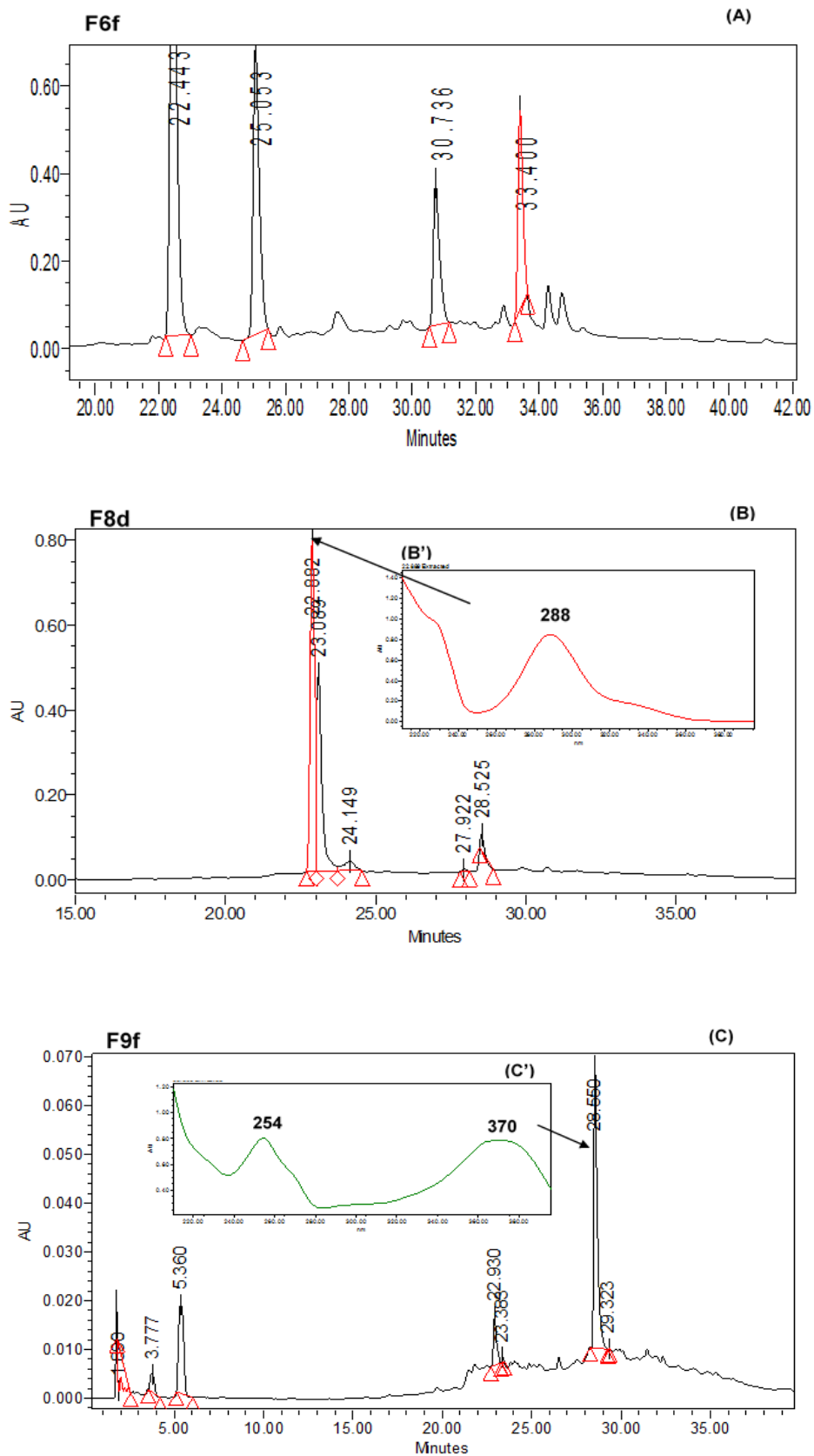


Figure 39 : Résultat de l'analyse en CLHP UV-Visible des sous-fractions F6f, F8d et F9f.



Les chromatogrammes obtenus après l'analyse des sous-fractions F6f, F8d et F9f de l'aubier par CLHP-PDA (figure 39), montrent plusieurs pics de différentes intensités. Les pics intenses correspondent aux composés majoritaires présents dans chaque sous-fractions. Le chromatogramme de la sous-fraction F6f montre 4 pics intenses correspondant à 4 composés majoritaires dont les temps de rétention sont 22,44 min, 25,05 min, 30,73 min et 33,44 min (A). Au niveau des chromatogrammes des sous-fractions F8d et F9f un pic intense et plusieurs pic minoritaires sont observés (B et C). Dans le chromatogramme de la sous-fraction F8d le pic intense à 22,88 min possède un spectre UV-visible (B') caractéristique de la taxifoline ($\lambda_{\text{max}} = 288 \text{ nm}$) tandis que dans la sous-fraction F9f, le pic intense à 22,88 min présente un spectre UV-visible (B') caractéristique de la quercétine ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ et 370 nm).

Les résultats de l'analyse par CLHP-PDA des fractions du duramen sont identiques à ce qui a été observé au niveau des extraits: un seul pic intense correspondant à la taxifoline apparait sur le chromatogramme.

III.2. Caractérisation des produits isolés.

III.2.1. Aubier

Le fractionnement de l'extrait d'aubier et la purification des fractions F7, F8 et F9 ont permis d'isoler deux produits qui ont été caractérisés par RMN 2D. Ce sont deux isomères de P1 et le produit P2 qui ont été identifiés comme étant respectivement la taxifoline et la quercétine.

Les différences entre les spectres de RMN¹H des deux diastéréoisomères (majoritaire et minoritaire) de la taxifoline (figure 40) se situent uniquement au niveau du nombre de signaux et des constantes de couplage (cf Partie II).

Le spectre RMN¹H de l'isomère majoritaire de la taxifoline dans le CD₃OD montre des protons du noyau aromatique B en position H-2' et H-5' qui résonnent sous la forme de deux doublets vers 6,96 ppm (H-2', $J = 1,6 \text{ Hz}$) et 6,74 ppm (H-5', $J = 8,2 \text{ Hz}$). Le proton H-6' résonne sous la forme d'un double doublet vers 6,83 ppm (H-6', $J = 1,6$ et $8,2 \text{ Hz}$). Les deux protons aromatiques du cycle A en α des groupes hydroxyles résonnent sous la forme de deux doublets vers 5,92 ppm (H-6, $J = 1,9 \text{ Hz}$) et 5,88 ppm (H-8, $J = 1,9 \text{ Hz}$). Les deux protons liés aux carbones sp³ du cycle C résonnent sous la forme de deux doublets vers 4,89 ppm (H-2, $J = 11,5 \text{ Hz}$) et 4,48 (H-3, $J = 11,5 \text{ Hz}$) caractéristiques des configurations des C₂ et C₃.

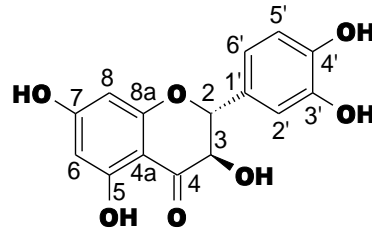


Figure 40 : Structure chimique de la taxifoline.

La taxifoline est un dihydroflavonol que l'on retrouve dans les trois différentes parties du bois de Douglas. D'après la littérature, C'est le métabolite secondaire le plus abondant dans le bois de Douglas [5].

Le spectre RMN ^1H de la quercétine (figure 41) dans le CD_3OD montre trois protons du noyau aromatique B en position H-2', H-5' et H-6' qui résonnent sous la forme de trois doublets vers 7,73 ppm (H-2', $J = 2,0$ Hz), 6,87 ppm (H-5', $J = 8,5$ Hz) et 7,62 ppm (H-6', $J = 2,0$ et 8,5 Hz). Les deux protons aromatiques du cycle A en α des groupes hydroxyles résonnent sous la forme de deux doublets vers 6,38 ppm (H-8 et H-6, $J = 2,0$ Hz).

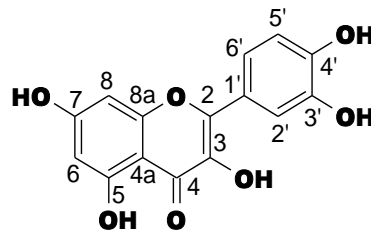


Figure 41 : Structure chimique de la quercétine.

La quercétine est un flavonol qui a été décrit dans le bois de Douglas sous forme glucoside [5].

III.2.2. Duramen

Au niveau du duramen, le fractionnement et la purification ont permis d'isoler également 2 produits au sein des fractions de l'éther d'éthyle et d'acétate d'éthyle. Les spectres RMN proton des produits P3 et P4 ont été effectués dans le CDCl_3 . Ces produits ont été identifiés comme étant l'acide dihydrotodomatique pour P3 et l'acide 4-p-tolylvalérique pour P4.

Le spectre de RMN ^1H de l'acide dihydrotodomatuique (figure 42) se compose de deux groupes de signaux ; les protons des carbones sp^2 du cyclohexane et ceux des carbones sp^3 aliphatiques.

Le proton du cyclohexane en α de la fonction carboxylique (H-1) résonne sous la forme d'un singulet élargi vers 2,66 ppm et correspond au proton le plus déblindé du cyclohexane dû à l'effet attracteur de la fonction carboxylique. Les quatre protons en β de la fonction carboxylique résonnent sous la forme d'un multiplet à 2,07 ppm (H-2 et H-6) ; il en est de même des quatre autres (H-3 et H-5) en position γ qui résonnent à 1,51 ppm. Enfin le proton le plus blindé (H-4) du cyclohexane résonne sous la forme d'un multiplet à 1,22 ppm ; l'effet attracteur de la fonction carboxylique s'en trouve réduit du fait de l'éloignement.

En ce qui concerne la chaîne aliphatique nous avons tout d'abord les quatre protons en α de part et d'autre du carbonyle résonnant pour certains sous la forme d'un multiplet vers 2,07 ppm (H-2') et d'autre sous la forme d'un doublet à 2,25 ppm (H-4', $J = 2,0$ Hz). Ensuite, on retrouve les deux protons en β du carbonyle qui résonnent sous la forme de deux multiplets vers 1,90 ppm (H-1') et 2,07 ppm (H-5'). Et pour terminer les deux familles de CH_3 qui résonnent sous la forme de trois doublets vers 0,82 ppm ($\text{CH}_3\text{-1}'$, $J = 6,8$ Hz), 0,91 ppm ($\text{CH}_3\text{-5}'$, $J = 2,8$ Hz) et 0,89 ppm ($\text{CH}_3\text{-5}'$, $J = 2,8$ Hz).

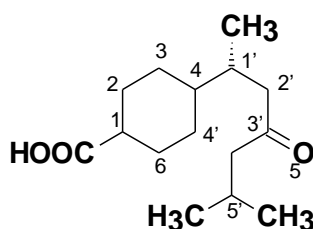


Figure 42 : Structure chimique de l'acide dihydrotodomatuique.

Le spectre RMN ^1H de l'acide 4-p-tolylvalérique (figure 43) présente également deux groupes de signaux ; les protons aromatiques et ceux de la chaîne aliphatique. Ainsi, les protons portés par le noyau aromatique résonnent sous la forme de multiplets vers 7,05 ppm (H-2, H-3, H-5 et H-6). Les protons du groupe méthyle directement lié au noyau aromatique en C-4 et légèrement déblindé, résonne sous la forme de singulet vers 2,29 ppm. Pour les protons de la chaîne aliphatique, on retrouve les deux protons en α de la fonction carboxylique qui résonnent sous la forme d'un double doublet à 2,09 ppm (H-9, $J = 12,1$ Hz, 5,9 Hz et 1,5 Hz). Les deux protons en β de la fonction carboxylique (H-8) résonnent sous la forme d'un multiplet vers 1,81 ppm et le proton (H-7) légèrement déblindé par l'effet inductif

attracteur du noyau aryle, résonne sous la forme d'un multiplet vers 2,67 ppm. Enfin le groupement méthyle de la chaîne aliphatique résonne sous forme de doublet très blindé vers 1,23 ppm ($\text{CH}_3\text{-7}$, $J = 6,9$ Hz).

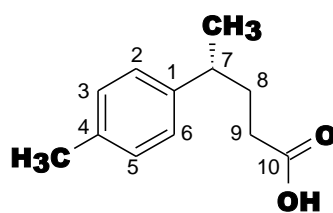


Figure 43 : Structure chimique de l'acide 4-p-tolylvalérique.

L'acide 4-p-tolylvalérique a été décrit de bois de Douglas [113] et l'huile de bois de Santal [112].

Sachant que la zone de transition se situe à l'intermédiaire entre l'aubier et le duramen, avant de procéder à l'analyse en LC-MS/MS de l'extrait, il n'avait pas été jugé nécessaire de réaliser un fractionnement sur cette zone car on estimait qu'elle était susceptible de contenir majoritairement des composés retrouvés à la fois dans l'aubier et le duramen.

IV. Identification des composés par LC-MS/MS.

L'analyse de chaque extrait ou fraction a abouti à l'obtention de plusieurs spectres MS/MS. Ces composés sont majoritaires dans l'extrait ou la fraction étudiée. Pour identifier la structure chimique de chaque composé, des bases de données de métabolites en ligne (Massbank, ChEBI, Metlin, ...) ont été utilisées dans un premiers temps pour rechercher la structure chimique de la molécule en utilisant la valeur m/z de l'ion pseudomoléculaire, le poids moléculaire mais également à l'aide des formule brute correspondant à des composés connus générés lors de l'analyse des fractions de l'aubier en spectrométrie de masse à haute résolution au sein de la plateforme HRMS de l'Université de Orléans. Ensuite, il a fallu expliquer les différentes fragmentations qui peuvent être observées au niveau de la structure chimique de la molécule en se référant sur celles qui peuvent s'appliquer chez les principaux groupes de métabolites présents dans le bois de Douglas (flavonoïdes, terpènes et lignanes) (cf partie I).

Les valeurs des rapports m/z des ions fragments obtenus ont été corrélées à celles qui sont présentes sur le spectre MS/MS du composé pour confirmer son identité.

Les premières analyses (sous-fractions de l'aubier) ont été effectuées avec une durée de 20 min et l'énergie de collision de 25 eV a été utilisée pour une gamme de m/z comprise entre 100 et 600 Da.

Les conditions d'analyse ont été optimisées en utilisant une énergie de collision de 40 eV, une durée de 45 min et une gamme de m/z comprise entre 50 et 1000 Da. Elles ont été ensuite utilisées pour les extraits et fractions.

IV.1. Aubier

IV.1.1. Extrait

L'exploitation des spectres MS/MS issus de l'analyse de l'extrait d'aubier (figure 44) a permis de détecter 21 composés. Sur le TIC obtenu, le composé qui s'ionise le mieux dans ces conditions est observé à 12,47 min.

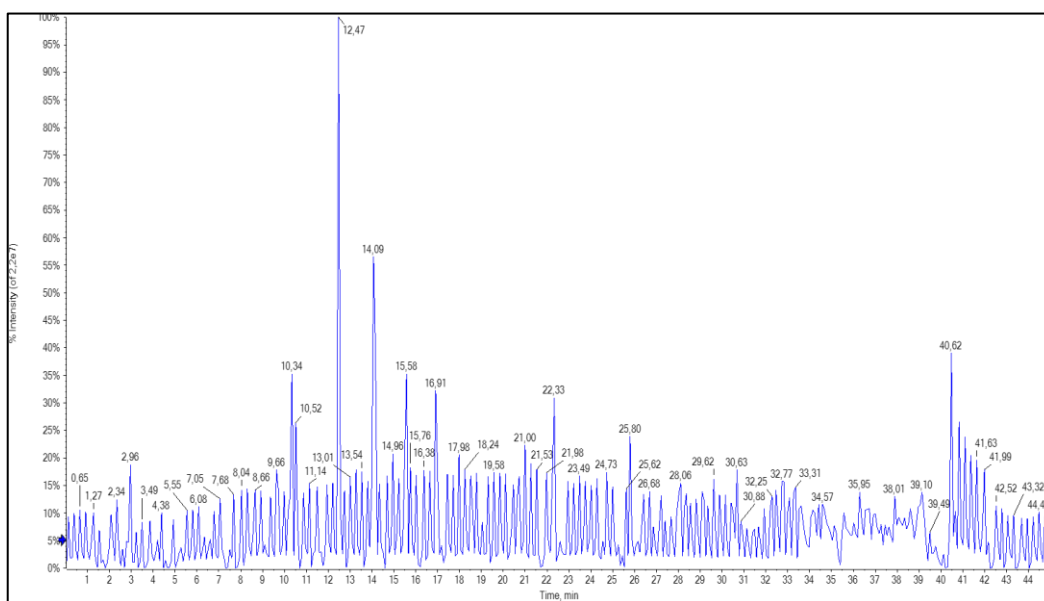


Figure 44 : Représentation du TIC de l'extrait d'aubier en mode négatif

IV.1.1.1. Flavonoïdes

Des flavonoïdes aglycones (non glycosylés) et des flavonoïde-*O*-glycosylés ont été identifiés au niveau de l'extrait d'aubier.

✓ Flavonoïdes aglycones

D'une manière générale, l'analyse des différents spectres de masse correspondant aux flavonoïdes aglycones montre que les fragmentations les plus répandues sont celles qui se produisent au niveau du cycle C de la molécule [119] [120] (les cycles A et B sont les deux autres cycles présents dans la structure de la molécule). Ces fragmentations entraînent la rupture entre deux liaisons carbone-carbone (C-C) du cycle C qui va engendrer des ions fragments de type $^{x,y}A^-$ et $^{x,y}B^-$. Les lettres x et y correspondent aux numéros des liaisons du cycle C qui ont été rompues (figure 45) [120].

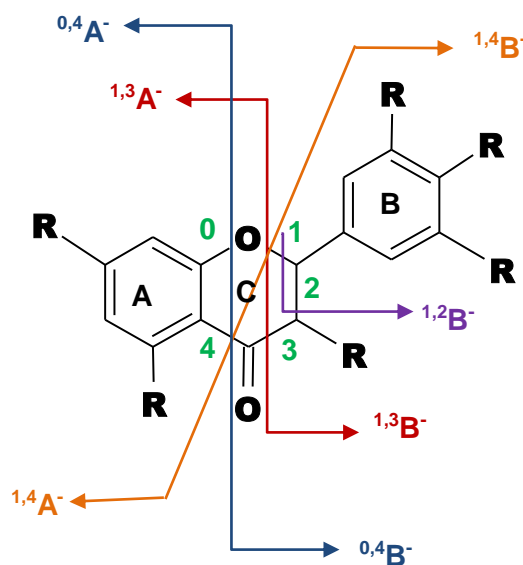


Figure 45 : Structure générale d'un flavonoïde.

Des fragmentations de type Rétro Diels-Alder (RDA) peuvent avoir lieu au niveau des cycles à 6 carbones présentant au moins une double liaison. C'est le cas par exemple des fragmentations apparaissant sur le cycle C. Il existe également des fragmentations correspondant à des ruptures du cycle C associées à des pertes de molécules neutres [120] telles que H_2O , CO , CO_2 et C_2H_2O qui entraînent la formation d'ions dont la nomenclature est de type $[^{x,y}A\text{-groupe neutre}]^-$ ou $[^{x,y}B\text{-groupe neutre}]^-$ tel que l'ion $[^{1,3}A\text{-CO}_2]^-$. On note également la présence d'autres pertes de molécules neutres affectant cette fois-ci l'ion pseudomoléculaire ($[M-H]^-$ sans qu'il y ait une rupture du cycle C par des RDA). Généralement, ce sont les ions $[M-H-CH_3]^\bullet$, $[M-H-H_2O]^-$, $[M-H-CO]^-$, $[M-H-CO_2]^-$ ou l'ion formé par la perte du cycle B $[M-H\text{-cycle B}]^-$ qui sont générés par ce type de fragmentation (figure 45).

Cependant, il existe des fragmentations qui sont couramment observées au niveau des structures particulières de ces flavonoïdes identifiés. C'est le cas par exemple de la RDA

entraînant la rupture des liaisons 1 et 2 du cycle C que l'on a observé avec les flavonoïdes possédant deux substituants hydroxyles sur le noyau B [121]. Les ions générés par cette fragmentation sont les suivants : $[^{1,2}A-CO]^-$, $[^{1,2}A-CO-CO_2]^-$, $^{1,2}B^-$ et $^{1,2}A^-$.

✓ *Dihydroflavonols*

Les fragmentations qui ont permis d'identifier le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 303 à 14,07 min sont décrits dans les figures 46 puis 47. Ce composé a été identifié comme étant la taxifoline (P1) ou dihydroquercétine [5]. Au niveau du spectre MS/MS les ions fragments les plus intenses sont ceux qui présentent les rapport m/z 285 ($[M-H-H_2O]^-$) et m/z 125 ($^{1,4}A^-$). La perte d'eau est largement favorisée et entraîne la formation d'un ion $[M-H-H_2O]^-$ plus intense que l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ et l'apparition d'une double liaison entre les carbones 3 et 2. L'ion $^{1,4}A^-$ de rapport m/z 125 provient de la rupture des liaisons 1 et 4 du cycle C et entraîne la perte du B. Il est généralement observé dans les spectre MS/MS des flavonoïdes substitués par des groupes hydroxyles sur le cycle A au niveau des carbones 7 et 5 [122]. D'autres ions fragments intenses couramment observés chez les dihydroflavonols sont présents dans le spectre MS/MS. Il s'agit des ions à m/z 175 $[M-H-H_2O-cycle\ B]^-$ formé par la perte d'une molécule d'eau et du cycle B ; m/z 241 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ généré par la départ de H_2O et une décarboxylation au niveau du cycle C. Les ions minoritaires à m/z 275 et 259 sont produits par perte de CO et CO_2 à partir de l'ion m/z 303. L'ion à m/z 217 $[M-H-H_2O-C_3O_2]^-$ correspond à la perte de C_3O_2 à partir du cycle A. La perte successive de C_2H_2O suivie de CO_2 à partir du pic de base 285 génère l'ion à m/z 199. Les ions à m/z 153 $[^{1,3}A]^-$, 151 $[^{1,3}A]^-$ formé par la rupture des liaisons 1 et 3 du cycle C et entraînant la perte du cycle B et 109 $[^{0,4}B]^-$ sont aussi observés. La taxifoline présente 4 stéréoisomères avec 2 paires d'énantiomères ($2R,3R$) et ($2S,3S$) qui sont *trans* ainsi que ($2R,3S$) et ($2S,3R$) qui sont *cis* [123]. Au niveau de l'extrait d'aubier, deux isomères présentant des spectres MS/MS avec des fragments identiques ont été identifiés à deux temps de rétention différents ($t_R = 14,07$ min, 14,16 min).



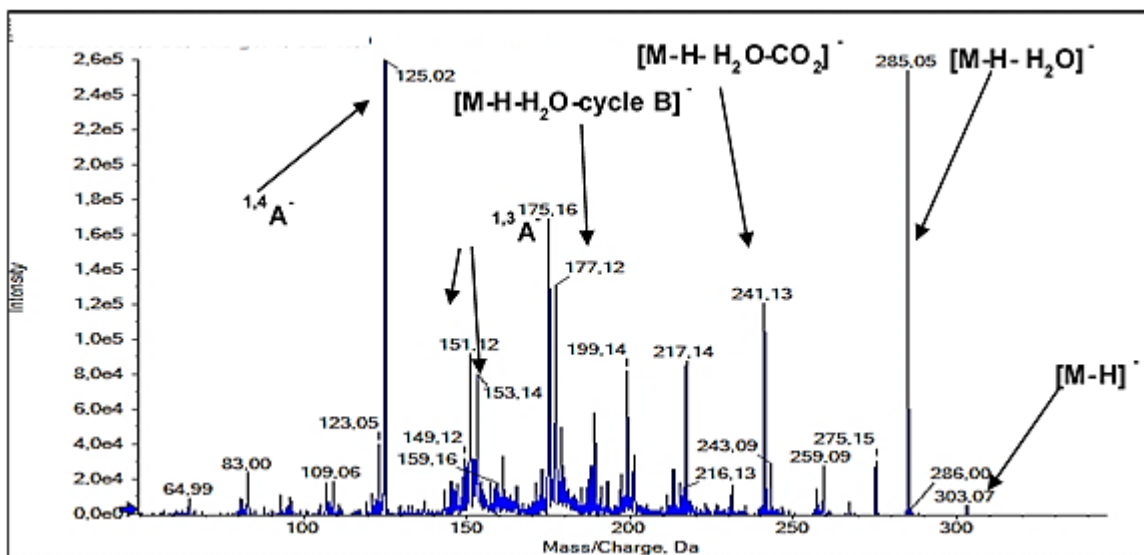


Figure 46 : Spectre MS/MS de la taxifoline.

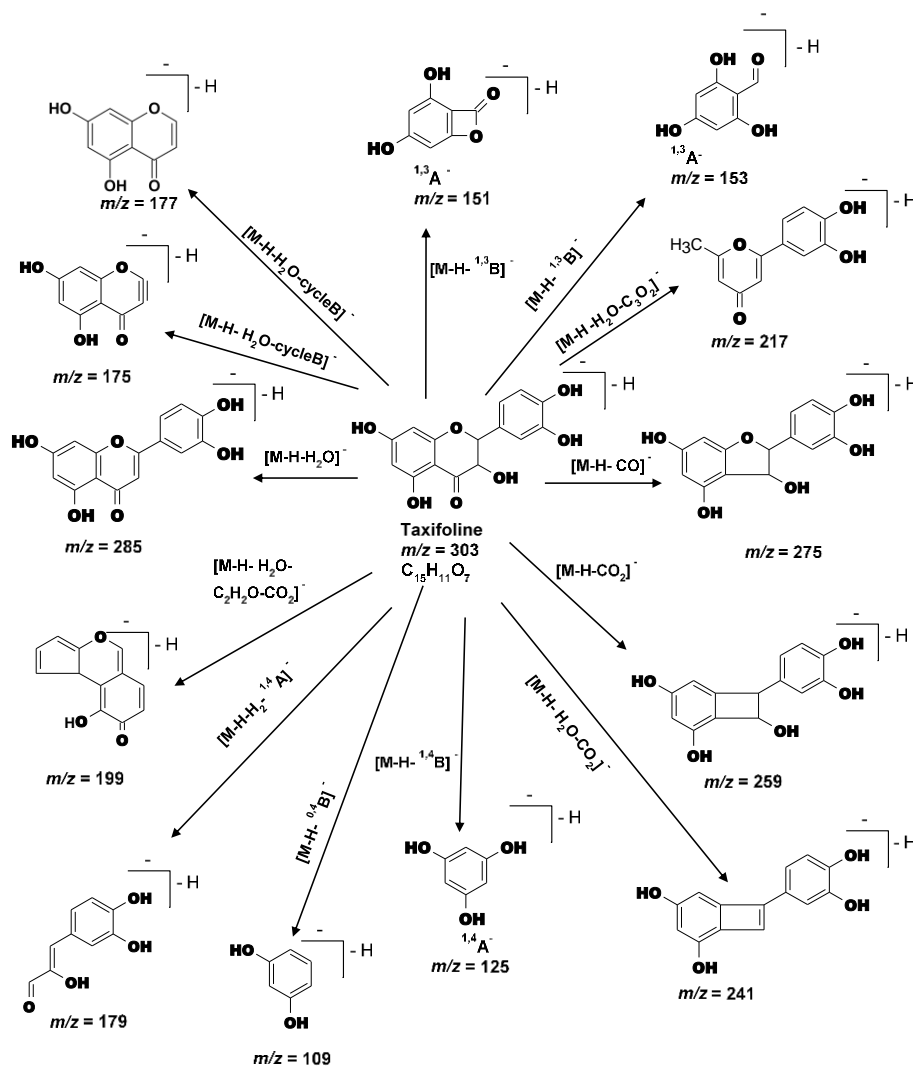


Figure 47 : Fragmentations de la taxifoline.

Le composé présentant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 287 à 15,58 min correspond au dihydrokaempférol (P5) [124] (figures 48 et 49). Au niveau du spectre MS/MS, l'ion fragment le plus intense à m/z 259 $[M-H-CO]^-$ correspond à la perte de CO. Contrairement à la taxifoline, cette fragmentation est favorisée par rapport à la perte de la molécule d'eau qui entraîne la formation l'ion peu intense $[M-H-H_2O]^-$ à m/z 269). Cependant, l'ion $[^{1,4}A]^-$ de rapport m/z 125 est moins intense au niveau dihydrokaempférol. Comme dans le spectre MS/MS de la taxifoline, l'ion pseudomoléculaire n'est pas intense. Ce composé a été décrit dans le duramen du bois de Douglas [5].

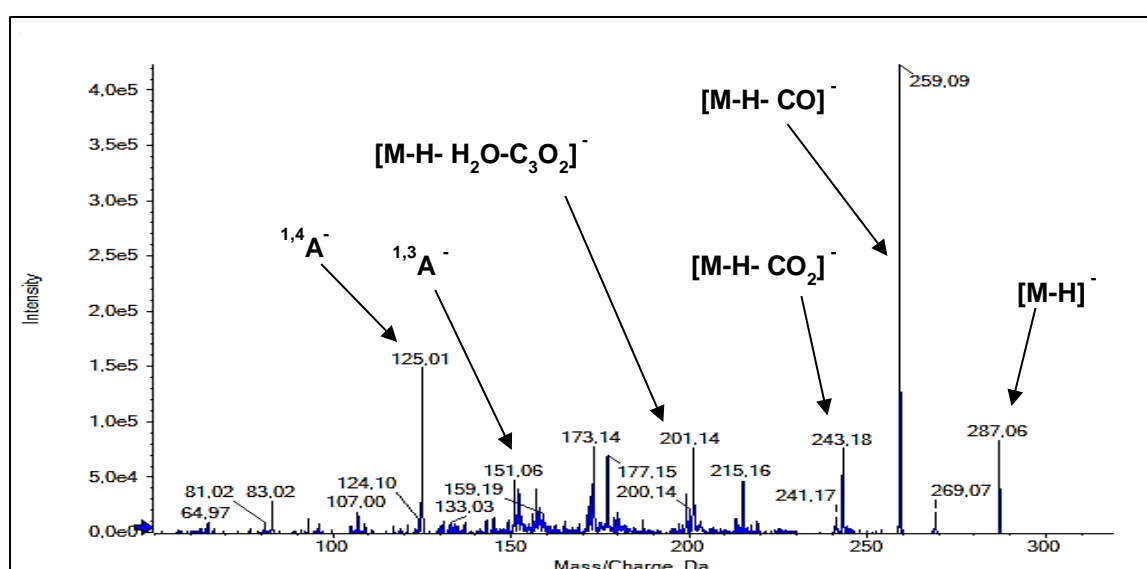


Figure 48 : Spectre MS/MS du dihydrokaempferol.

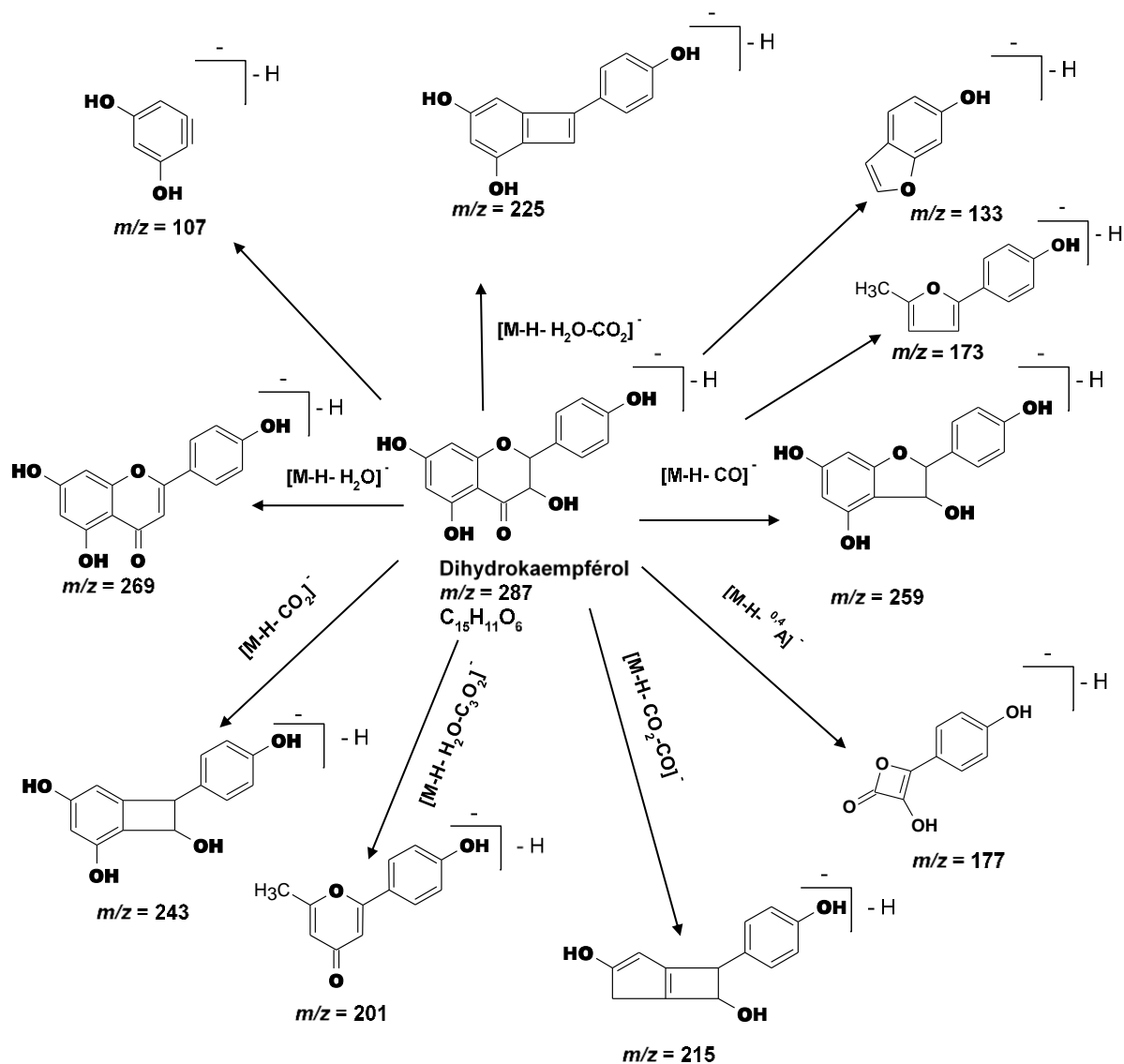


Figure 49 : Fragmentations du dihydrokaempferol.

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire à m/z 271 à 18,60 min correspond à la pinobanksine (P6) [124] (figures 50 et 51). Contrairement à la taxifoline et au dihydrokaempférol, l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ (m/z 271) observé sur le spectre MS/MS est intense. Le pic de base est à m/z 151 $^{[1,3]A}^-$ et deux ions intenses sont observés à m/z 119 $^{[1,3]B}^-$ et m/z 177 $[M-H-H_2O-cycle B]^-$. L'ion est aussi intense et se forme par la perte du cycle B et d'une molécule d'eau au niveau du cycle C.

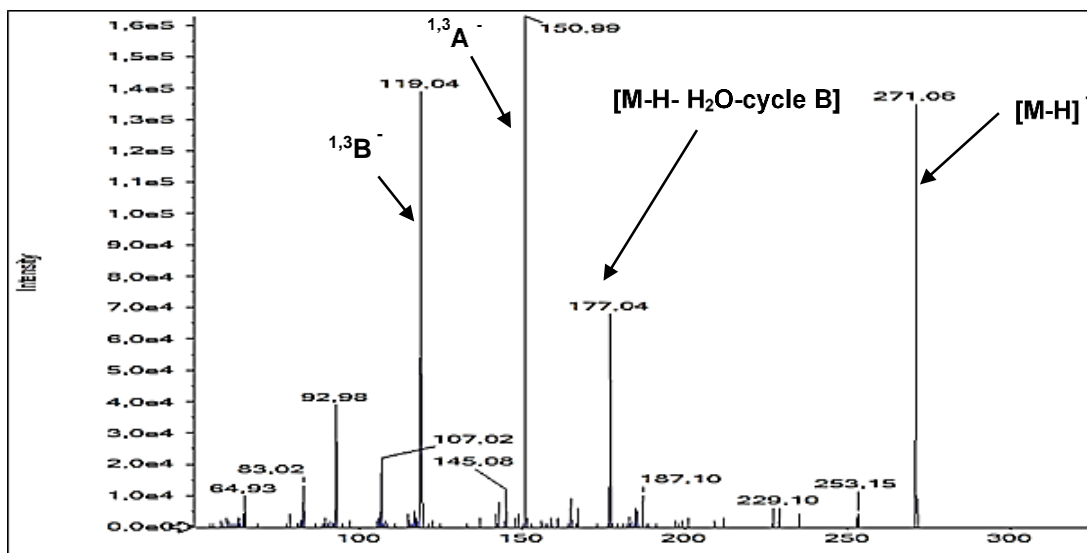


Figure 50 : Spectre MS/MS de la pinobanksine.

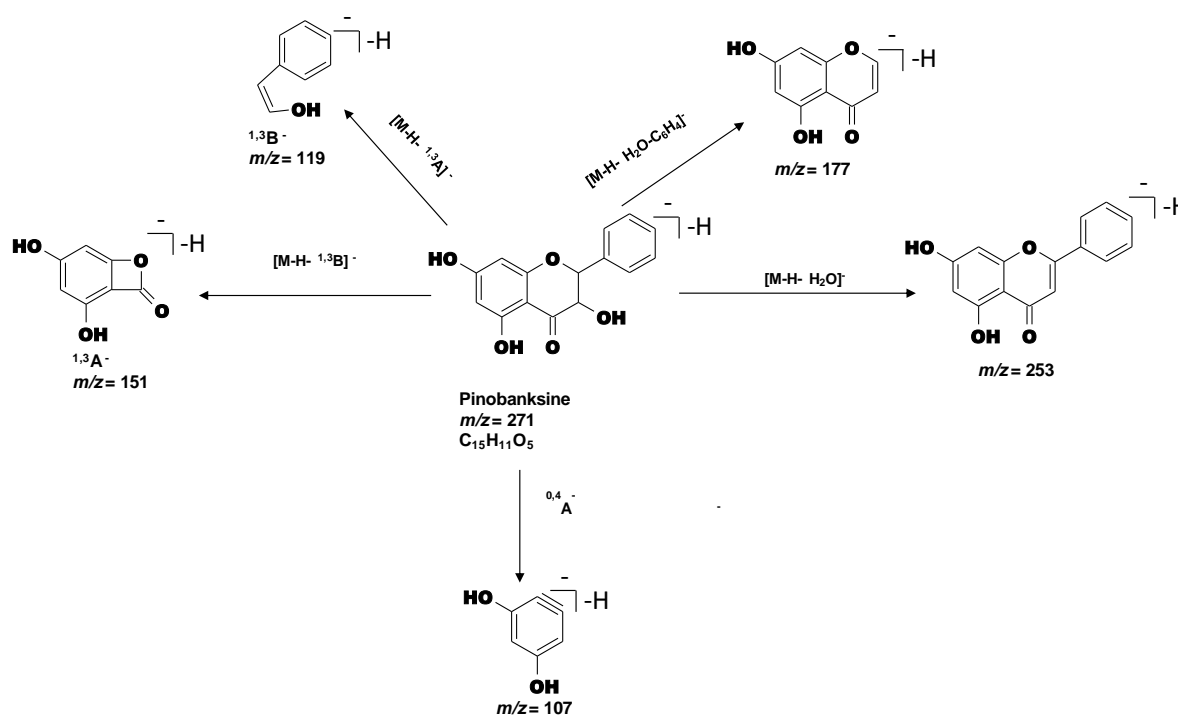


Figure 51 : Fragmentations de la pinobanksine.

✓ Flavonols

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire intense $[M-H]^-$ possède un rapport m/z 285 à 13,98 min correspond au kaempferol (P7) [120] (figures 52 et 53). En dehors de l'ion pseudomoléculaire, le pic de base à m/z 175 $[M-H-cycle B-H_2O]^-$ et les ions intenses à m/z

241 $[M-H-CO_2]^-$, m/z 217 $[M-H-C_3O_2]^-$ sont générés respectivement par les pertes de CO_2 au niveau du cycle C et de C_3O_2 à partir du cycle A caractéristiques des flavonols [120], sont observés sur le spectre MS/MS. L'ion à m/z 201 $[M-H-CO-C_2H_2O_2]^-$ est généré par la perte de $C_2H_2O_2$ suivi d'un réarrangement associé à une perte de CO au niveau du cycle A. L'ion à m/z 199 $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$ est produit par la perte de C_2H_2O (m/z à 243) suivi d'un réarrangement associé à une perte de CO_2 au niveau du cycle C. Ce composé a été décrit dans plusieurs organes du sapin Douglas (bois, aiguilles, écorce,...) [85].

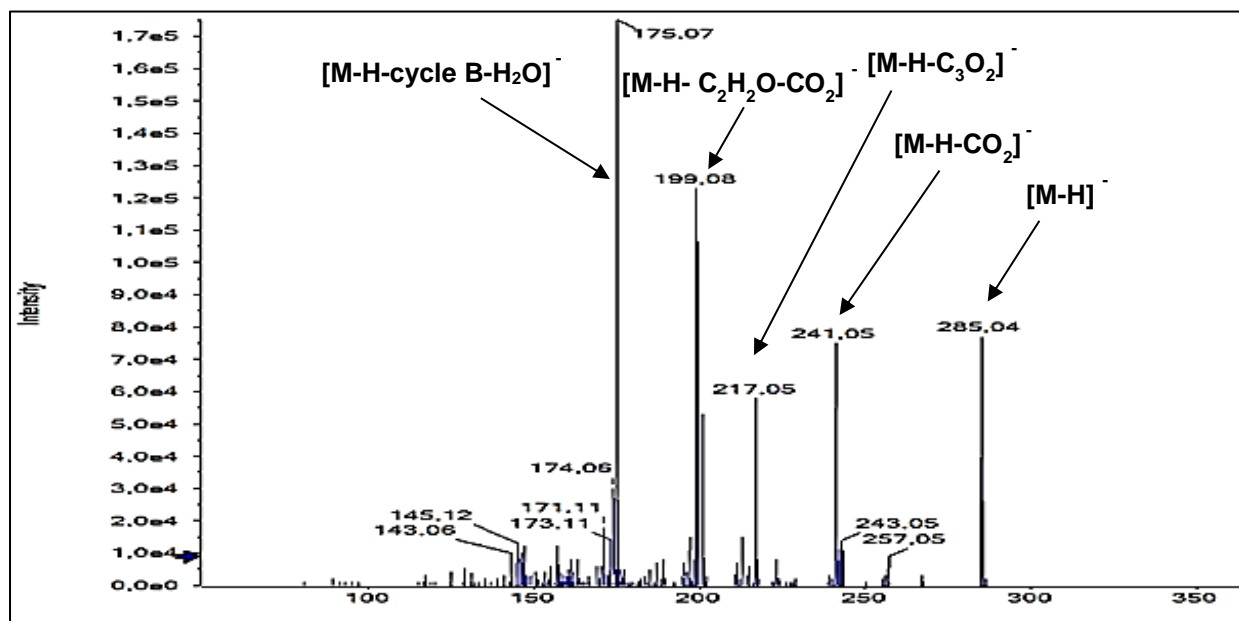


Figure 52 : Spectre MS/MS du kaempférol.

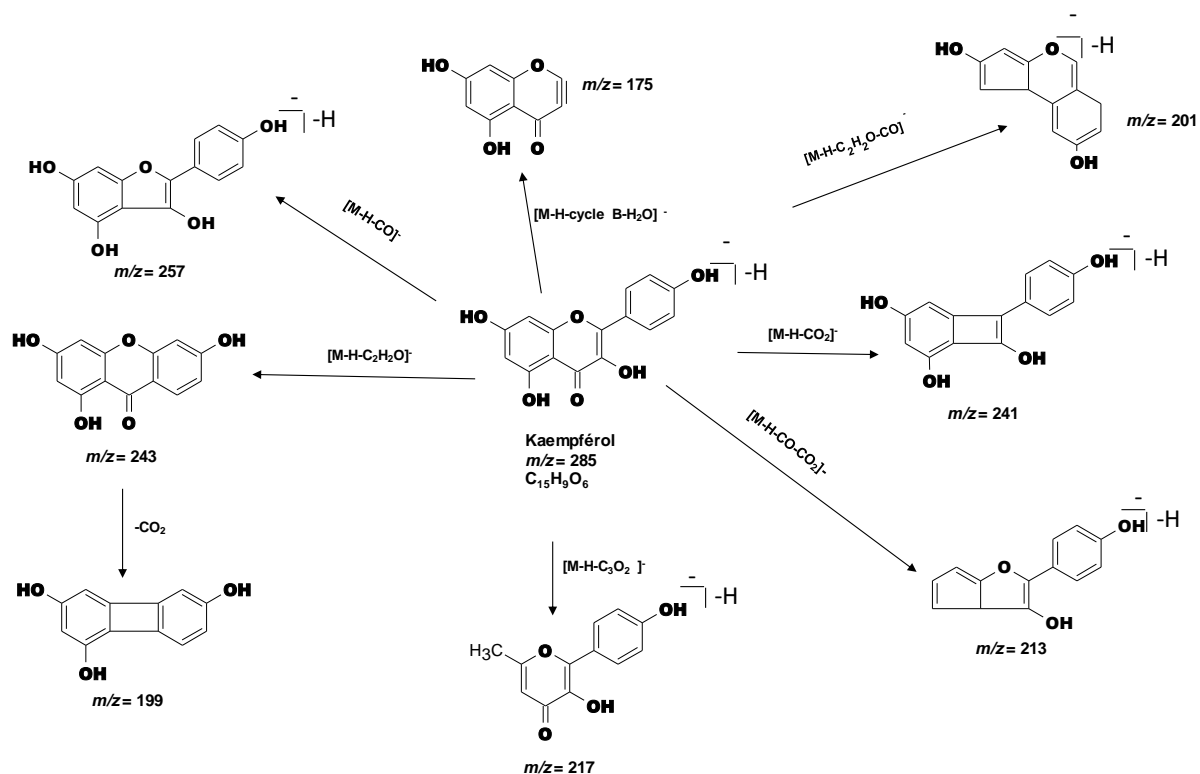


Figure 53 : Fragmentations du kaempferol.

Au niveau de l'extrait d'aubier, un flavanone a été identifié. Il s'agit de la pinocembrine (P8) [125] qui correspond au composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 255 à 22,33 min (figures 54 et 55). Dans le spectre MS/MS, le pic de base est l'ion à m/z 255 $[M-H]^-$. Des pertes moléculaires neutres qui peuvent se produire au niveau des cycles A (perte C_2H_2O) et C (perte de CO) ont permis de former les ions à m/z 185 $[M-H-CO-C_2H_2O]^-$ et m/z 213 $[M-H-C_2H_2O]^-$. Parmi les ions peu intenses observés, on note la présence de l'ion à m/z 151 $[^{1,3}A]^-$ produit par les flavonoïdes qui possèdent des groupes hydroxyles sur le cycle A au niveau des carbones 5 et 7 [122]. L'ion à m/z 107 $[^{0,2}B]^-$ est généré par la rupture des liaisons 0 et 2 du cycle C entraînant la perte du cycle A. La pinocembrine a été décrit dans le duramen du bois Douglas [5].

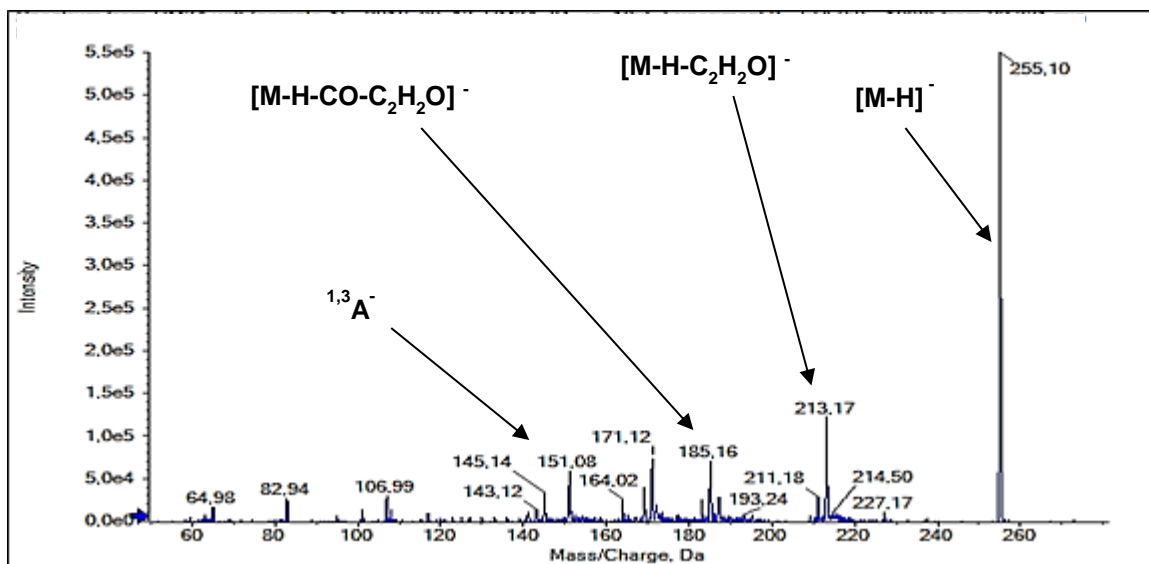


Figure 54 : Spectre MS/MS de la pinocembrine.

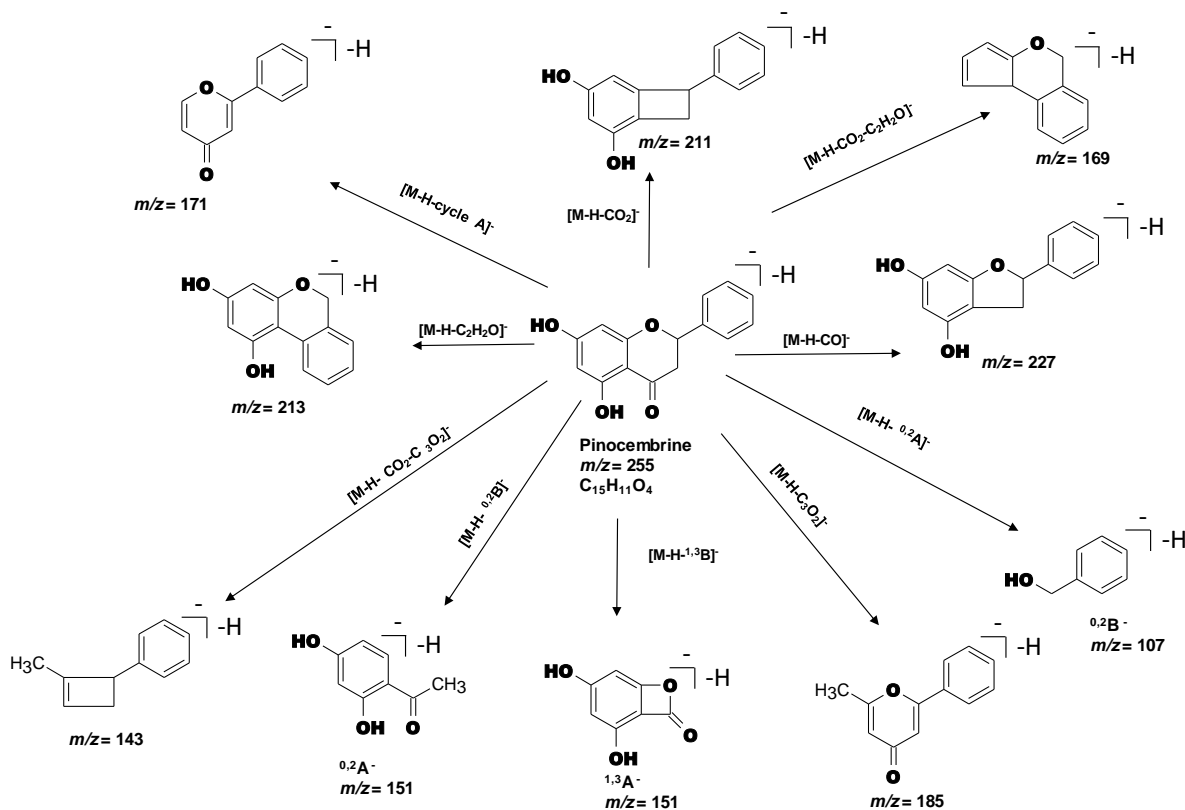
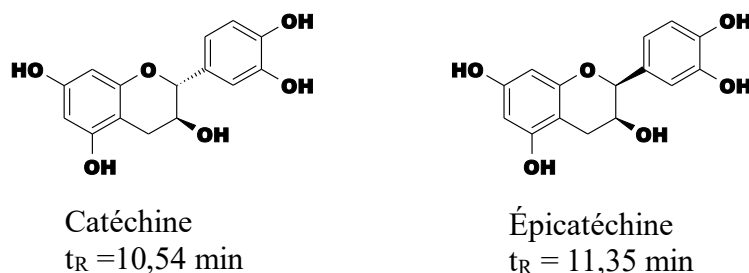


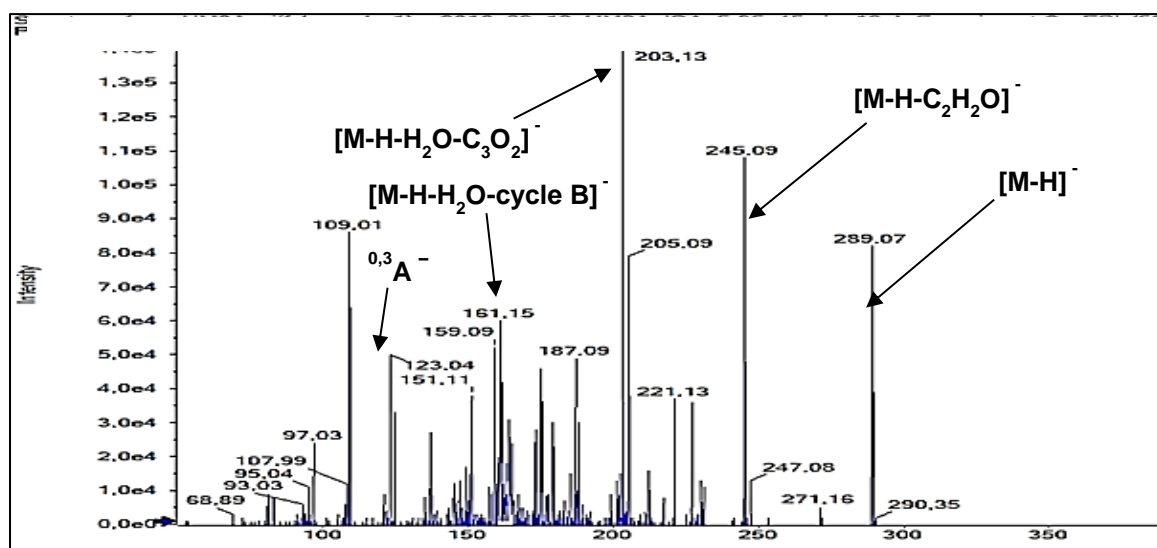
Figure 55 : Fragmentations de la pinocembrine

✓ *Flavan-3-ols*

Les composés dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport $m/z = 289$ ont été identifiés comme étant la catéchine (P9) à 10,54 min et l'épicatéchine (P10) à 11,35 min [126] (figures 56 et 57). Ils ont été différenciés par leur temps de rétention par rapport aux standards utilisés. Ces deux composés sont des isomères dont les ions intenses observés sur les spectres MS/MS sont à m/z 289 $[M-H]^-$, m/z 245 $[M-H-C_2H_2O]^-$, m/z 203 $[M-H-H_2O-C_3O_2]^-$, m/z 161 $[M-H-H_2O-cycle B]^-$, m/z 123 $[^{0,3}A^-]$ et m/z 109 $[M-H-cycle A-cycle C]^-$. L'ion fragment à m/z 203 $[M-H-H_2O-C_3O_2]^-$ est formé par les pertes combinées de H_2O au niveau de cycle C et de C_3O_2 au niveau du cycle A. L'ion à m/z 245 $[M-H-C_2H_2O]^-$ est formé par une rupture des liaisons 2 et 4 qui entraîne la perte de C_2H_2O suivi d'un réarrangement. L'ion à m/z 221 $[M-H-C_3O_2]^-$ est formé par la perte de C_3O_2 . La perte du cycle A entraîne la formation de l'ion à m/z 205 $[M-H-C_4H_8O_2]^-$. Ces deux composés ont été décrits dans l'écorce du sapin de Douglas [127].



(A)



(B)

Figure 56 : Structures chimiques (A) et spectre MS/MS (B) de la catéchine ou de l'épicatéchine

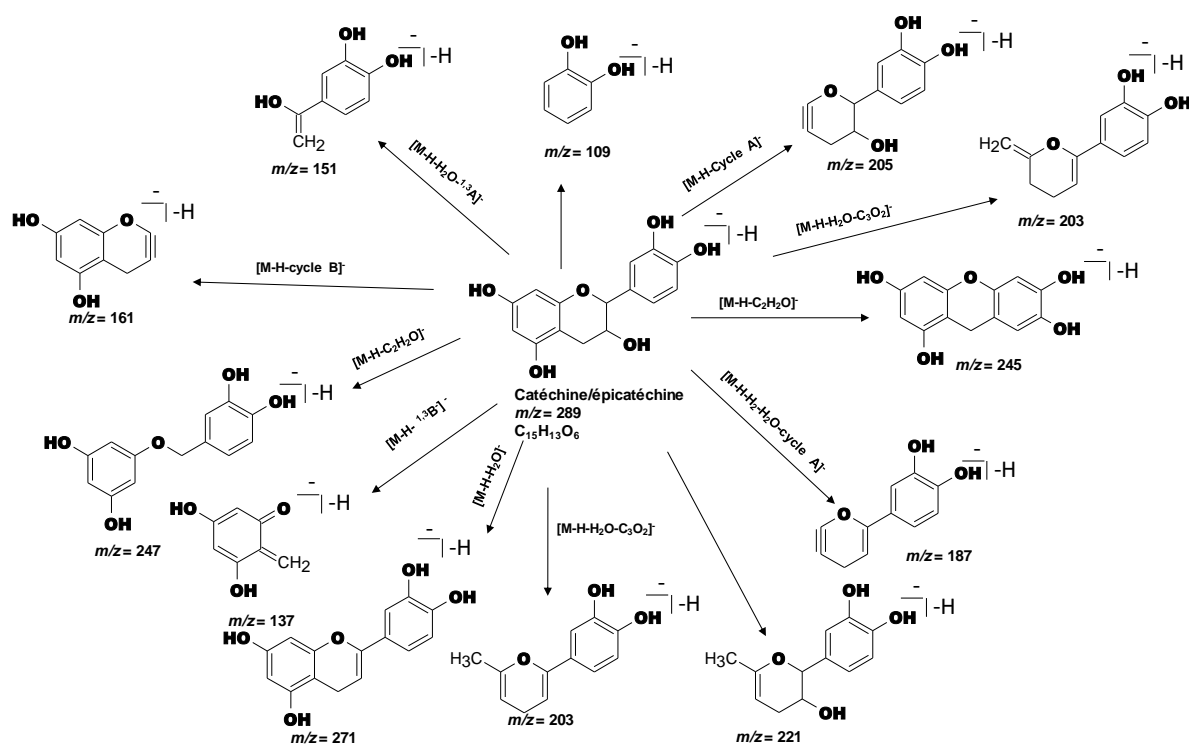


Figure 57 : Fragmentations de la catéchine et l'épicatéchine

✓ Tanins condensés

Le composé possédant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ de rapport $m/z = 577$ à 9,63 min a été identifié comme étant la procyanidine B1 (P11) ou B2 (P11) (figures 58 et 59). Il peut ainsi être un dimère d'épicatéchine et de catéchine (procyanidine B1) ou deux unités d'épicatéchine (procyanidine B2) (figure 58) [128]. Sur le spectre MS/MS, le pic de base à m/z 407 est généré par RDA suivie d'une perte d'eau et les ions intenses sont observés à m/z 425 [$^{1,3}A$] et m/z 289 par clivage aromatique (figure 58). L'ion fragment à m/z 451 [$M-H-^{1,4}A$] est produit par clivage hétérocyclique ou HRF (Heterocyclic Ring Fission) et perte de $^{1,4}A^-$ [129]. Les fragments caractéristiques du monomère sont aussi observés.

L'ion $^{1,4}A^-$ (m/z 125) qui a été expliqué précédemment (cf dihydroflavonols) est également présent.

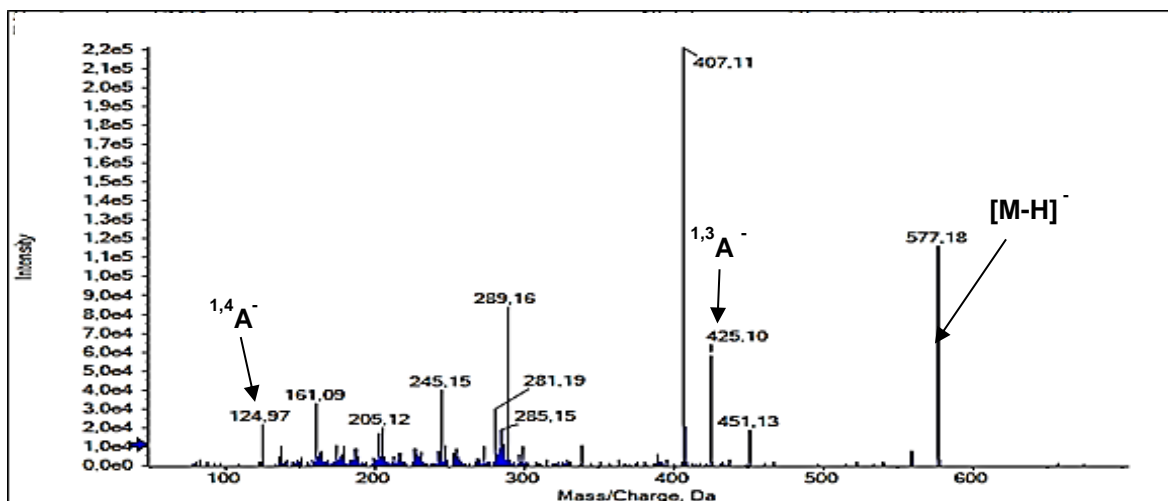


Figure 58 : Spectre MS/MS de la procyanidine B1 ou B2.

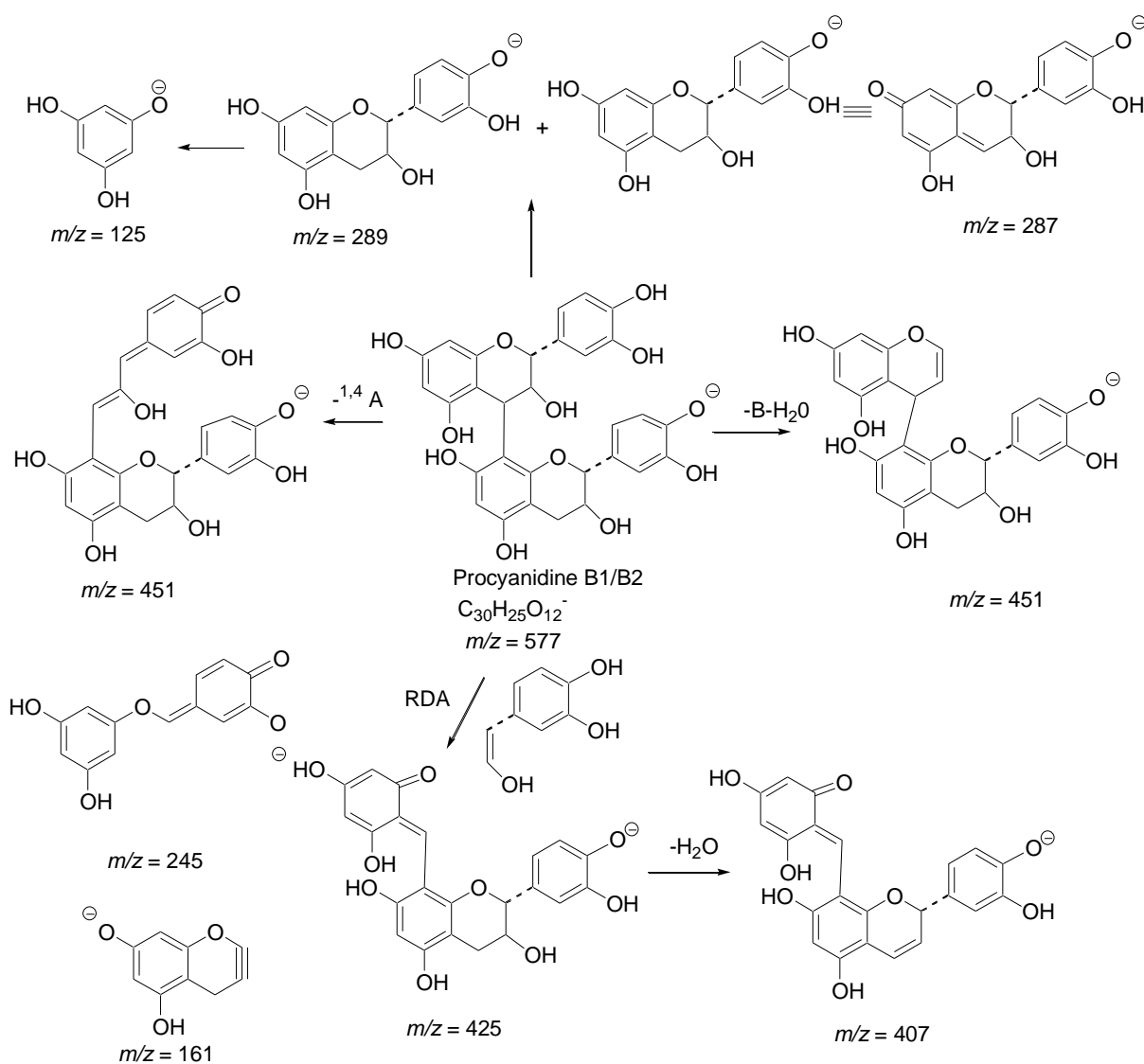


Figure 59 : Fragmentations de la procyanidine B1 ou B2.

Une autre procyanidine a été identifiée dans l'extrait d'aubier. Il s'agit de la procyanidine C4 (P12) [130] dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z de 865 à 11,62 min (figure 60). Ce composé pourrait correspondre à un trimère constitué de deux molécules de catéchines et d'une molécule d'épicatéchine (figure 61). En dehors de $[M-H]^-$ qui est l'ion le pic de base, on observe d'autres ions intenses à m/z 695, 525, 407, 287 et 243. La perte d'une unité monomérique par clivage (QM, quinone methide) [131] fournit la quinone à m/z 287 et le dimère à m/z 577. Le fragment ion à m/z 739 $[M-H-^{1,4}A]^-$ est produit par clivage hétérocyclique (HRF) et perte de $^{1,4}A$.

On note également la présence d'ions peu intenses résultant de la fragmentation de monomère et dimère.

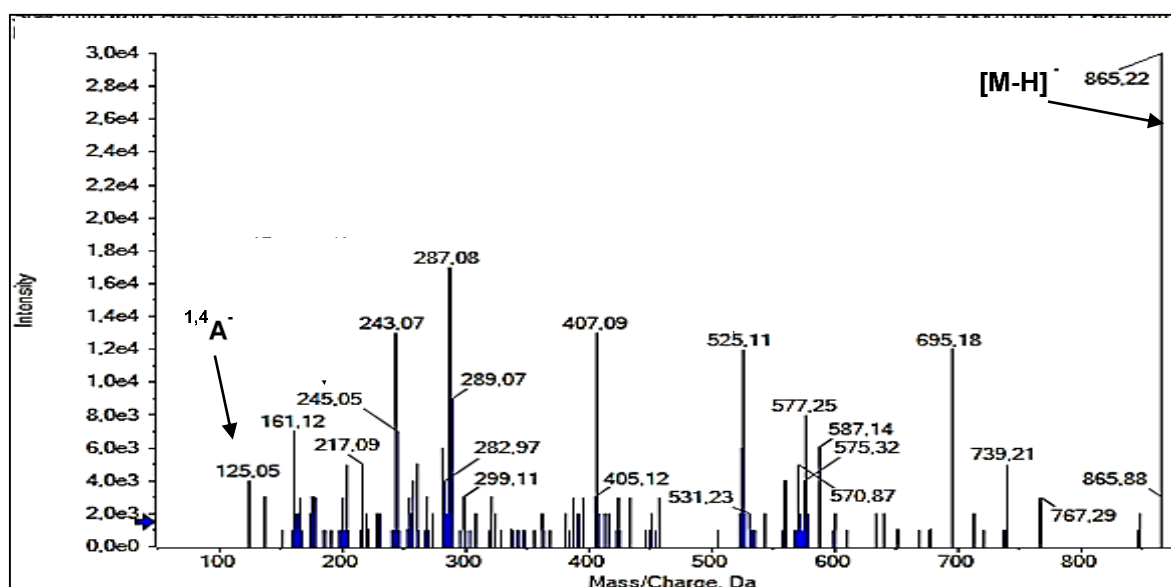


Figure 60 : Spectre MS/MS de la procyanidine C4.

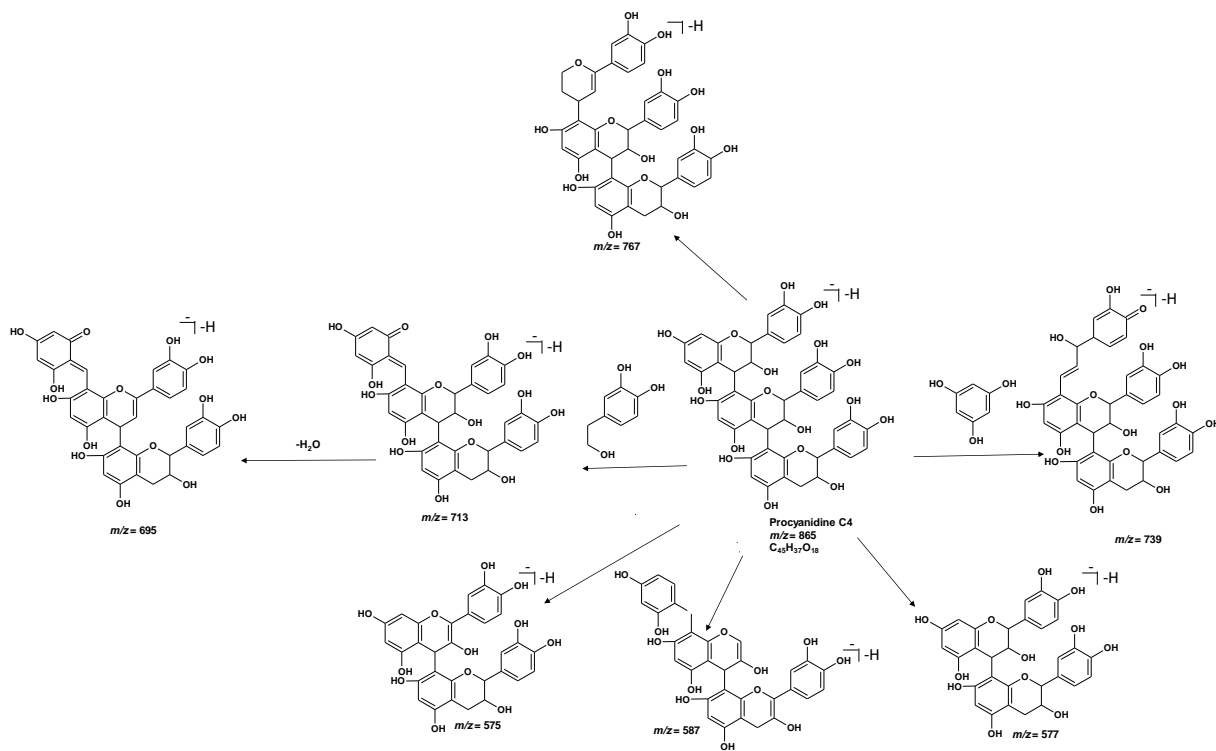


Figure 61 : Fragmentations de la procyanidine C4.

✓ Flavonoïde-*O*-glycosylé

Les fragmentations observées chez les flavonoïdes aglycones se produisent également au niveau des flavonoïdes-*O*-glycosylés. La fragmentation qui est spécifique aux flavonoïdes-*O*-glycosylés est la perte de l'ose (disaccharide, hexose, pentose et déoxyhexose,...) [132]. En fonction de la nature du sucre et de sa position sur l'aglycone, la rupture de la liaison osidique peut être hétérolytique ou homolytique [133]. Le clivage hétérolytique entraîne une rupture de la liaison osidique suivie d'un réarrangement des protons et engendre un ion fragment Y_0^- (Y_0 correspond à la partie aglycone du flavonoïde glycosylé) tandis que le clivage homolytique produit un ion radicalaire $Y_0^{\bullet-}$ (nomenclature utilisée par Domon et Costello) [134].

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire possède un rapport m/z 465 à 12,51 min a été identifié comme étant un dihydroflavonol glycosylé. Les fragmentations qui ont permis de l'identifier sont présentées dans les figures 62 et 63. Au niveau du spectre MS/MS de la taxifoline-3'-*O*-glucoside, l'ion fragment de rapport $m/z = 303$, s'explique par une perte de 162 uma informative de la présence d'un hexose [135]. La littérature a permis d'avoir la confirmation que le glucose (Glc) est l'hexose substitué à l'aglycone [136]. L'ion fragment de

rapport $m/z = 177$ formé après la perte du cycle B et d'une molécule de H_2O au niveau cycle C permettent de supposer que le composé identifié est un dihydroflavonol glycosylé au niveau du carbone 3' de l'aglycone. Dans le spectre MS/MS on note également la présence d'un ion fragment peu intense et proche de 450 uma mais dont la valeur du rapport m/z n'a pas été indiquée. Il s'agit de l'ion $[M-H-H_2O]^-$ ($m/z = 447$) formé par la perte de H_2O au niveau du cycle C du flavonoïde glycosylé. Cela a permis de confirmer que le composé correspond à la taxifoline-3'-*O*-glucoside (P13). Les autres ions observés correspondent à ceux qui ont été générés lors de la fragmentation de taxifoline.

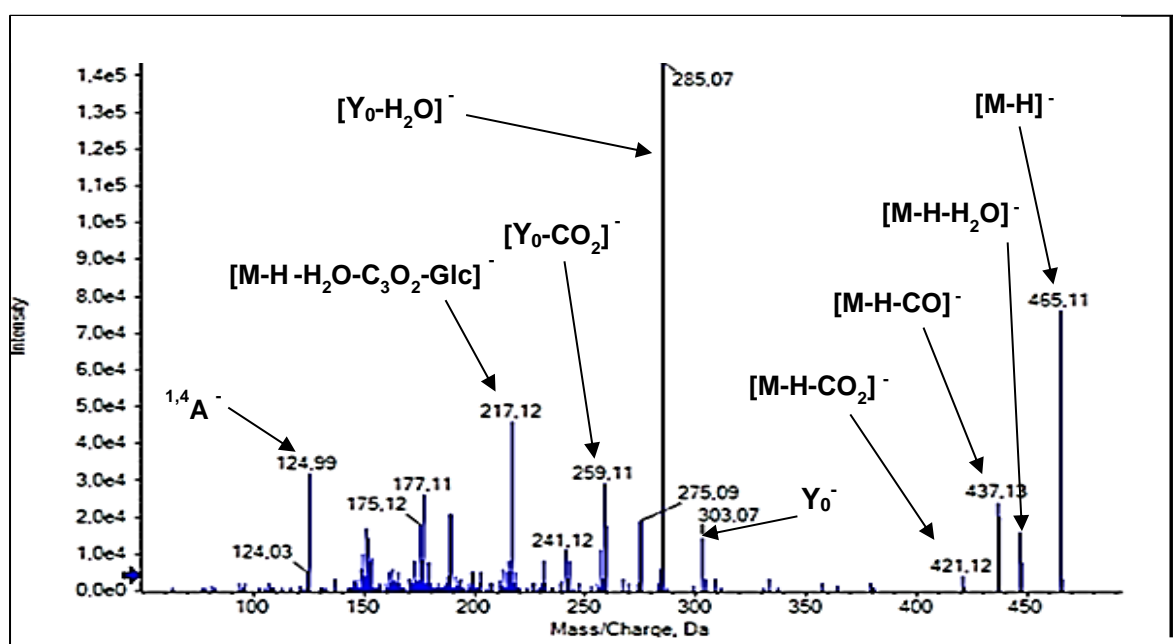


Figure 62 : Spectre MS/MS de la taxifoline-3'-*O*-glucoside.

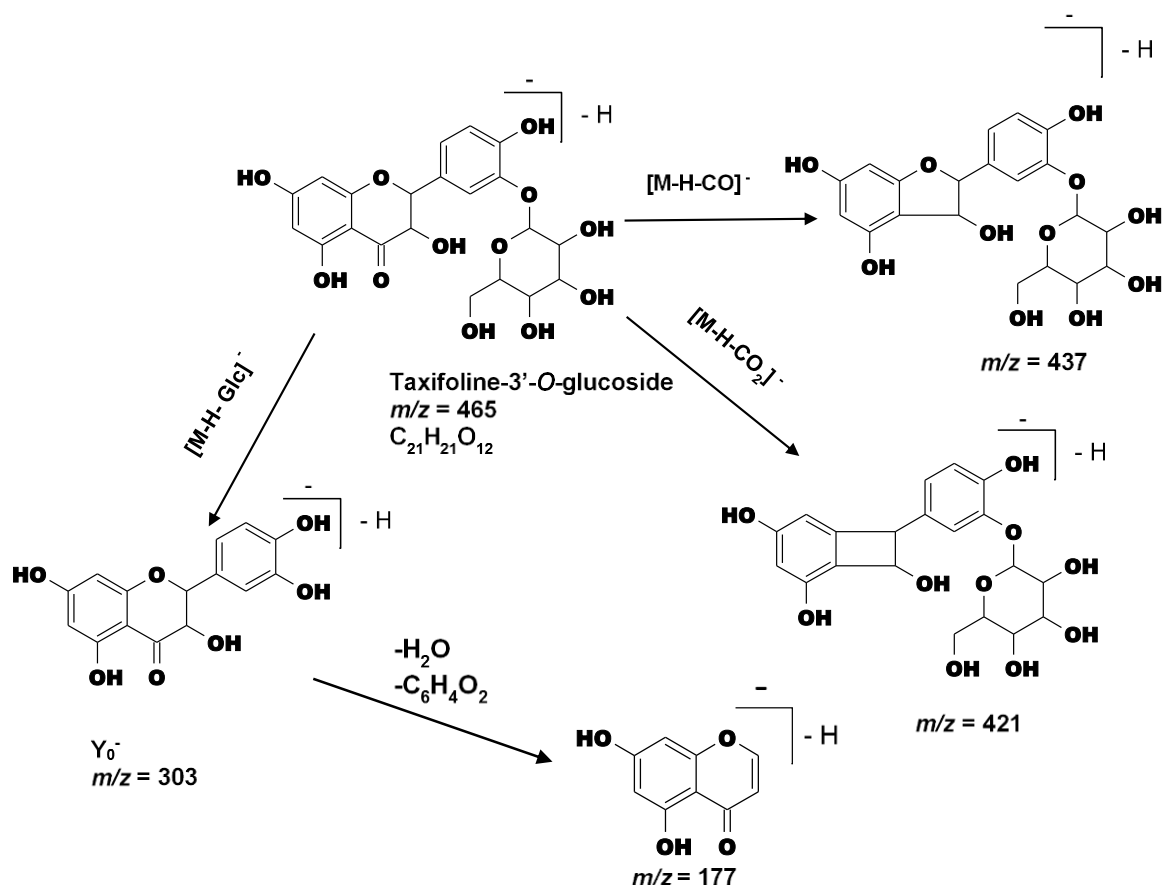


Figure 63 : Fragmentations caractéristiques de la taxifoline-3'-O-glucoside.

IV.1.1.2. Lignanes

Pour ce groupe de métabolites, les fragmentations sont spécifiques à chaque classe des lignanes [137].

Le composé possédant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ de rapport $m/z = 373$ ($t_R = 16,46$ min) a été identifié comme étant un métabolite appartenant à la classe des dibenzylbutyrolactone lignanes et appelé wikstromol ou neotrachélogénine (P14).[138] (figures 64 et 65). Le pic de base à m/z 164 correspond à l'ion radicalaire généré par décarboxylation suivi de la rupture de la liaison C8' et C8 et perte du radical méthyle. Les fragments ions à m/z 355 $[M-H-H_2O]^-$ et m/z 327 $[M-H-H_2O-CO]^-$ résultent successivement de la perte d'eau suivie de celle de CO. L'ion à m/z 312 $[M-H-H_2O-CO-CH_3]^{*-}$ est généré par les pertes consécutives de H₂O, CO₂ et du radical CH₃[•] et celui à m/z 296 $[M-H-H_2O-CO_2-CH_3]^{*-}$ est produit par les pertes consécutives de H₂O, CO₂ et CH₃[•]. Le fragment ion à m/z 193 correspond à l'ion coniferylate. Ceux à m/z 237 et 223 sont générés par la rupture de la liaison C-7' et C-8 suivi de la perte d'un des cycles aromatiques.

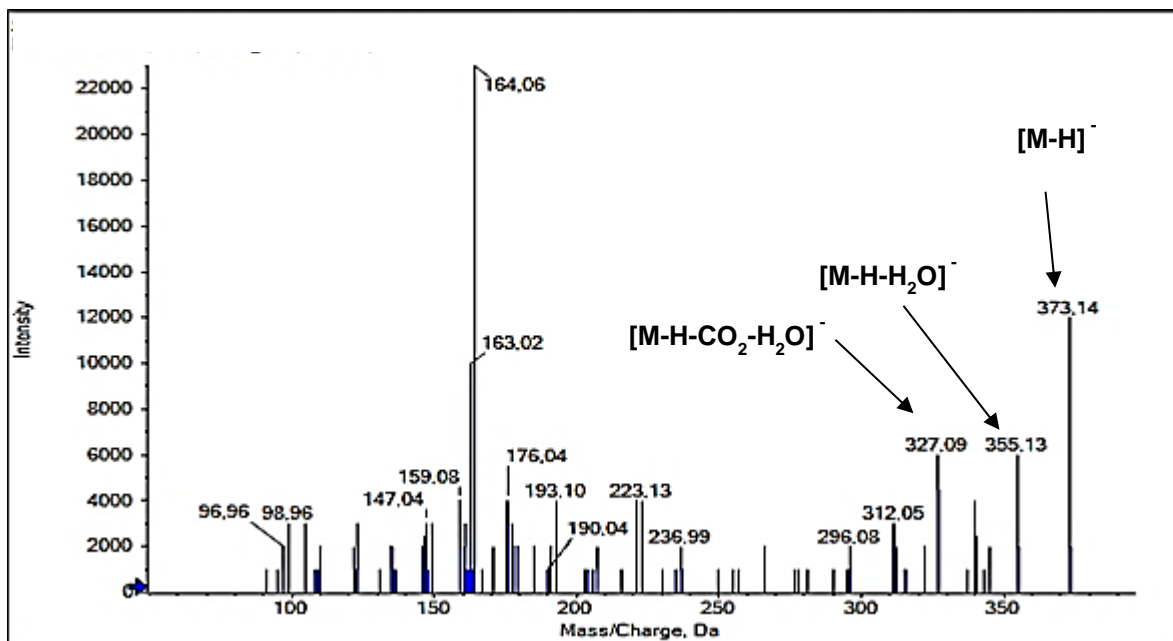


Figure 64 : Spectre MS/MS du wikstromol.

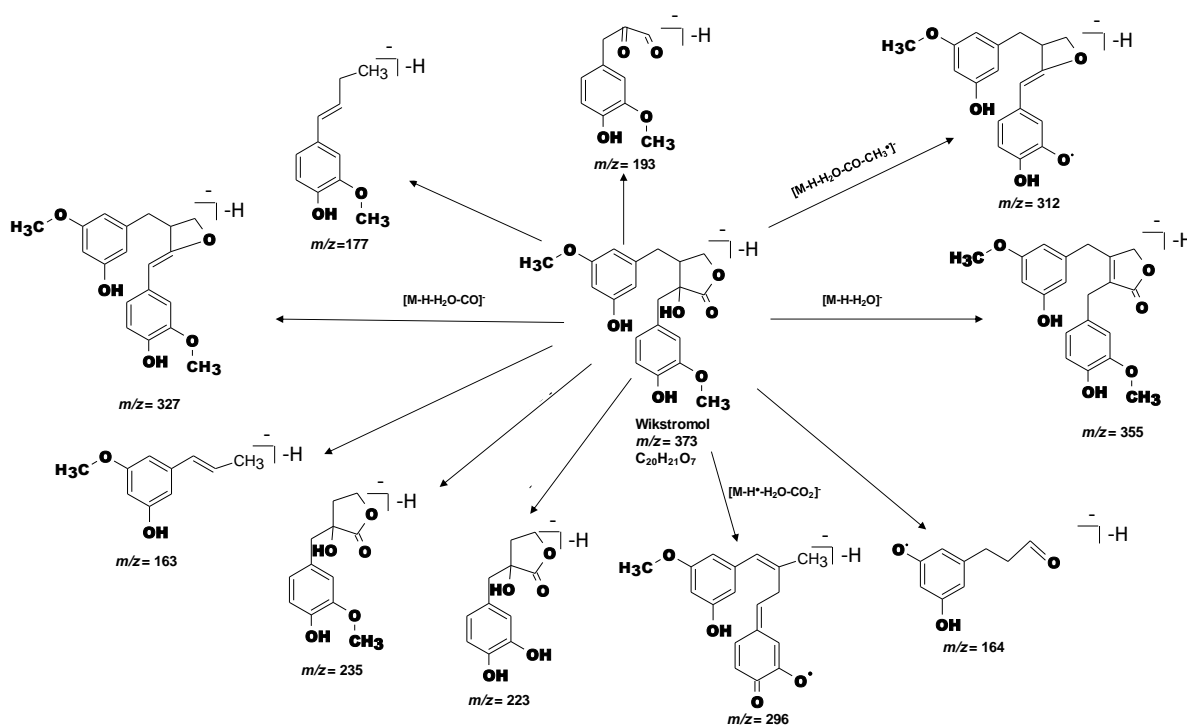


Figure 65 : Fragmentations du wikstromol.

IV.1.1.3. Terpènes

Le composé présentant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ de rapport $m/z = 329$ ($t_R = 18,06$ min) pourrait correspondre à un diterpène appelé gibbérelline A7 (P15) [139] (figures 66 et 67). $[M-H]^-$ est l'ion le plus intense. D'autres ions comme celles qui présentent les rapports m/z 229 et 211 sont également intenses. Il s'agit respectivement de $[M-H-2CO_2]^-$ généré lorsque des décarboxylations se produisent au niveau des carbones 2, 4 et 11 ; et $[M-H-C_9H_{14}]^-$ formé par la rupture des liaisons situées entre les carbones 2 et 9 puis 11 et 19. Cependant, la structure du composé n'a pas été confirmée car les valeurs des rapports m/z des ions fragments sont différentes de ce qui est observé dans la littérature.

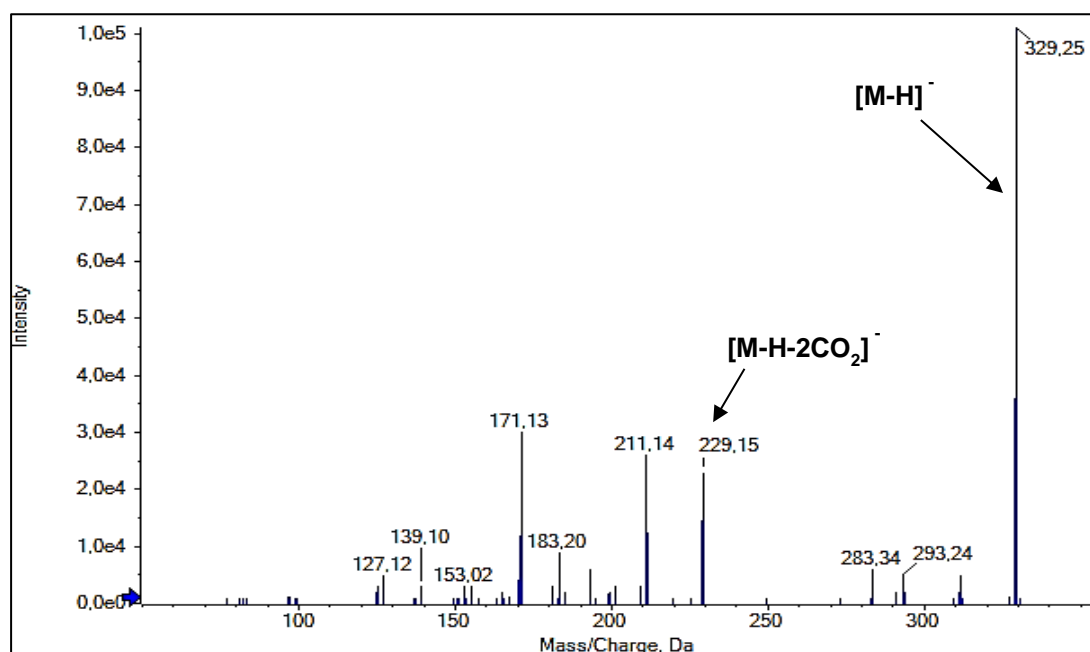


Figure 66 : Spectre MS/MS de la gibbérelline A7.

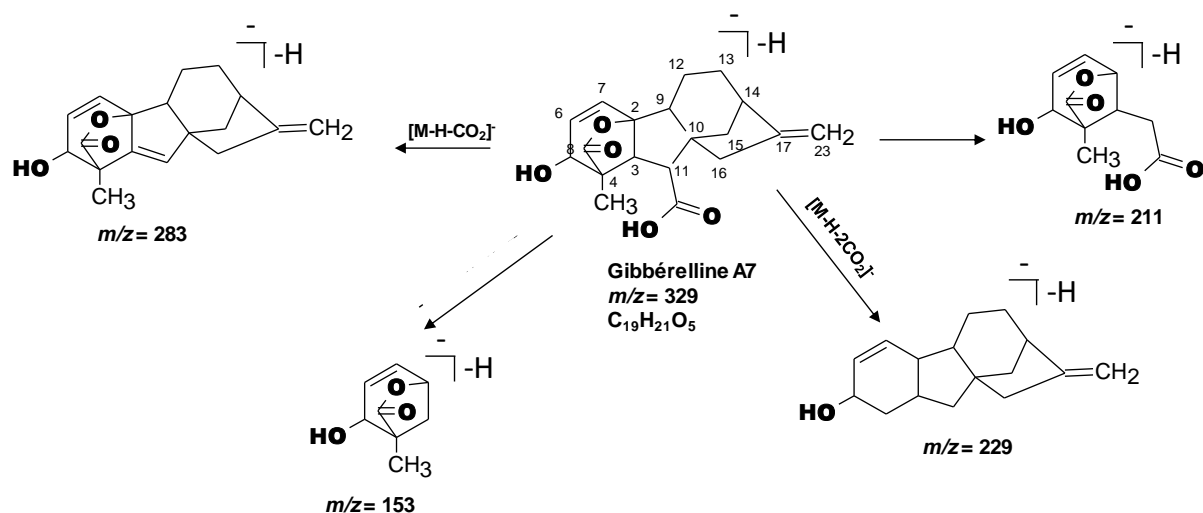


Figure 67 : Fragmentations de la gibbérelline A7.

IV.1.1.4. Acides gras

Le composé à m/z 329 au temps de rétention 19.66 min a été identifié comme étant l'acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécénoïque [140] (P16) (figures 68 et 69). L'ion pseudomoléculaire à m/z 329 $[M-H]^-$ correspond au pic de base. Les fragments ions à m/z 311 $[M-H-H_2O]^-$ et m/z 283 $[M-H-CO_2]^-$ sont générés respectivement par la perte de H_2O en C_{13} (car on note l'absence d'encombrement stérique sur cette région de la molécule) et la décarboxylation en C_1 indiquant la présence d'un acide carboxylique. Le fragment ion à m/z 263 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ est produit par les pertes consécutives de H_2O en C_{13} et CO_2 en C_1 . La perte de la chaîne carbonée ne portant pas l'acide carboxylique par la rupture de la liaison C_8-C_7 , entraîne la formation de l'ion à m/z 299 $[M-H-C_7H_{14}O_2]^-$ tandis que la rupture de la liaison C_9-C_{10} produit l'ion à m/z 171 $[M-H-C_7H_{14}O_2]^-$ et entraîne la perte de la chaîne carbonée non fonctionnalisée. Le fragment ion à m/z 227 $[M-H-C_6H_{14}O]^-$ est formé par la rupture de la liaison $C_{12}-C_{13}$ entraînant la perte de la chaîne carbonée non fonctionnalisée.

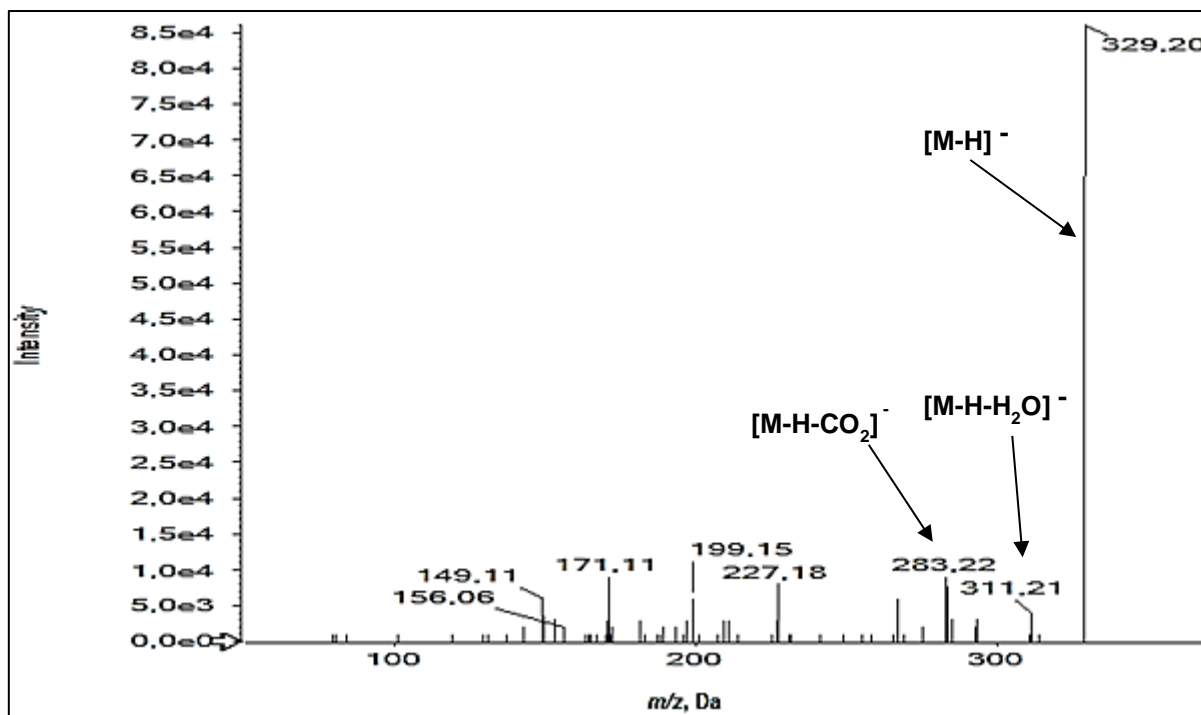


Figure 68 : Spectre MS/MS de l'acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécenoïque.

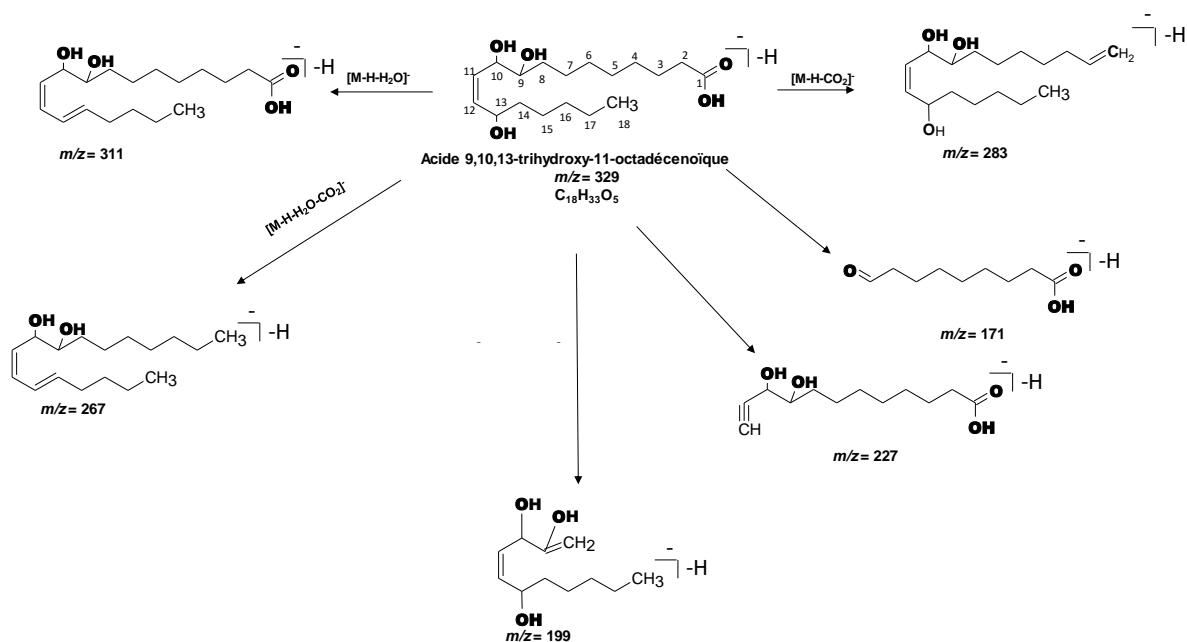


Figure 69 : Fragmentations de l'acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécenoïque.

Le composé à m/z 315 au temps de rétention 26.06 min a été identifié comme étant l'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque (figures 70 et 71). L'ion pseudomoléculaire à m/z 315 $[M-H]^-$ correspond au pic de base. Le fragment ion intense à m/z 199 $[M-H-C_6H_{12}O_2]^-$ est généré par la rupture de la liaison C7-C8 entraînant la perte de la chaîne carbonée portant l'acide carboxylique. La rupture de la liaison C13-C14 entraîne la formation de l'ion à m/z 97 $[M-H-C_{11}H_{22}O_4]^-$ après la perte de la chaîne carbonée fonctionnalisée. Les fragments ions à m/z 297 $[M-H-H_2O]^-$ et m/z 271 $[M-H-CO_2]^-$ sont générés respectivement par les pertes de H_2O en C10 et la décarboxylation en C1 indiquant la présence de la fonction acide carboxylique.

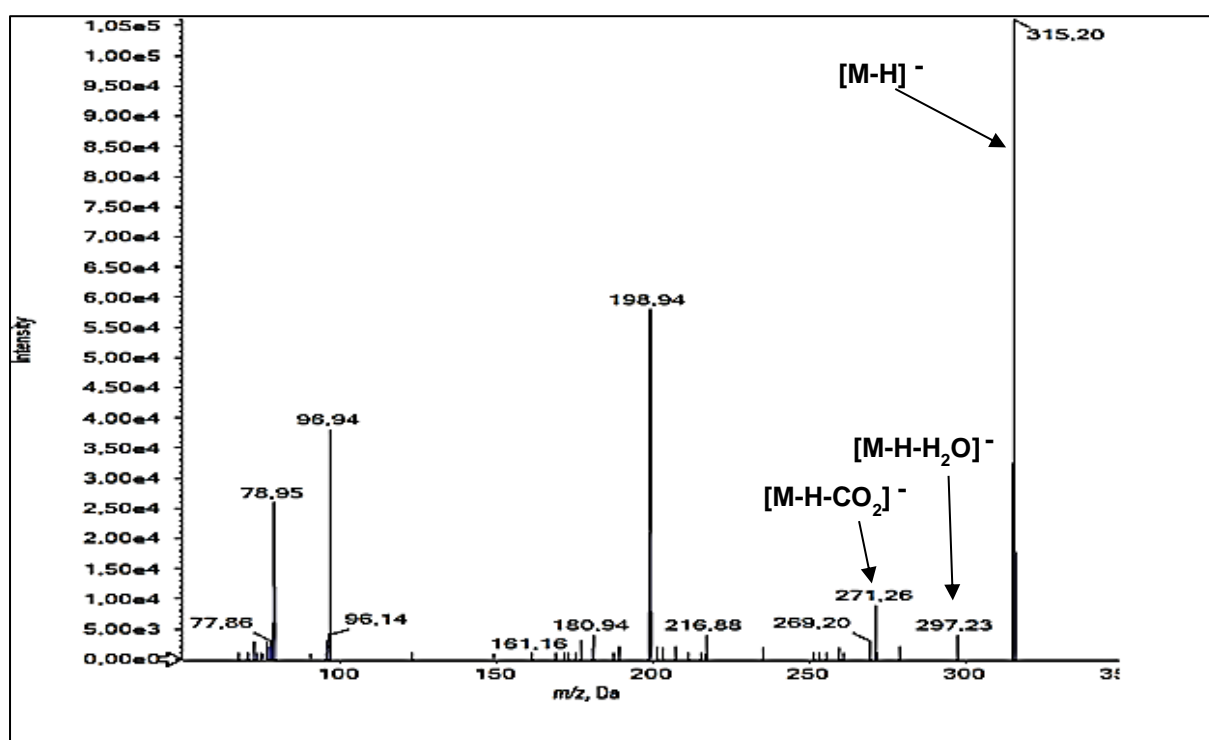


Figure 70 : Spectre MS/MS de l'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque.

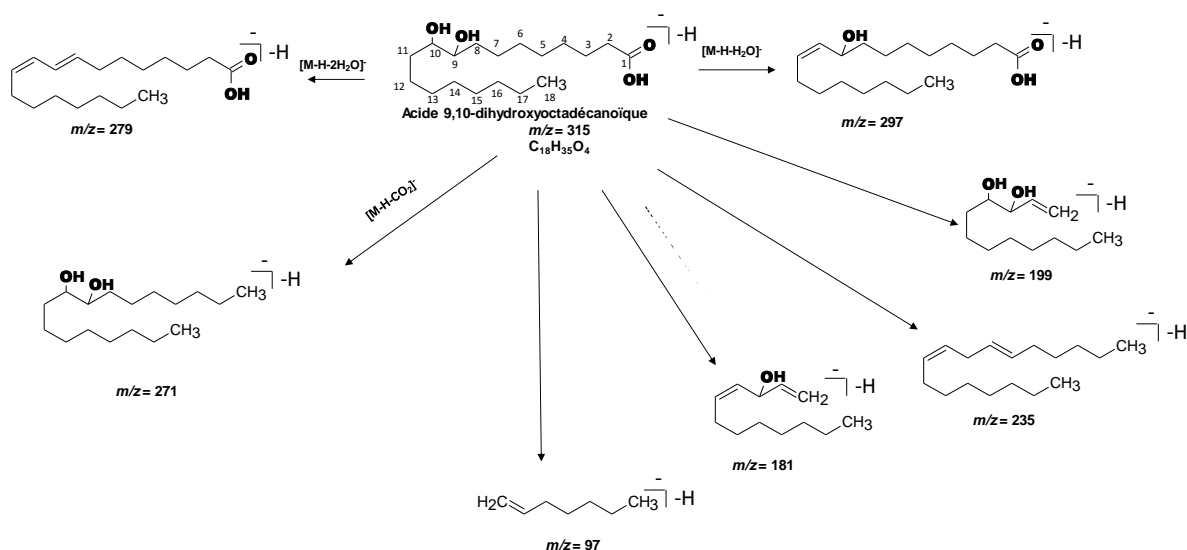


Figure 71 : Fragmentations de l'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque.

IV.1.1.5. Bilan des composés identifiés dans l'extrait d'aubier.

Après avoir analysé l'extrait d'aubier en LC-MS/MS, 12 composés ont été identifiés. Parmi les composés identifiés, sont présents les polyphénols regroupant des flavonoïdes, des procyanidines et des lignanes, des acides gras, un diterpène dont la structure n'a pas été confirmé (tableau 6). La taxifoline, la pinobanksine, le dihydrokaempférol, le kaempférol, la catéchine, l'épicatéchine et la pinocembrine, sont des flavonoïdes aglycones qui ont été identifiés dans l'extrait d'aubier. En dehors de la pinobanksine qui est retrouvée dans de nombreuses autres plantes [124], les autres flavonoïdes aglycones ont été décrits auparavant dans le bois de Douglas (aubier, zone de transition et duramen) [5]. Au niveau de l'extrait d'aubier, un flavonoïde glycosylé a également été identifié. Il s'agit d'un dérivé de la taxifoline appelé taxifoline-3'-O-glucoside [5]. Ce composé a été décrit dans l'aubier du bois de Douglas [5].

Les procyanidines B1 ou B2 et C4 sont des tanins condensés identifiés dans l'extrait d'aubier. Ces deux composés qui sont des dimères et trimères de catéchine et d'épicatéchine ont été décrits dans l'écorce du bois de Douglas [127].

Le wikstromol est un lignane qui a été identifié dans l'extrait d'aubier. On le retrouve dans le pin des marais (*Pinus palustris*) [138] mais également dans d'autres plantes [141]. Le terpène identifié est la gibbérelline A7 retrouvé dans les bourgeons, les aiguilles, et les cônes du sapin de Douglas [142]. D'autres composés détectés ou identifiés sont présents en annexe (annexe 2).

Les acides 9,10,13-trihydroxy-11-octadécenoïque et 9,10-dihydroxyoctadécanoïque sont les deux acides gras qui ont été identifiés dans l'extrait d'aubier. Le premier est retrouvé dans le riz [143] et le second est présent dans les bactéries [144].

Au niveau des résultats de l'analyse de l'extrait d'aubier certains composés ont été identifiés à deux reprises mais à des temps de retentions légèrement différents. C'est le cas du dihydrokaempferol, la taxifoline et la taxifoline-3'-*O*-glucoside (tableau 6). L'identification de ces 3 composés (stéréoisomères) à plusieurs temps de rétention légèrement différents indique également que ce sont des isomères car ces flavonoïdes possèdent des carbones asymétriques.

Les autres composés détectés sont présentés en annexe (annexe 2).

Tableau 5 : Composés identifiés dans l'extrait d'aubier.

tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Composé identifié
9,63	577	Procyanidine B1/ B2
10,52	289	Catéchine
11,41	289	Epicatéchine
11,67	865	Procyanidine C4
12,47	465	Taxifoline-3'- <i>O</i> -Glc
12,56	465	Taxifoline-3'- <i>O</i> -Glc
13,98	285	Kaempferol
14,07	303	Taxifoline
14,16	303	Taxifoline
15,58	287	Dihydrokaempferol
16,46	373	Wikstromol
16,91	287	Dihydrokaempferol
18,06	329	Gibbérelline A7
18,60	271	Pinobanskine
19,66	329	Acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécenoïque
22,33	255	Pinoembrine
26,06	315	Acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque

IV.1.2. Fractions

L'analyse en LC-MS/MS a été effectuée à partir des sous-fraction F6f, F8d, et F9f issue de la repurification des fractions F6, F8 et F9 (cf partie II). Cette étude a permis d'identifier des composés minoritaires non détectés lors de l'analyse LC/MS de l'extrait brut.

IV.1.2.1. Flavonols

Un flavonol a été identifié au niveau de la fraction F8d à 11,24 min. Il s'agit du composé possédant un ion pseudomoléculaire à m/z 301 [M-H]⁻ correspondant au pic de base de la quercétine (P2) [120] (figures 72 et 73). Le fragment ion à m/z 179 [M-H-^{1,2}B]⁻ est

généralisé par la rupture des liaisons 1 et 2 du cycle C entraînant la perte du cycle B. L'ion à m/z 151 $[M-H-^{1,2}A-CO]^-$ est issu de la perte d'un CO à partir de l'ion à m/z 179 tandis que l'ion à m/z 107 $[M-H-^{1,2}A-CO-CO_2]^-$ est généré par la perte de CO_2 à partir de l'ion à m/z 151. L'ion à m/z 211 $[M-H-2CO_2]^-$ est formé par la perte de deux CO_2 (sur les cycles A et C) et celui à m/z 229 $[M-H-^{1,2}B-CO-CO_2]^-$ est formé par les pertes consécutives de CO et CO_2 au niveau du cycle C. L'ion à m/z 273 $[M-H-CO]^-$ est généré par la perte de CO au niveau du cycle C tandis que celui à m/z 121 $[^{1,2}B]^-$ est produit par la rupture des liaisons 1 et 2 du cycle C entraînant la perte du cycle A.

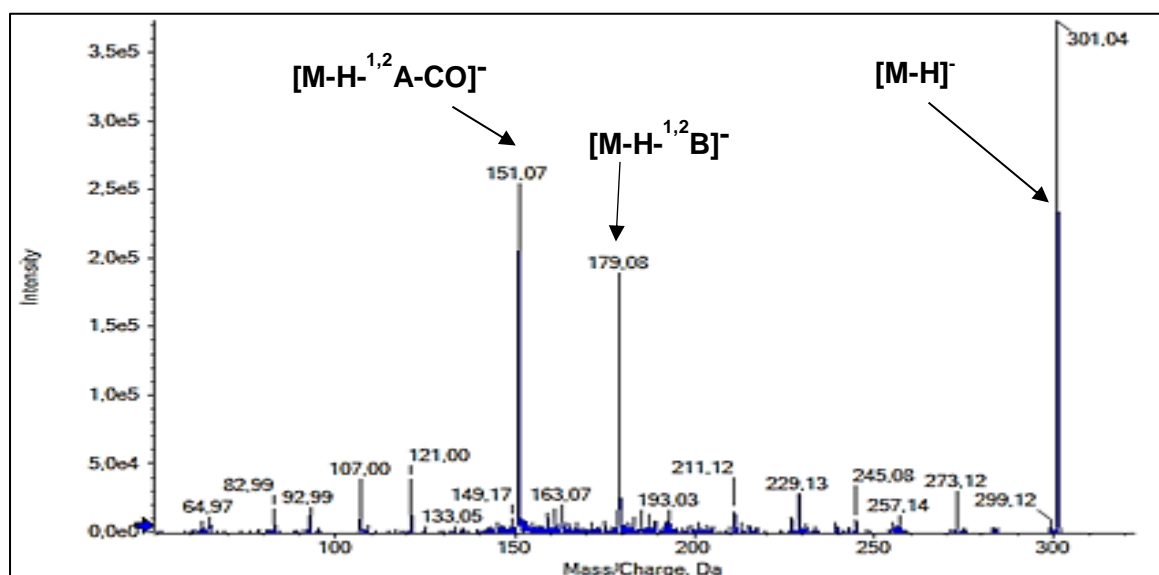


Figure 72 : Spectre MS/MS de la quercétine.

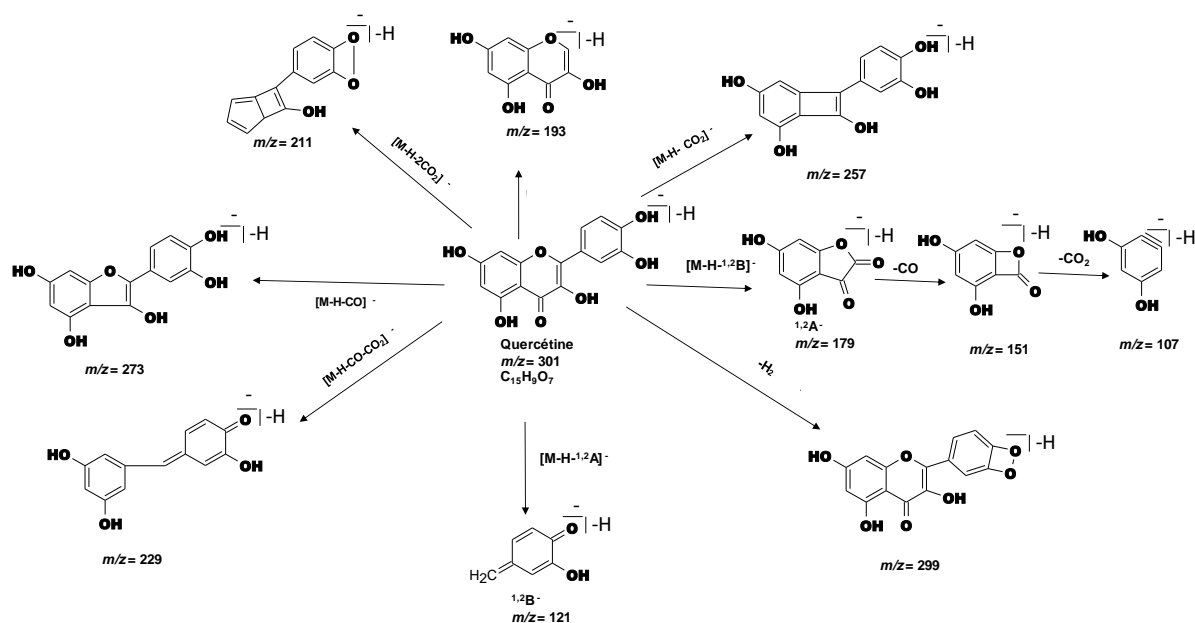


Figure 73 : Fragmentations de la quercétine.

Au niveau de la sous-fraction F6f, le composé dont le rapport de l'ion pseudomoléculaire est à m/z 317 $[M-H]^-$ ($t_R = 10,59$ min) a été identifié comme étant la myricétine (P18) [145] (figures 74 et 75). Les deux ions intenses observés sur le spectre MS/MS sont l'ion pseudomoléculaire à m/z 317 $[M-H]^-$ et m/z 289 $[M-H-CO]^-$. Ce dernier est le pic de base et est formé par la perte de CO au niveau du cycle C. L'ion à m/z 125 $[^{1,4}A]^-$ est également observé. On note également la présence d'un ion fragment peu intense de rapport m/z 299 $[M-H-H_2O]^-$ qui provient de la fragmentation entraînant la perte de H_2O au niveau du cycle B. Le fragment ion à m/z 273 $[M-H-CO_2]^-$ est produit par une perte de CO_2 au niveau du cycle C.

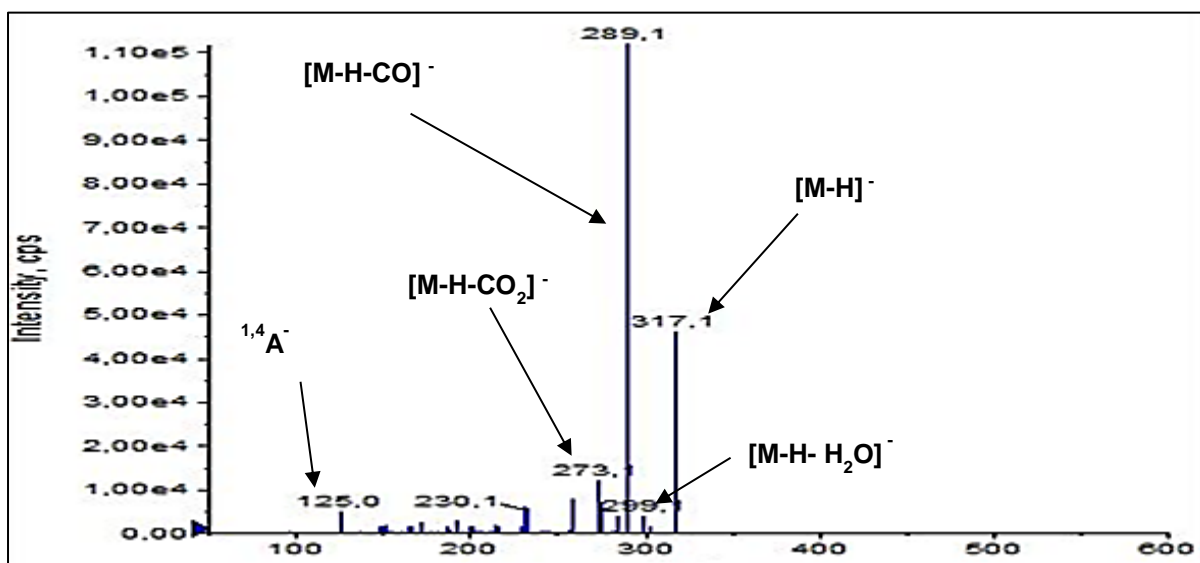


Figure 74 : Spectre MS/MS de la myricétine.

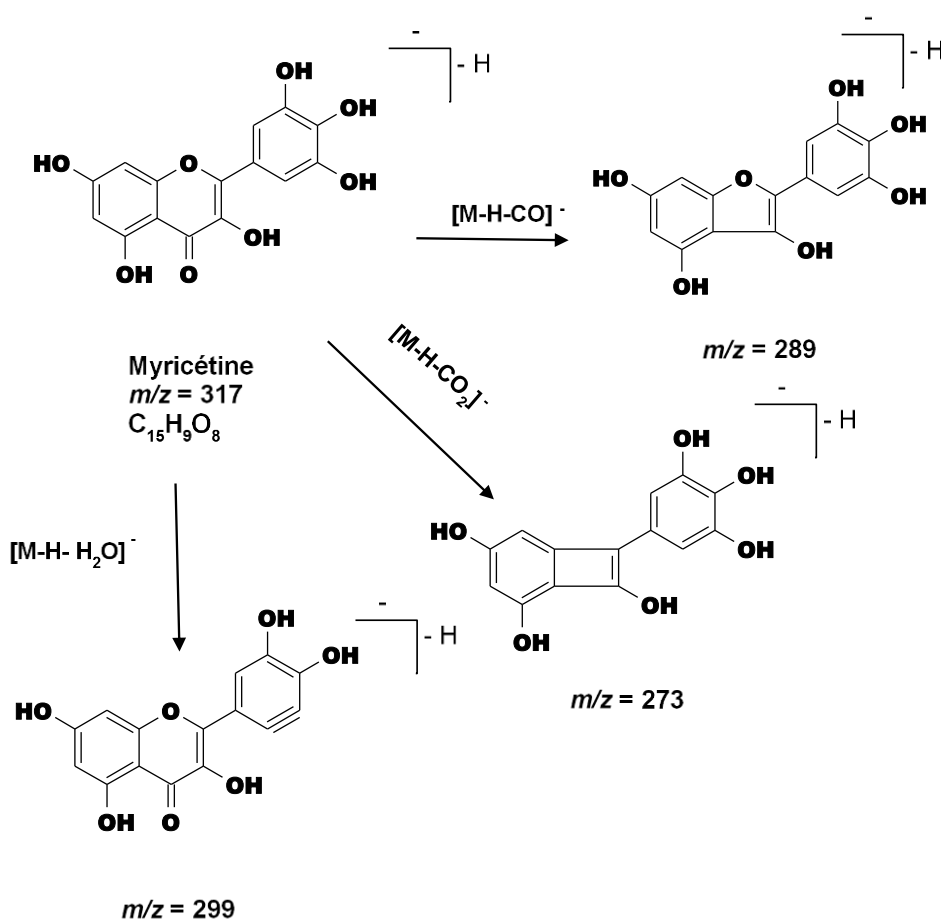


Figure 75 : Fragmentations de la myricétine.

Un flavonol glycosylé a été identifié dans la sous-fraction F6f. Il s'agit du composé présentant un ion pseudomoléculaire de rapport m/z de 447 est susceptible de correspondre à la quercétine-3-*O*-rhamnoside ou quercitrine (P19) [133] (figures 76 et 77). Dans le spectre MS/MS de ce composé, les ions fragments de rapports m/z 301 et 273 sont caractéristiques de la quercétine. Pour passer de l'ion pseudomoléculaire à m/z 447 $[M-H]^-$ à l'ion fragment à m/z 301 $[Y_0^-]$, la molécule a subi une perte de 146 uma caractéristique d'un déoxyhexose. Après avoir comparé le spectre MS/MS de la quercitrine avec les informations présentes dans la littérature [133], il a été déduit que la glycosylation se réalisait au niveau de la position 3 de la quercétine pour entraîner la formation de la quercitrine-3-*O*-rhamnoside. Sur le spectre MS/MS de la quercitrine, comme dans le cas de certains flavonoïdes glycosylés des ions fragments originaires des ruptures hétérolytiques de la liaison osidique de l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ sont observés [146] (figure 76). Cette rupture hétérolytique entraîne la formation des ions fragments dont les rapports m/z sont 301 et 179. Ces ions sont issus de fragmentations caractéristiques à la quercétine telles que les pertes de CO, CO₂ ou le clivage des liaisons 1 et 4 du cycle C. Cependant, la présence d'un ion fragment à m/z 300 peu intense réduit l'hypothèse d'un composé dont la structure correspond à celle de la quercitrine.

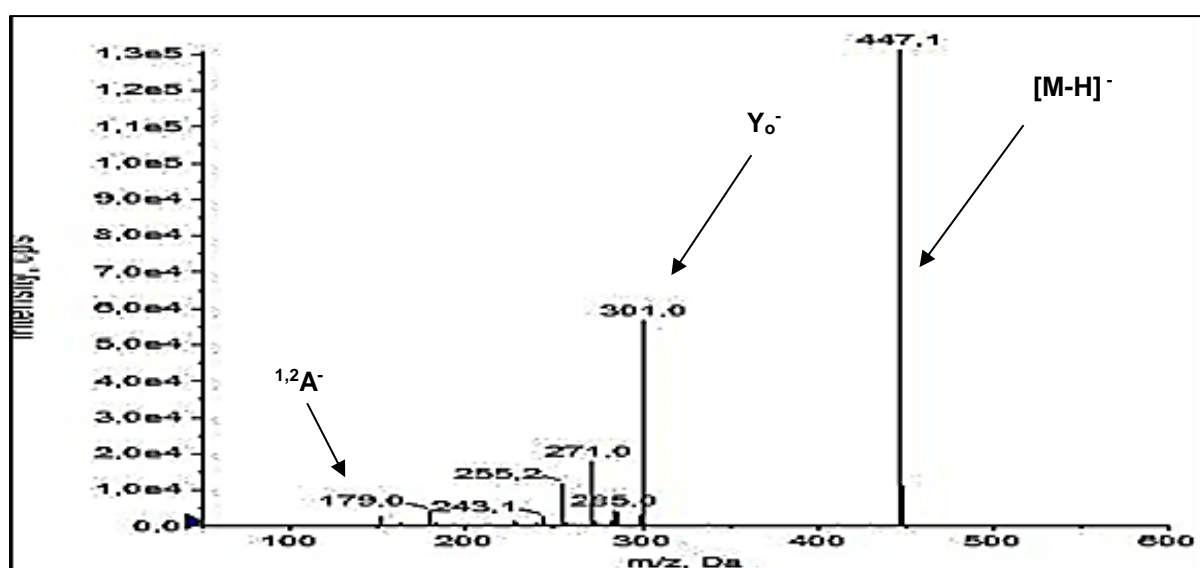


Figure 76 : Spectre MS/MS du composé à m/z 447.

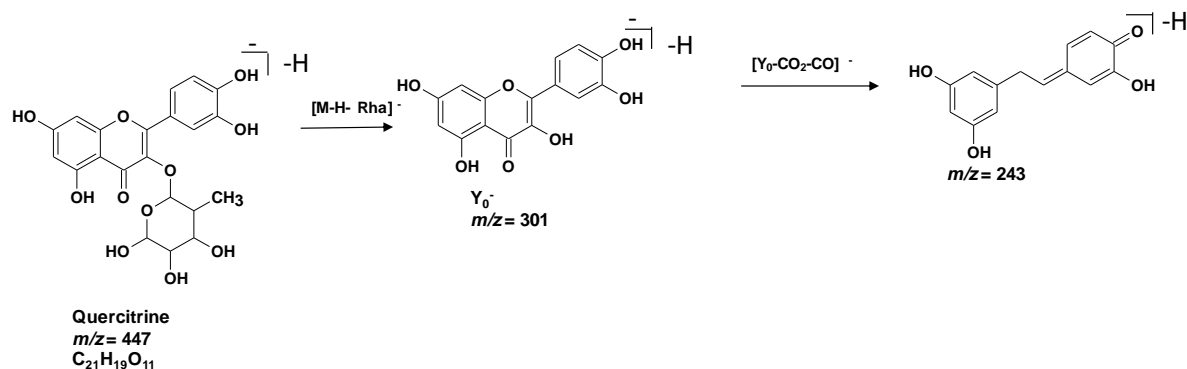


Figure 77 : Fragmentations de la quercitrine.

IV.1.2.2. Diphénylpropane

Au niveau de la sous-fraction F9f le composé qui possède un ion pseudomoléculaire de rapport $m/z = 349$ est susceptible de correspondre au méthyl-3-[3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxypropyl]-2,4,6-trihydroxybenzoate (P20) (figures 78 et 79) dont la structure est proche de celle du dihydrochalcone (cf partie I, flavonoïdes). L'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ n'est pas observé dans le spectre MS/MS car la molécule a commencé à se fragmenter dans la source d'ionisation. L'ion fragment majoritaire est celui qui présente un rapport $m/z = 300$. La structure de ce composé n'a pas été confirmée car elle n'a pas été retrouvée dans la littérature.

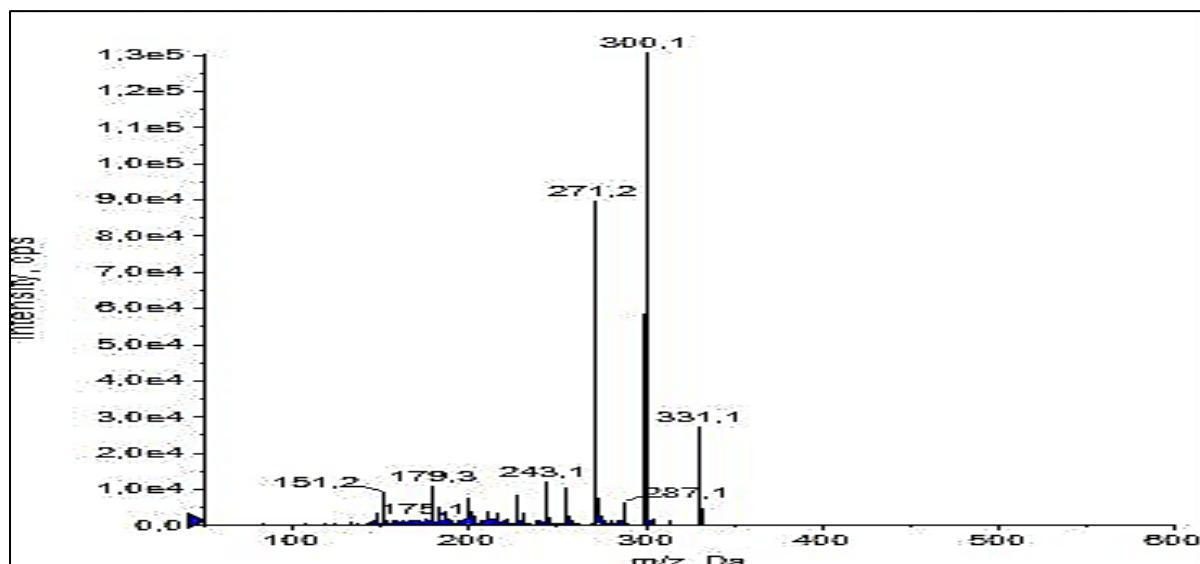


Figure 78 : Spectre MS/MS du composé à m/z 349

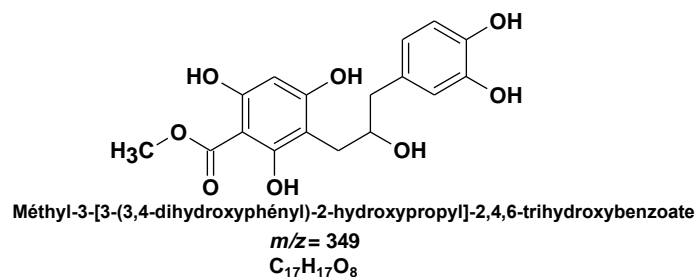


Figure 79 : Structure du dérivé diphenylpropane.

IV.1.2.3. Flavonolignane

La silybine (P21) [147] a été identifié comme étant le composé qui présente un ion pseudomoléculaire à $m/z = 481$ $[M-H]^-$ ($t_R = 11,58$ min) (figures 80 et 81). Le pic de base est l'ion à m/z 285 $[M-H-H_2O-C_{10}H_{12}O_3]^-$ généré par la perte du monolignol (alcool dihydroconiférylique) associé à une perte d'eau sur le cycle C. La perte du monolignol lié à la taxifoline au niveau des hydroxyles portés par les carbones 4' et 5' du cycle B entraîne la formation de l'ion à m/z 303 $[M-H-C_{10}H_{12}O_3]^-$. On observe également une perte de H_2O entraînant la formation de l'ion à m/z 463 $[M-H-H_2O]^-$. Le fragment ion à m/z 453 $[M-H-CO]^-$ est généré par la perte de CO. L'ion à m/z 419 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ est produit par les pertes consécutives de H_2O et CO_2 . L'ion à m/z 357 $[M-H-H_2O-^{0,4}A]^-$ est généré par la rupture des liaisons 0 et 4 du cycle C associés aux pertes de H_2O et du cycle A. Les ions à m/z 313 $[^{0,2}A]^-$ et 314 $[^{0,2}A]^-$ sont produits par la rupture des liaisons 0 et 2 entraînant la perte du cycle B. Pour ce flavonolignane, il n'est pas possible de définir s'il s'agit de la silybine ou d'autres composés appartenant à la famille de la silybine.

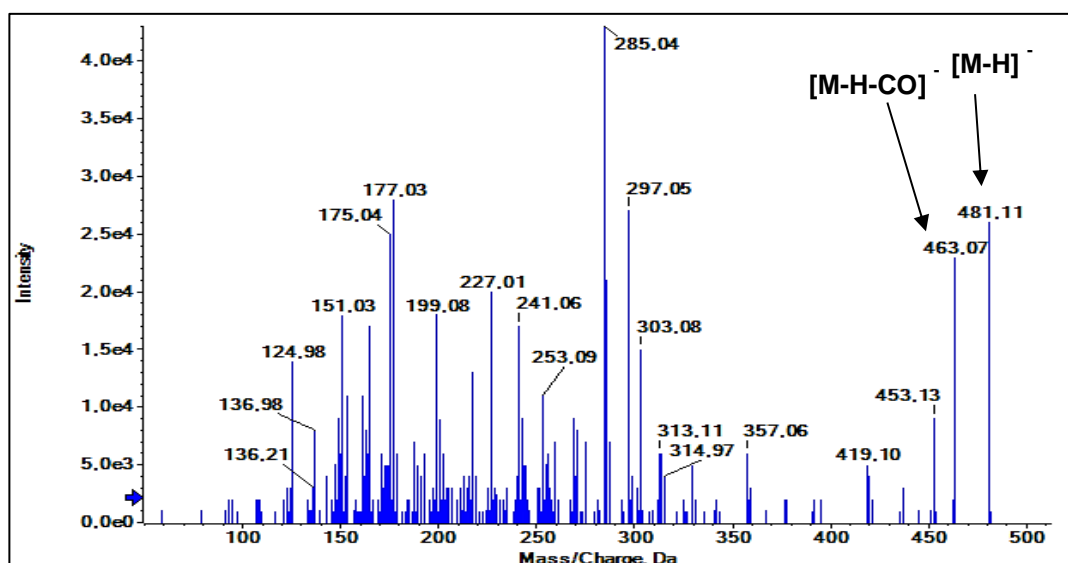


Figure 80 : Spectre MS/MS de la silybine.

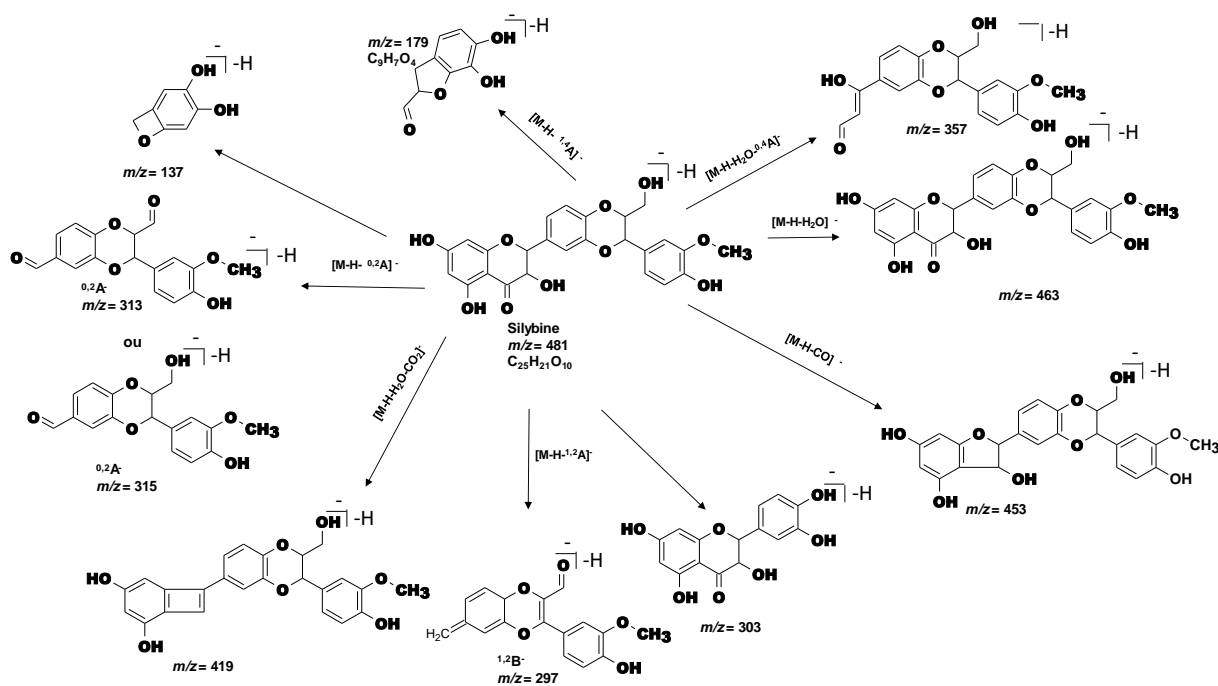


Figure 81 : Fragmentations de la silybine.

IV.1.2.4. Bilan des composés identifiés dans les fractions de l'aubier

Les résultats de l'analyse des fractions et sous-fractions de l'aubier ont permis d'identifier 5 composés. Ces composés sont des polyphénols dans lesquelles on peut retrouver des flavonoïdes, un dérivé diphenylpropane et un flavonolignane. La quercétine et la myricétine sont les flavonoïdes aglycones qui ont été identifiés. Ces métabolites ont été décrit dans le bois de Douglas [5].

La quercitrine est le seul flavonoïde glycosylé identifié au niveau des fractions de l'aubier. Ce composé a été décrit comme étant présent dans d'autres espèces appartenant à la famille des *Pinaceae* [148]. L'unique flavonolignane identifié est la silybine qui est un composé que l'on retrouve dans le Chardon-Marie (*Silybum marianum*).

Un composé dont la structure chimique a été proposée comme étant un dérivé diphenylpropane. Ce composé n'a pas été retrouvé dans la littérature mais présente une structure proche de la dihydrochalcone qui est présent dans plusieurs plantes [124].

- **Comparaison des résultats de l'analyse de l'extrait et des fractions de l'aubier**

Au niveau de l'aubier 17 composés ont été identifiés au total dans l'extrait et les fractions exploitées. Ce sont uniquement des polyphénols qui ont été identifiés. Le groupe de polyphénol le plus représenté est celui des flavonoïdes dont certains sont présents à la fois dans l'extrait et les fractions. Ces composés sont la taxifoline, la taxifoline-3'-O-Glc, la quercétine et le dihydrokaempferol. Lorsque les spectres MS/MS des composés identifiés dans les sous-fractions sont comparés avec les spectres MS/MS des composés identifiés dans l'extrait d'aubier, on remarque qu'ils diffèrent par le nombre de fragments apparaissant dans le spectre et la gamme de masse utilisée. Cela est dû aux conditions d'analyse qui sont différentes. En effet, les fractions ont été analysées en premier avec des conditions analyse qui n'ont pas été satisfaisantes car dans les spectres MS/MS la faible quantité de fragments observés n'a pas permis d'identifier de façon précise certains composés. De plus, la gamme de masse utilisée était trop restreinte (100 à 600 Da) pour identifier certains composés possédant des rapports de $m/z > 600$ qui pourraient également être des composés comme la [5',5']-bidihydroquercétine de rapport $m/z = 605$ et décrits dans la littérature comme étant présent dans le bois de Douglas.

IV.2. Duramen

IV.2.1. Extrait

L'analyse de cet extrait par MS/MS a permis de détecter 20 composés (figure 82). L'observation du TIC de l'extrait de duramen montre la présence de deux composés majoritaires à 13,95 min et 15,53 min. Ces temps de rétention sont proches de celles des polyphénols identifiés précédemment comme la taxifoline et la quercétine.

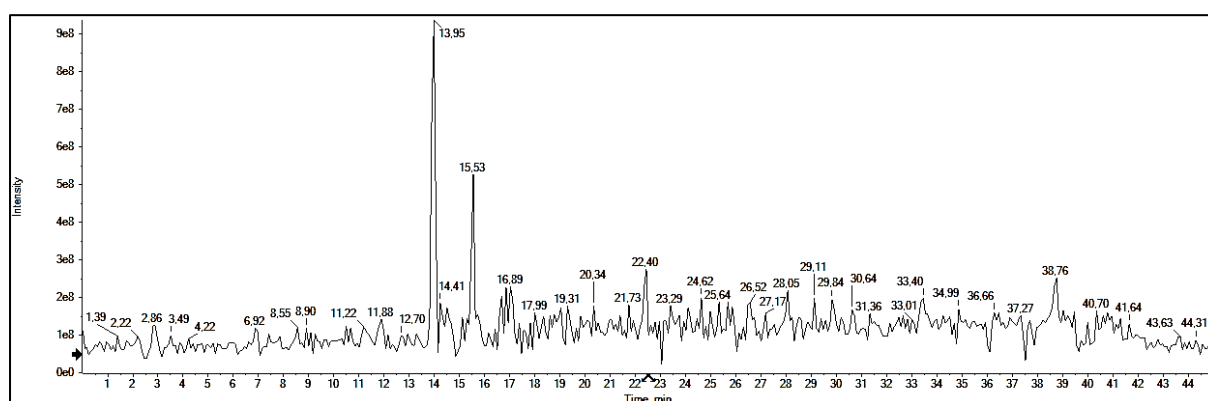


Figure 82 : Représentation du TIC de l'extrait de duramen.

IV.2.1.1. Flavonoïdes

Les composés présentant les rapports m/z de 255, 271, 285 ($t_R = 13,94$ min), 287, 301, 303, 465 ont été identifiés comme étant respectivement la pinocembrine, la pinobanksine, le kaempférol, le dihydrokaempférol, la quercétine, la taxifoline et la taxifolin-3'-*O*-glucoside. Tous ces composés ont été identifiés précédemment dans l'extrait et les fractions de l'aubier.

Le composé présentant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ avec un rapport $m/z = 331$ ($t_R = 17,34$ min) a été identifié comme étant la taxifoline-7,3'-diméthyléther (P22) (figures 83 et 84) [149]. Sur le spectre MS/MS, le pic de base est observé à m/z 153 correspondant à l'ion $^{0,2}B^-$. La présence de l'ion à m/z 303 $[M-H-2CH_3]^-$ produit par la perte de 2 groupes méthyles confirme la présence de la taxifoline. On note également la présence d'autres d'ions générés par des fragmentations caractéristiques à la taxifoline et dont les rapports m/z sont 179 $[^{0,2}A^-]$ et 151 $[^{0,3}A^-]$. L'ion à m/z 269 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ est généré par les pertes consécutives de H_2O et CO_2 au niveau du cycle C. Les ions à m/z 180 $[^{1,2}A-CH_3]^\bullet$, 152 $[^{1,3}A-CH_3]^\bullet$ et 124 $[^{1,4}A-CH_3]^\bullet$ proviennent des ruptures des liaisons du cycle C associé à la perte de l'ion radicalaire CH_3^\bullet .

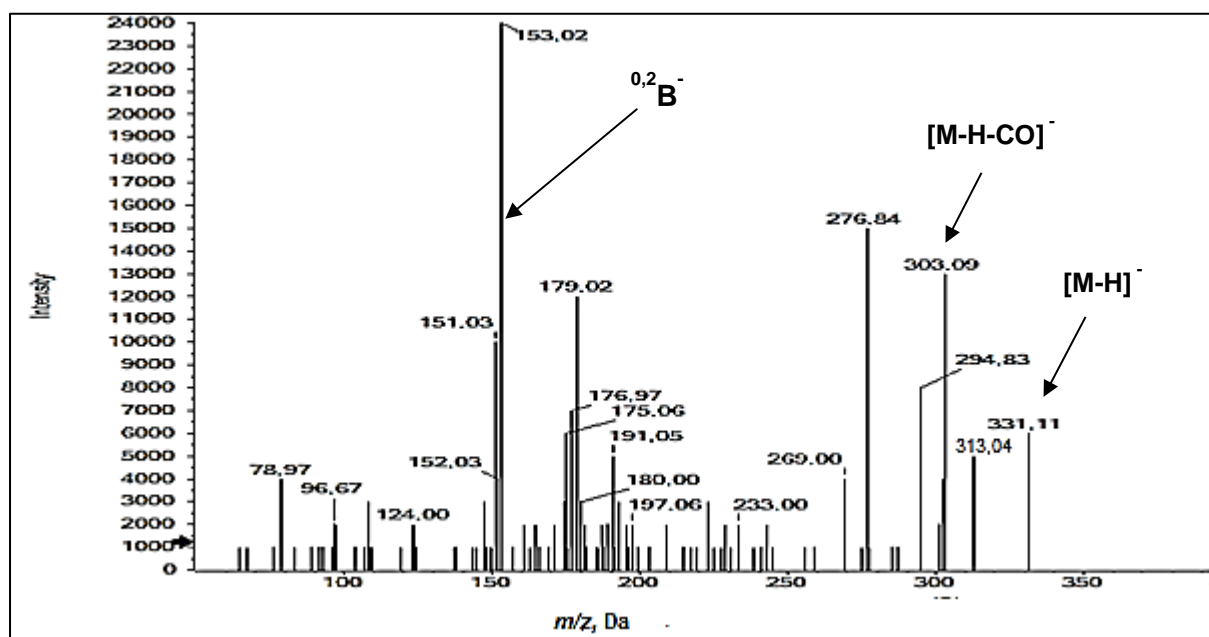


Figure 83 : Spectre MS/MS de la taxifoline-7,3'-diméthyléther.

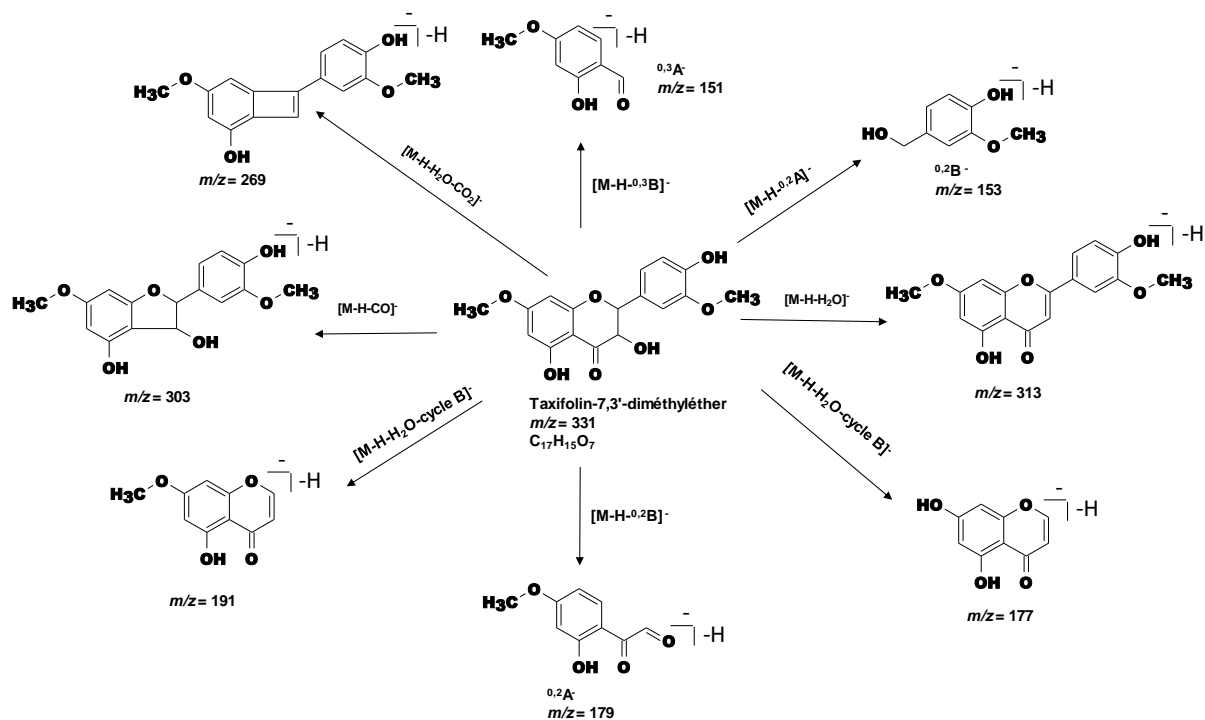


Figure 84 : Fragmentations de la taxifoline-7,3'-diméthyléther.

Le composé présentant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ avec rapport $m/z = 605$ ($t_R = 17,07$ min) a été identifié comme étant un biflavonoïde (P23) (figures 85 et 86). Sur le spectre MS/MS, l'ion pseudomoléculaire à $m/z 605$ $[M-H]^-$ est majoritaire. Les ions à $m/z 301$, 285, 257, 217, 151 et 125 sont caractéristiques de la taxifoline. On observe un ion intense qui présente un rapport $m/z = 301$ correspondant au poids moléculaire de la quercétine. Les ions à $m/z 587$ et 543 sont générés respectivement par les pertes de H_2O et de CO_2 . L'ion à $m/z 479$ est produit par un mécanisme de clivage hétérocyclique conduisant à la perte de l'ion $^{0,4}A^-$ comparable à ce qui est observé pour les tanins. La perte simultanée de H_2O sur les deux entités monomériques génère le fragment ion à $m/z 569$. Le fragment ion à $m/z 525$ $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$ est généré par la perte successive de $2H_2O$ et une décarboxylation. Les autres ions fragments observés et qui présentent des rapports m/z inférieur à 301 correspondent à ceux de la taxifoline (cf fragmentation de la taxifoline). Cela a permis d'identifier le composé comme étant la [5',5'']-bisdihydroquercétine [5] (figures 84 et 85). L'ion à $m/z 461$ $[M-H-H_2O-C_3O_2-C_2H_2O_2]^-$ est généré par les pertes successives de H_2O et C_3O_2 sur une entité monomérique et la perte de $C_2H_2O_2$ sur l'autre entité. Ce dimère qui est un biflavonoïde a déjà été isolé dans le duramen du sapin de Douglas [5].

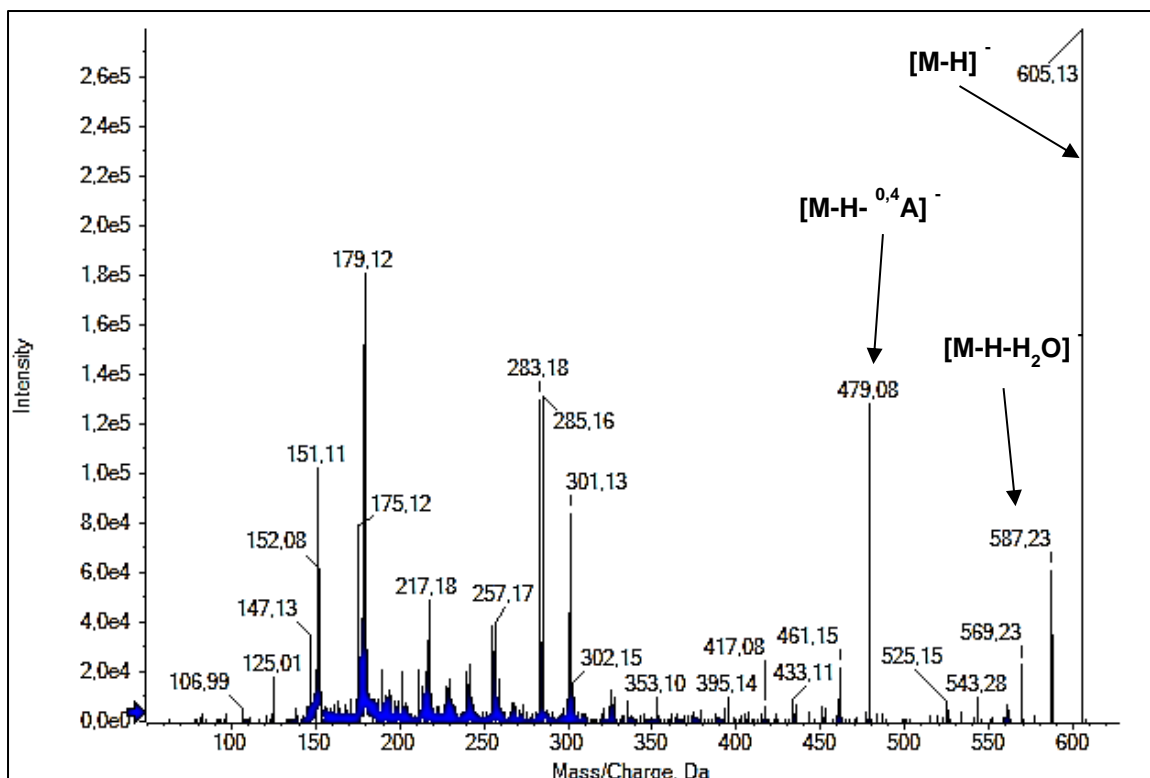


Figure 85 : Spectre MS/MS de la [5',5'']-bisdihydroquercétine.

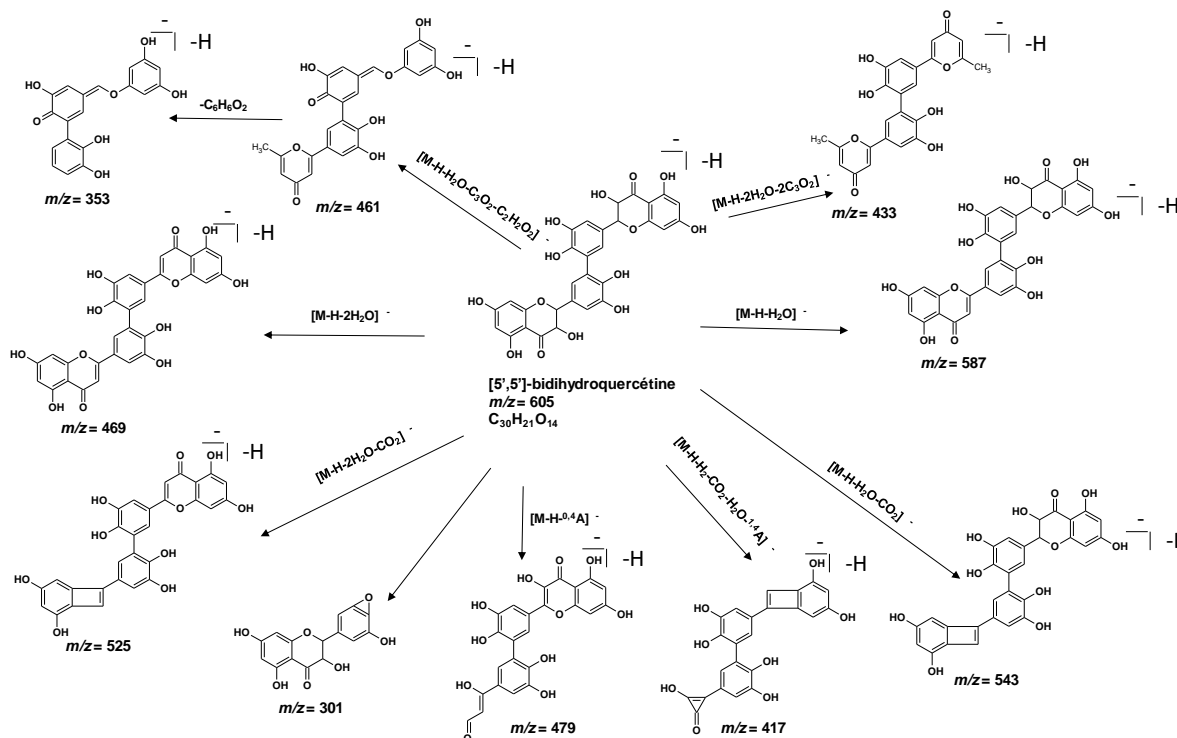


Figure 86 : Fragmentations caractéristiques de la [5',5'']-bisdihydroquercétine

Le composé présentant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ avec rapport $m/z = 603$ ($t_R = 18,12$ min) pourrait correspondre à un dimère de taxifoline et quercétine (P24) (figures 87 et 88). Il présente 2 uma de moins que la [5',5'']-bisdihydroquercétine et sur le spectre MS/MS plusieurs fragments ions relatifs au dimère présentent une différence de 2 uma (581, 541, 523). Ces fragments sont formés par les mêmes mécanismes décrits précédemment. Sur le spectre MS/MS, les ions les plus intenses sont $[M-H]^-$ (qui est majoritaire), $[M-H-H_2O-^{0,4}A]^-$ ($m/z = 477$) et $[M-H-H_2O]^-$ ($m/z = 585$). L'ion à m/z 477 est issu du départ de H_2O suivi de la rupture des liaisons 0 et 4 du cycle C de la taxifoline. La fragmentation qui a entraîné la formation de l'ion à m/z 585 peut être due à une perte de H_2O à partir du cycle C de la taxifoline. La fragmentation à m/z 449 $[M-H-H_2O-2C_3O_2]^-$ est produite par la perte de C_3O_2 à partir de l'ion à m/z 585. L'ion radical à m/z 300 correspond à la sous unité quercétine obtenue après une rupture radicalaire de la liaison C-C aromatique. Le fragment ion à m/z 293 correspond à la même sous unité obtenue par une réaction non radicalaire. La perte d'un CO à partir de l'ion à m/z 299 conduit à la formation de l'ion à m/z 271. On observe également des ions fragments peu intenses dont les rapports m/z (151, 179 et 193) sont caractéristiques à la quercétine[120]. Cependant, la structure de ce composé n'a pas été confirmée car elle n'a pas été retrouvée dans la littérature.

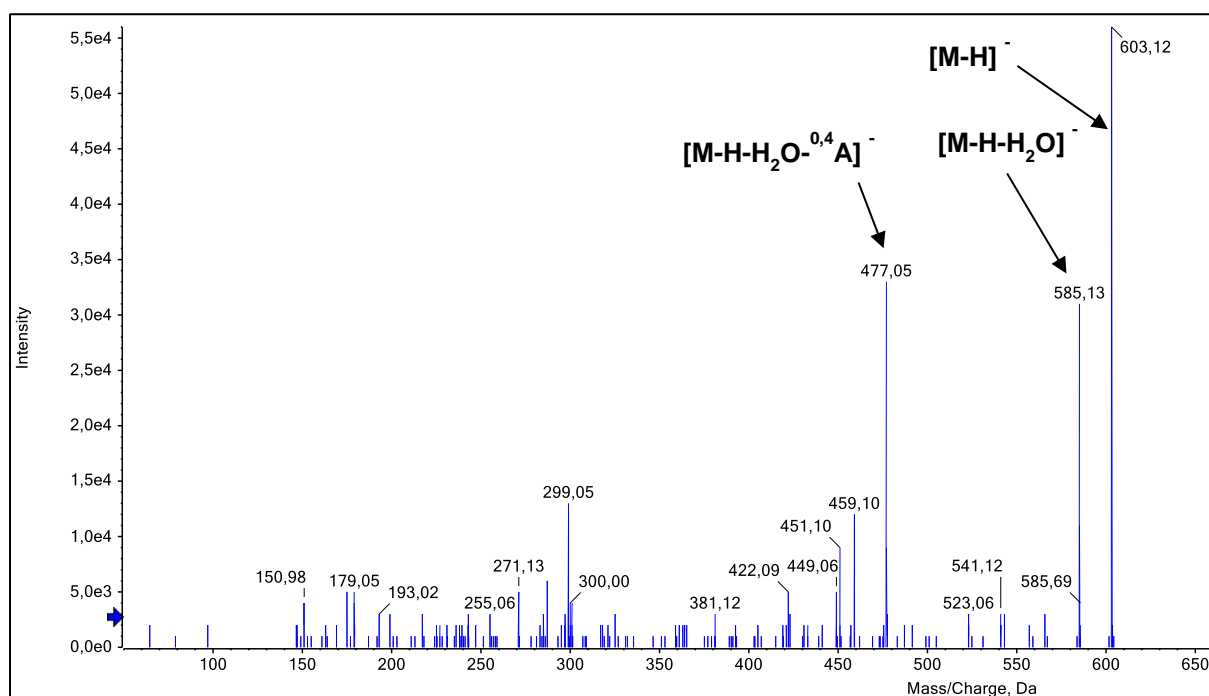


Figure 87 : Spectre MS/MS du dimère de taxifoline et quercétine.

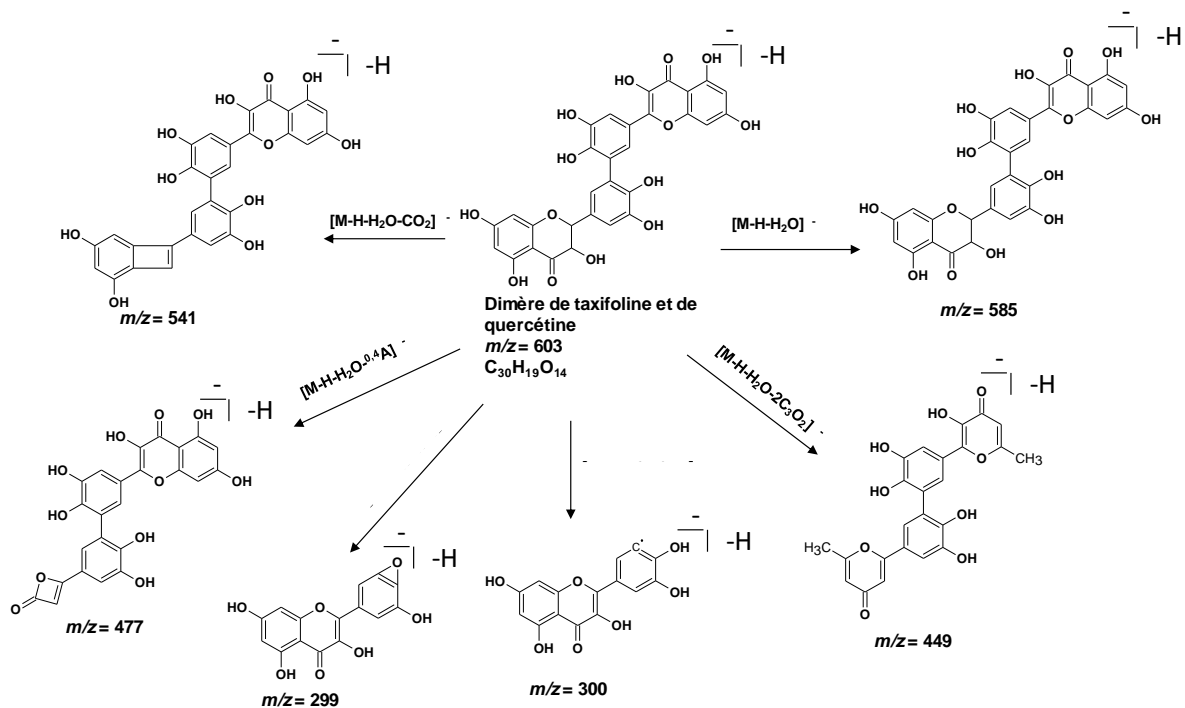


Figure 88 : Fragmentations caractéristiques du dimère de taxifoline et quercétine.

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire présente un rapport m/z 633 ($t_R = 16,72$ min) correspond à un dimère de dihydroisorhamnétine ou méthyltaxifoline appelé [5',5'']-bisdihydroisorhamnétine (P25) (figures 89 et 90). Sur le spectre MS/MS, le pic de base est observé à $m/z = 311$. Il est généré par la perte d'un des monomères et d'une molécule d'eau sur l'un des cycles C. Des fragments caractéristiques ont été détectés à m/z 329 et 285. L'ion fragmenté à m/z 329 a été généré par le clivage des liaisons 2 et 3 du cycle C de chaque unité monomère et correspondait à deux ions $[^{2,3}B]^-$ liés par une liaison aromatique C-C. D'autres ions fragments ont été observés à m/z 241, 225, 177 et 151. Sur le spectre MS / MS, des ions fragments entre l'ion pseudomoléculaire à m/z 633 et l'ion à m/z 329 sont observés avec des intensités très faibles et ne peuvent pas être détectés. Ce qui suggère que le clivage de la méthyltaxifoline liée par une liaison aromatique C-C avec une autre entité s'est produite avec des fragmentations supplémentaires contrairement à ce qui est observé pour d'autres dérivés de taxifoline (dimères et flavolignanes).

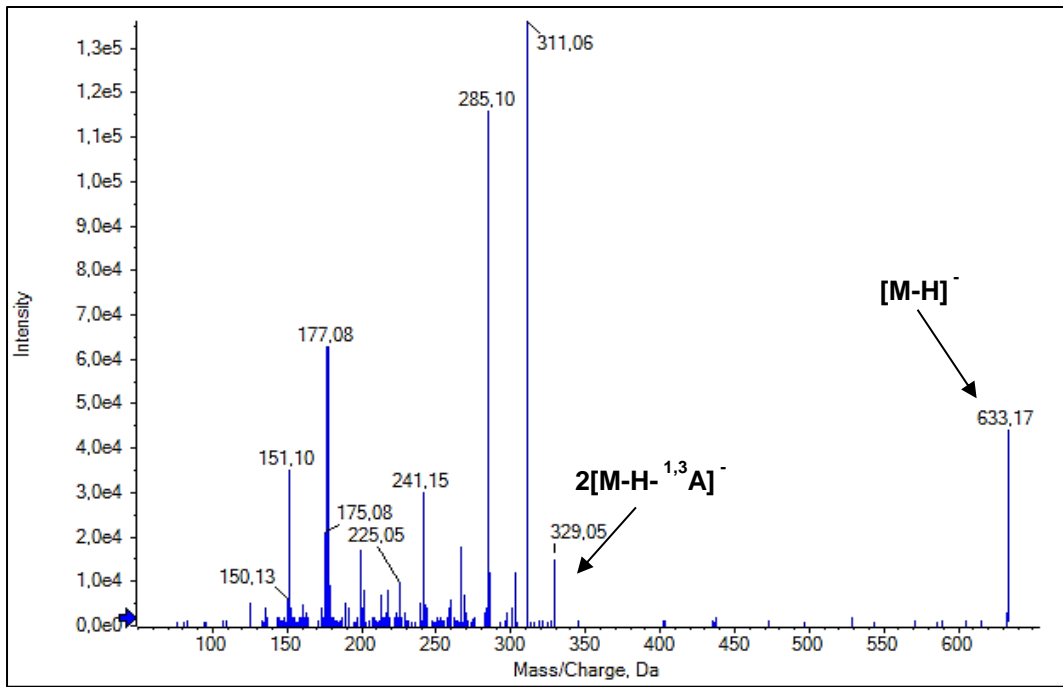


Figure 89 : Spectre MS/MS du [5',5'']-bisdihydroisorhamnétine.

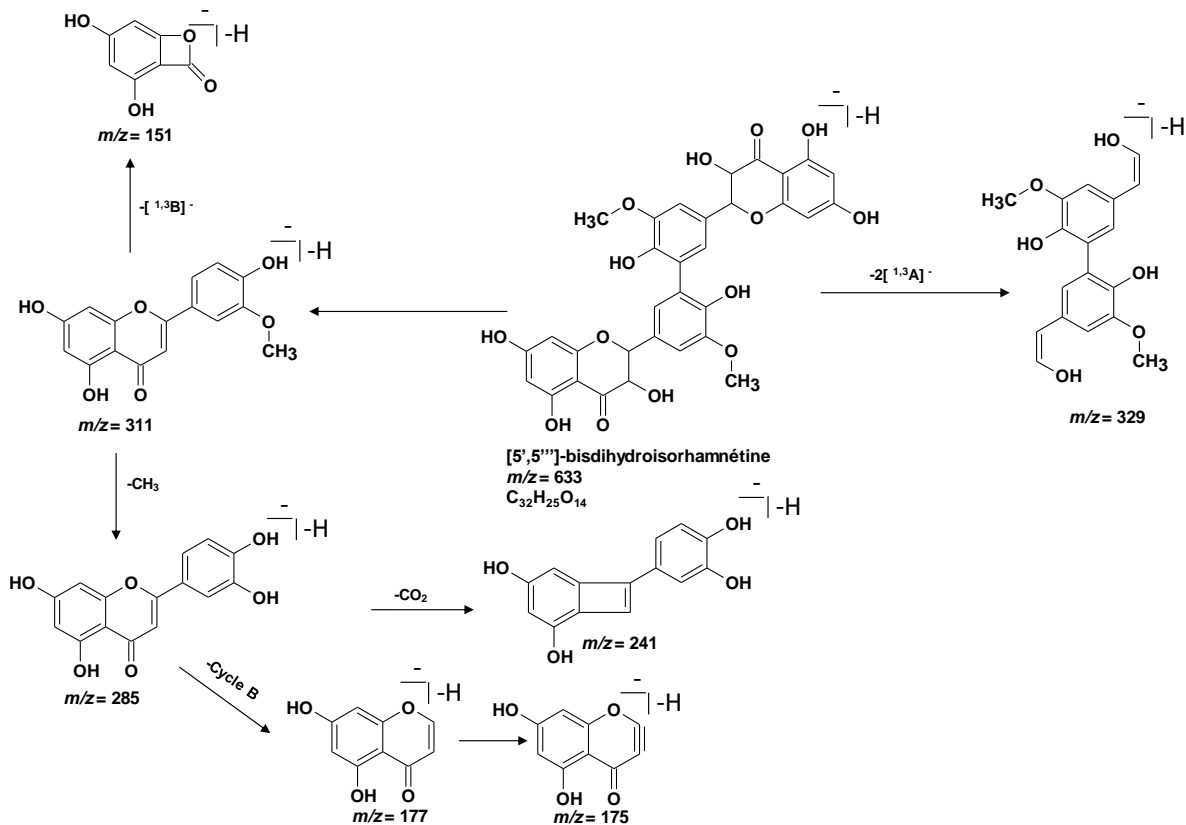


Figure 90 : Fragmentations du [5',5'']-bisdihydroisorhamnétine.



IV.2.1.2. Bilan des composés identifiés dans l'extrait de duramen

Les résultats de l'analyse de l'extrait du duramen ont permis d'identifier 13 métabolites. Les flavonoïdes constituent le groupe de métabolites prédominant (tableau 6). Parmi tous les flavonoïdes identifiés, c'est uniquement la taxifoline-7,3'-diméthyléther [124] qui n'a pas été décrit dans le sapin de Douglas. Deux composés dont les structures chimiques ont été proposées sont inclus dans les composés identifiés (tableau 8). Ces composés n'ont pas été retrouvés dans la littérature mais sont des dérivés de flavonoïdes. Il s'agit d'un dimère formé par la taxifoline et la quercétine, et du [5',5''']-bisdihydroisorhamnétine qui est un dimère qui dérive de la dihydroisorhamnétine. Les autres composés détectés sont présents en annexe (annexe 2).

Tableau 6 : Composés identifiés dans l'extrait du duramen

t_R (min)	[M-H]⁻ (m/z)	Composé identifié
12,37	465	Taxifoline-3'-O-glucoside
13,94	285	Kaempférol
13,85	303	Taxifoline
14,02	303	Taxifoline
14,11	303	Taxifoline
14,37	303	Taxifoline
15,34	605	[5',5''']-bisdihydroquercétine
15,51	287	Dihydrokaempferol
15,59	288	Non identifié
15,94	317	3-Methyltaxifoline
16,46	605	[5',5''']-bisdihydroquercétine
16,72	633	[5',5''']-bisdihydroisorhamnétine
16,89	287	Dihydrokaempferol
16,98	301	Quercétine
17,07	605	[5',5''']-bisdihydroquercétine
17,34	331	Taxifoline-7,3'-diméthyléther
18,12	603	Dimère de taxifoline et quercétine
18,55	271	Pinobanksine
19,52	603	Dimère de taxifoline et quercétine
22,39	255	Pinocembrine
30,67	299	Acide 9-hydroxy-10,12,15-octadécatriénoïque

IV.2.2. Fractions

L'exploitation des résultats de l'analyse en LC-MS/MS des fractions du duramen a abouti à l'identification de plusieurs composés. Cela concerne uniquement les composés qui ont été exclusivement identifiés dans les fractions car certains métabolites sont également présents dans l'extrait de duramen ou dans l'aubier (extraits et fractions).



IV.2.2.1. Flavonoïdes

IV.2.2.1.1. Dihydroflavonols

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire présente un rapport m/z 435 ($t_R = 12,53$ min) a été identifié comme étant un flavonoïde glycosylé (P26) (figures 91 et 92) [169]. Sur le spectre MS/MS du composé, on observe un ion majoritaire à m/z 285 qui est caractéristique à la taxifoline. La plupart des ions dont les rapports m/z sont inférieurs à 285 sont également issus de la fragmentation de la taxifoline (241, 217, 199, 177, 152 et 125). L'ion peu intense à m/z 303 est formé par une perte de 132 uma qui indique la présence d'un pentose. On observe également un ion fragment à m/z 417 généré par une perte de H_2O survenue sur le flavonoïde glycosylé. Cette fragmentation permet de confirmer que la *O*-glycosylation ne réalise pas au niveau du carbone 3 car si c'était le cas, la perte de H_2O n'aurait pas eu lieu. La *O*-glycosylation au niveau du carbone 3' de la taxifoline a été suggérée parce que les flavonoïdes retrouvés dans le bois de Douglas sont généralement *O*-glycosylés sur ce carbone [7]. Cela a permis d'identifier le composé comme étant une taxifoline-3'-*O*-pentoside. La nature du composé n'a pas été définie par les seules données MS/MS.

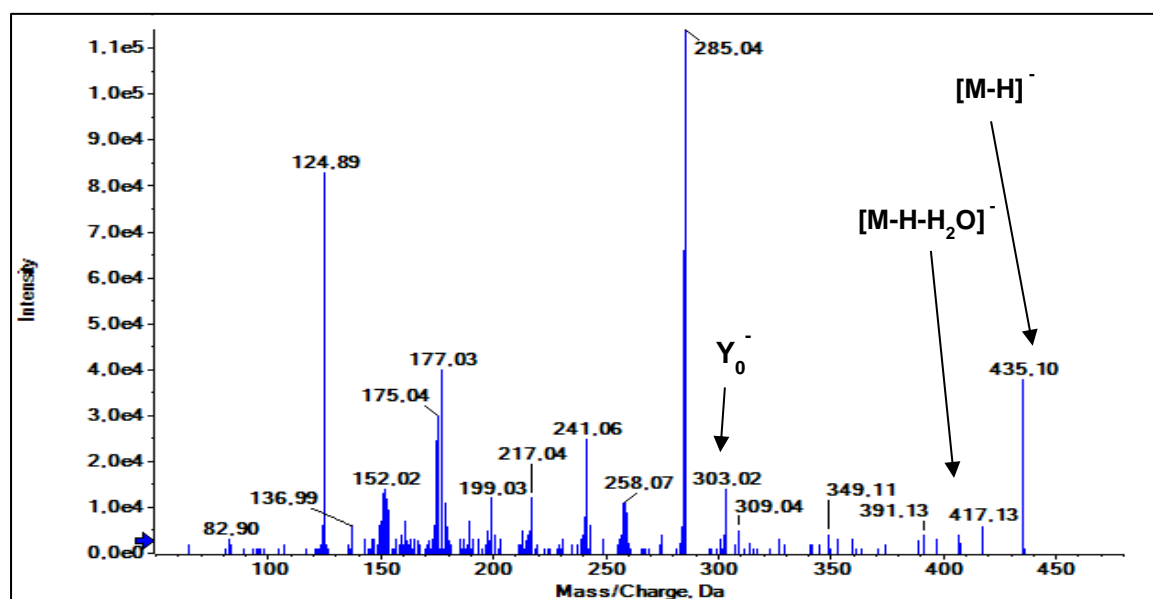


Figure 91 : Spectre MS/MS de la taxifoline-3'-*O*-pentoside.

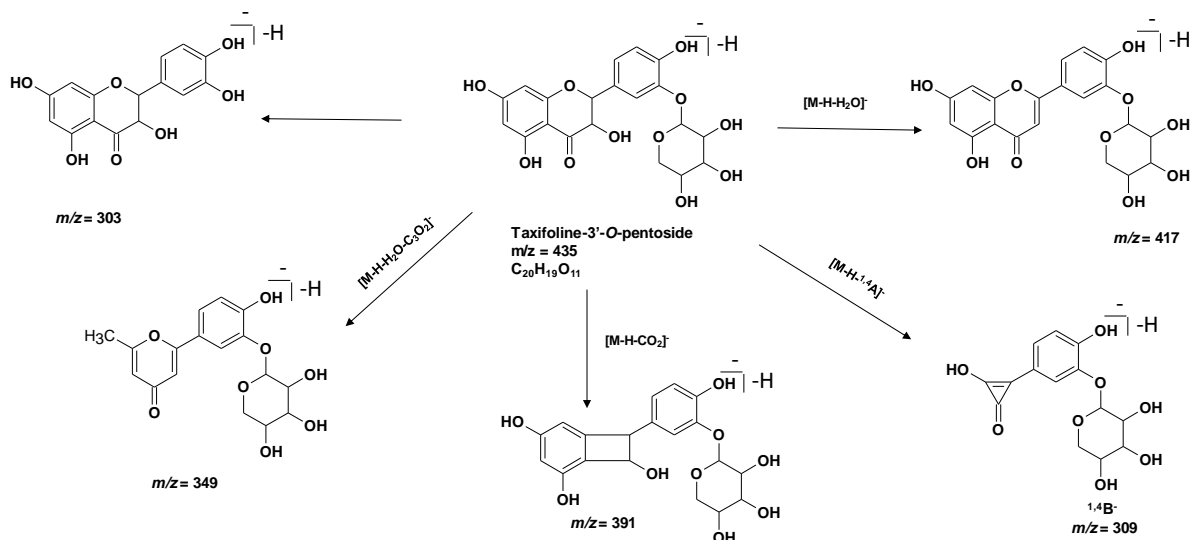


Figure 92 : Fragmentations caractéristiques de la taxifoline-3'-O-pentoside.

IV.2.2.1.2. Flavanone

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire (P27) $[M-H]^-$ possède un rapport m/z 287 ($t_R = 16,26$ min) a été identifié comme étant l'ériodictyol [120] (figures 93 et 94). Sur le spectre MS/MS, le pic de base est observé à m/z 135 correspondant à l'ion $^{1,3}B^-$. Un autre ion intense à m/z 151 $[^{1,3}A]^-$ est observé. Ce dernier est produit par la perte du cycle B après la rupture des liaisons situées entre les carbones 1 et 3 du cycle C. L'ion à m/z 107 $[^{1,2}A-CO-CO_2]^-$ est généré par la rupture des liaisons 1 et 2 du cycle C entraînant les pertes de CO, CO₂ et du cycle B.

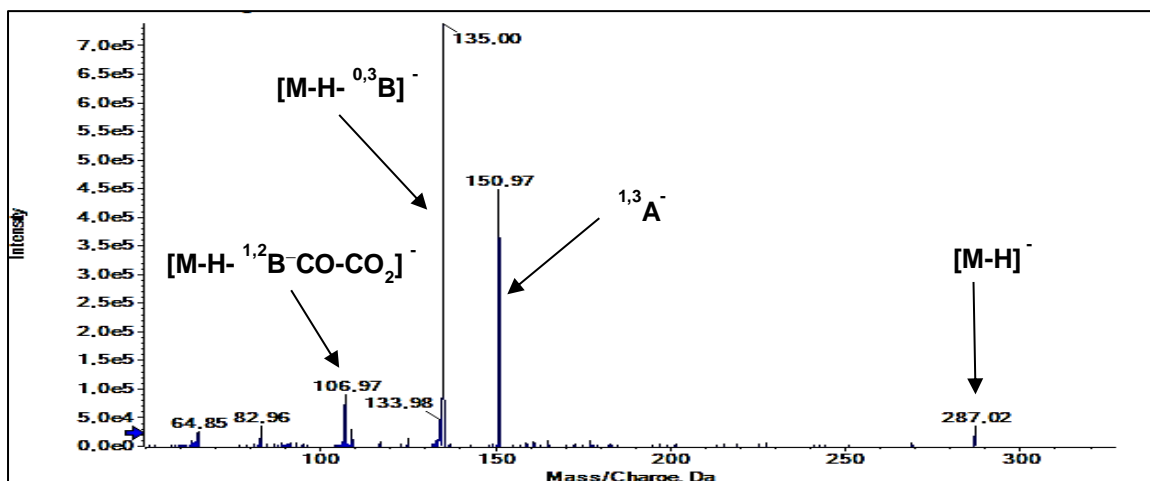


Figure 93 : Spectre MS/MS de l'ériodictyol.

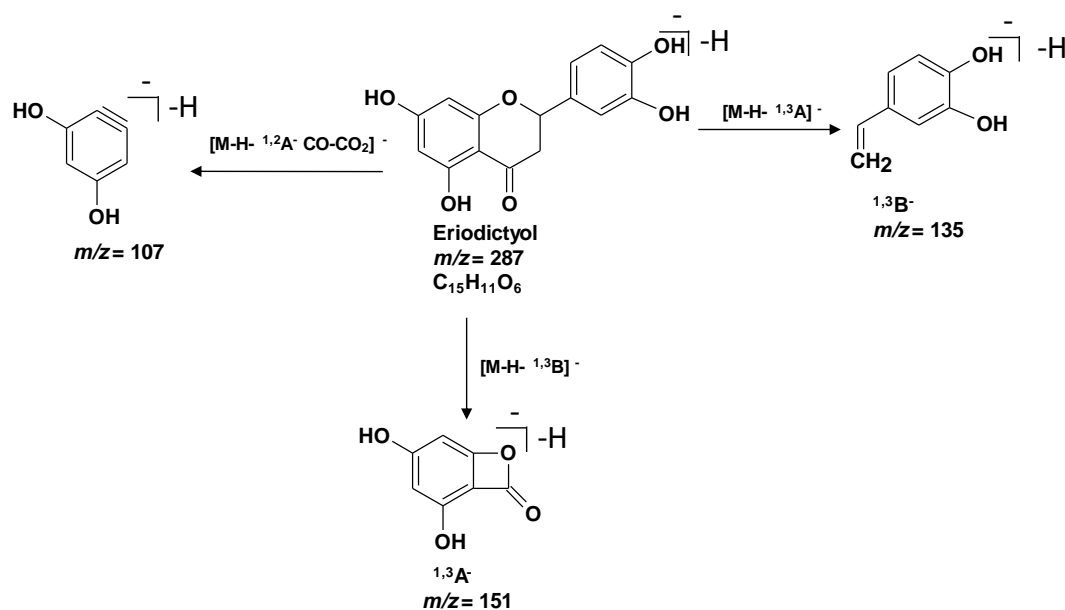


Figure 94 : Fragmentations de l'ériodictyol.

IV.2.2.1.3. Biflavonoïde

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire présente un rapport m/z 575 ($t_R = 13,08$ min) a été identifié comme étant le fisétinidol-4,6-taxifoline (P28) [130] (figures 95 et 96). Ce composé est un biflavonoïde composé d'une molécule de la classe des flavan-3-ols appelée fisétinidol lié à la taxifoline. L'ion majoritaire à m/z 285 indique de la présence de la taxifoline. Cela est confirmé par la présence des fragments caractéristiques de la taxifoline : 303, 217, 175 et 125 caractéristiques à la taxifoline (cf fragmentations de la taxifoline). La perte du fisétinidol entraîne la formation de l'ion à m/z 303. Cela permet de justifier la nature du composé identifié. L'ion observé à m/z 557 provient du départ de H_2O à partir de la taxifoline. La perte de H_2O est favorisée au niveau de la taxifoline à cause de l'encombrement stérique qui empêche la réalisation de cette fragmentation sur le fisétinidol. L'ion à m/z 547 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$ est produit par la perte de CO au sein du cycle C de la taxifoline. L'ion à m/z 397 $[\text{M}-\text{H}-1,4\text{A}]^-$ est généré par la rupture des liaisons 1 et 4 du cycle C de la taxifoline entraînant la perte de ce dernier.



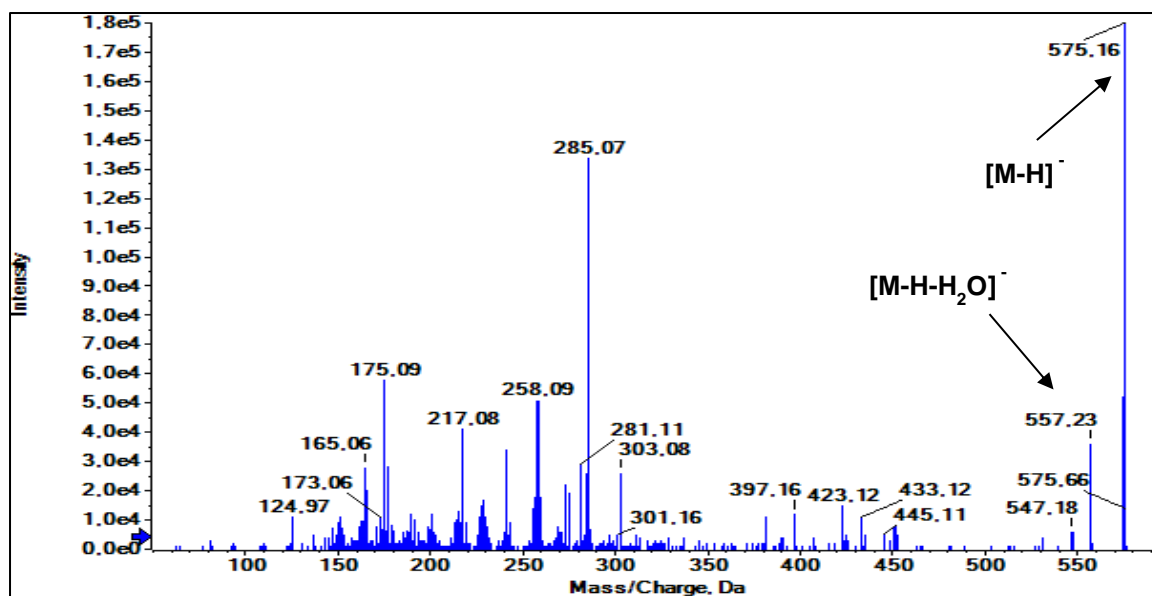


Figure 95 : Représentation du spectre MS/MS du composé à 13,08 min.

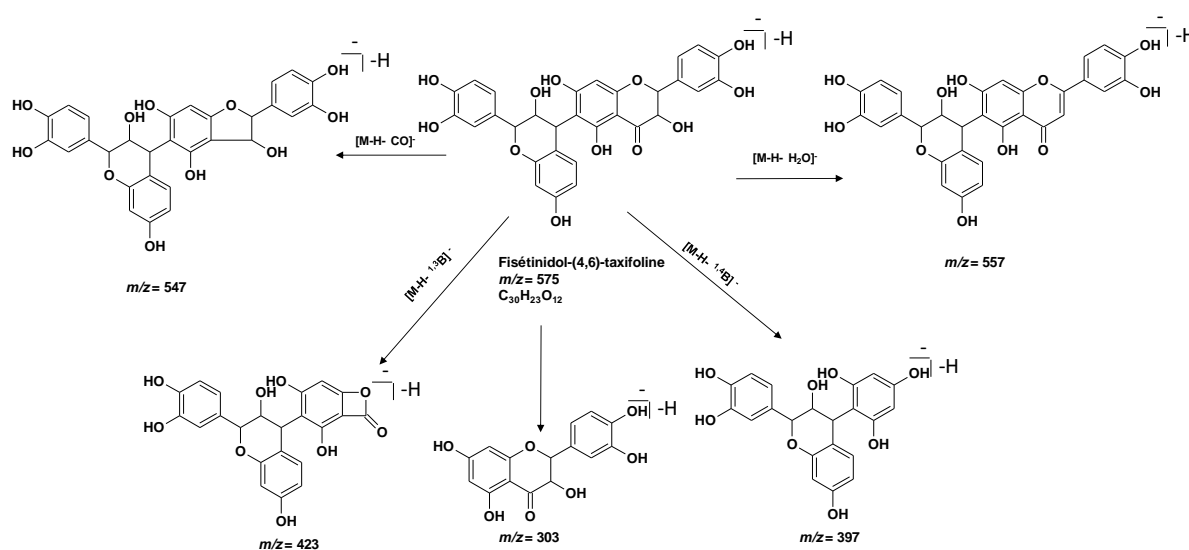


Figure 96 : Fragmentations caractéristiques du fisétinido(4,6)-taxifoline.

IV.2.2.1.4. Dérivé d'acide phénylpropanoïque

Le coniférylacétate (P29) [150] a été identifié comme étant le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 221 à 15,71 min (figures 96 et 97). Au niveau du spectre MS/MS on observe un ion majoritaire à m/z 162 formé après les pertes consécutives du radical CH_3^\bullet substitué à l'un des hydroxyles portés par le cycle aromatique et de la fonction acétate ($-COCH_3$). On observe également un ion pseudomoléculaire intense

ainsi qu'un autre ion relativement intense à m/z 177 qui est produit par la perte de la fonction acétate.

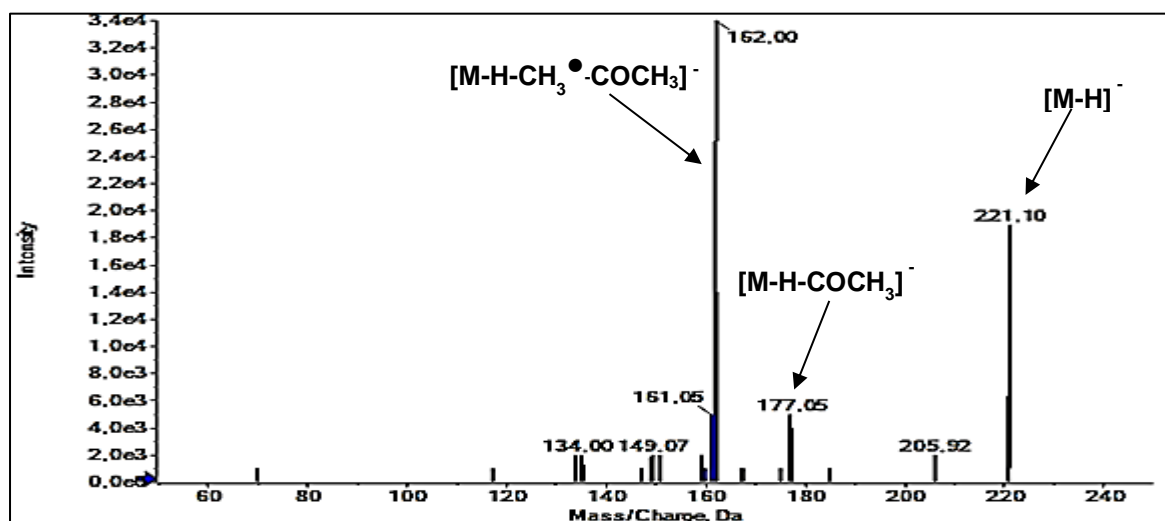


Figure 97 : Spectre MS/MS du coniferylacétate.

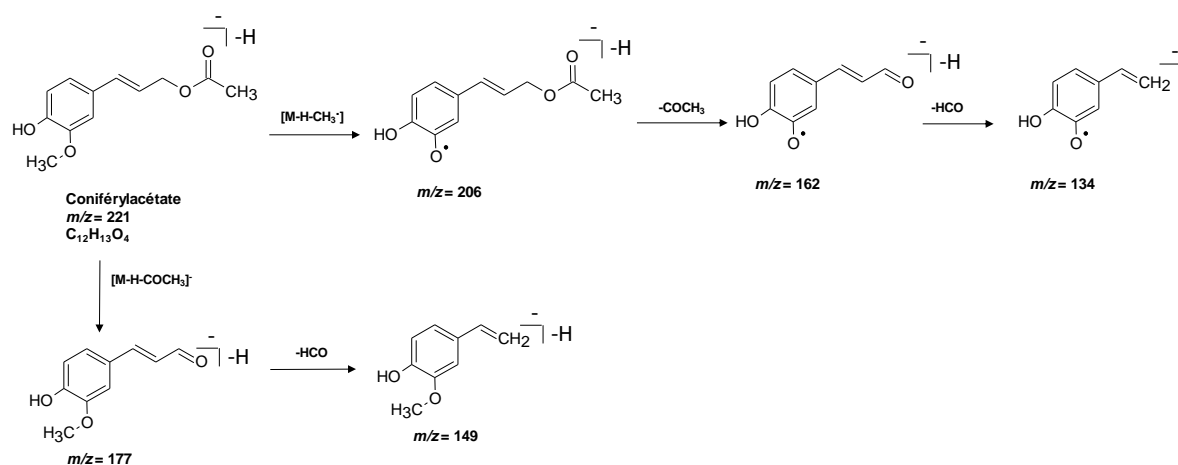


Figure 98 : Fragmentations du coniferylacétate.

IV.2.2.2. Flavonolignanes

Le pseudotsuganol (P29) correspond au composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z de 659 ($t_R = 17,04$ min). C'est un flavonolignane constitué d'une molécule de taxifoline liée à une molécule de pinorésinol (figures 99 et 100) [151]. En dehors de l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ qui est majoritaire, on observe d'autres ions comme celui à m/z 641 $[M-H-H_2O]^-$ produit par la perte de H_2O au niveau du cycle C de la région du flavonolignane correspondant à la taxifoline. L'ion à m/z 535 $[^{1,4}B]^-$ est généré par la rupture

des liaisons 1 et 4 du cycle C et entraîne la perte du cycle A. L'ion de rapport $m/z = 285$ caractéristique à la taxifoline est également présent. Cela indique qu'il y a eu une perte du pinorésinol formant l'ion à $m/z = 303$. Dans le spectre MS/MS d'autres ions caractéristiques de taxifoline dont les rapports m/z sont 177 et 241 sont également observés. L'ion fragment à $m/z = 313$ $[M-H-C_{15}H_{12}O_7-CH_2OH]^-$ est généré par la perte de la taxifoline associée à la rupture des liaisons C'8-C'9 et C'9O-C7 entraînant la perte de CH_2OH . Ce composé a été décrit dans l'écorce de bois de Douglas [151].

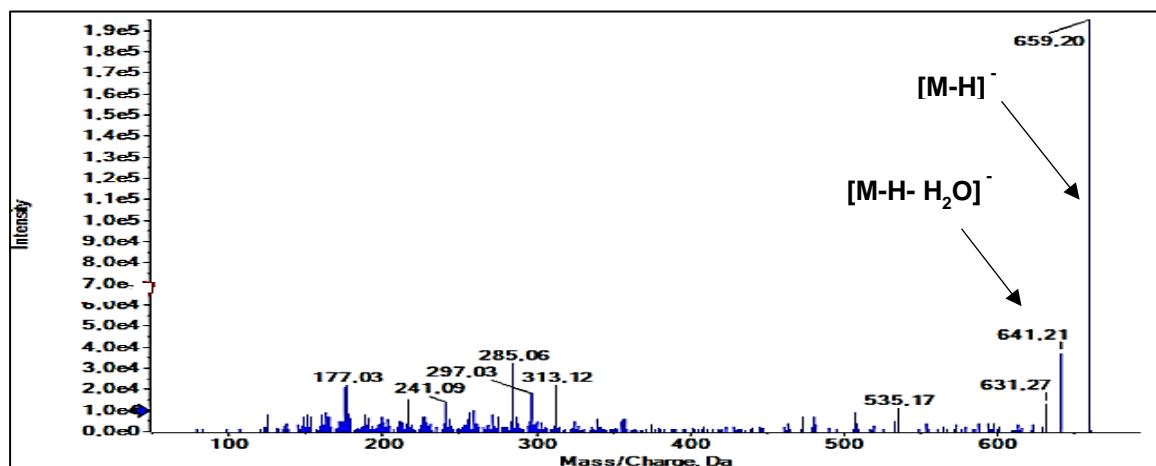


Figure 99 : Spectre MS/MS du pseudotsuganol.

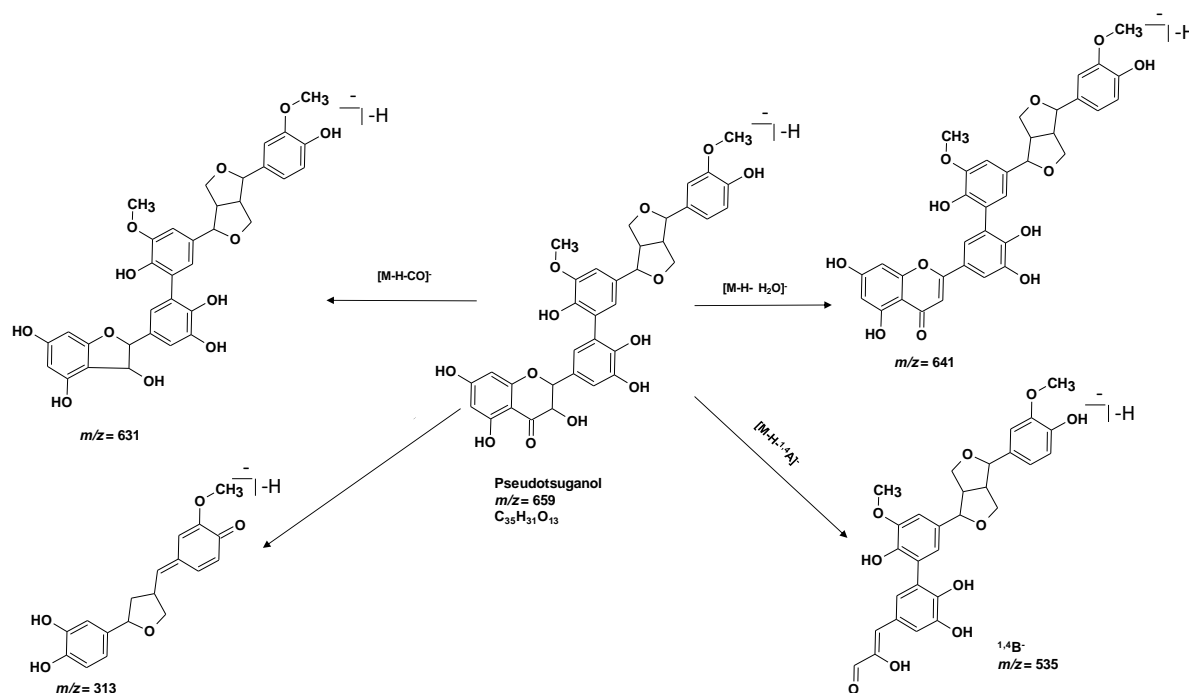


Figure 100 : Fragmentations caractéristiques du pseudotsuganol.

Le composé à 13,09 min dont l'ion pseudomoléculaire est à m/z 499 $[M-H]^-$ pourrait correspondre à un flavonolignane (P30) (figures 101 et 102). Sur le spectre MS/MS, le pic de base correspond au fragment ion à m/z 285 qui indique la présence de la taxifoline. Il en est de même pour l'ion à m/z 303 et pour la plupart des ions présentant des rapport m/z inférieur à 285. L'ion fragment à m/z 481 $[M-H-H_2O]^-$ est généré par la perte de H_2O au niveau du cycle C de la taxifoline tandis que celui à m/z 463 $[M-H-2H_2O]^-$ est formé par le perte de $2H_2O$ (sur le cycle C et au niveau carbone 7 du monolignol). L'ion à m/z 435 $[M-H-2H_2O-CO]^-$ est généré par les pertes consécutives de $2H_2O$ et de CO (sur le cycle C) et tandis que celui à m/z 419 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$ est produit par les pertes successives de $2H_2O$ et de CO_2 (sur cycle C). L'ion à m/z 375 $[M-H-H_2O-^{0,4}A]^-$ est généré par la rupture des liaisons 0 et 4 du cycle C associée aux pertes de H_2O et du cycle A de la taxifoline tandis que que celui à m/z 321 $[M-H-^{1,2}A-CH_3]^-$ est formé par la rupture des liaisons 1 et 2 du cycle C associée aux pertes de CH_3 et du cycle A. La structure de ce composé n'a pas été confirmée car elle n'a pas été décrite dans la littérature. Il est constitué d'une unité taxifoline et d'une unité de guaiacylglycérol.

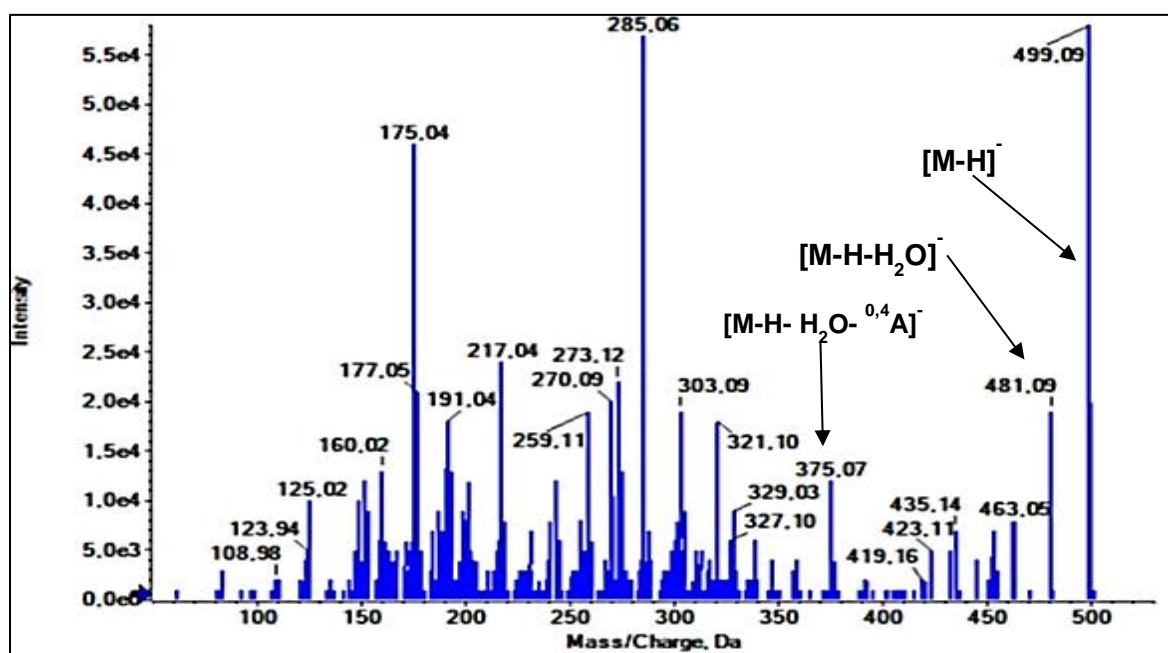


Figure 101 : Spectre MS/MS du composé à m/z 499.

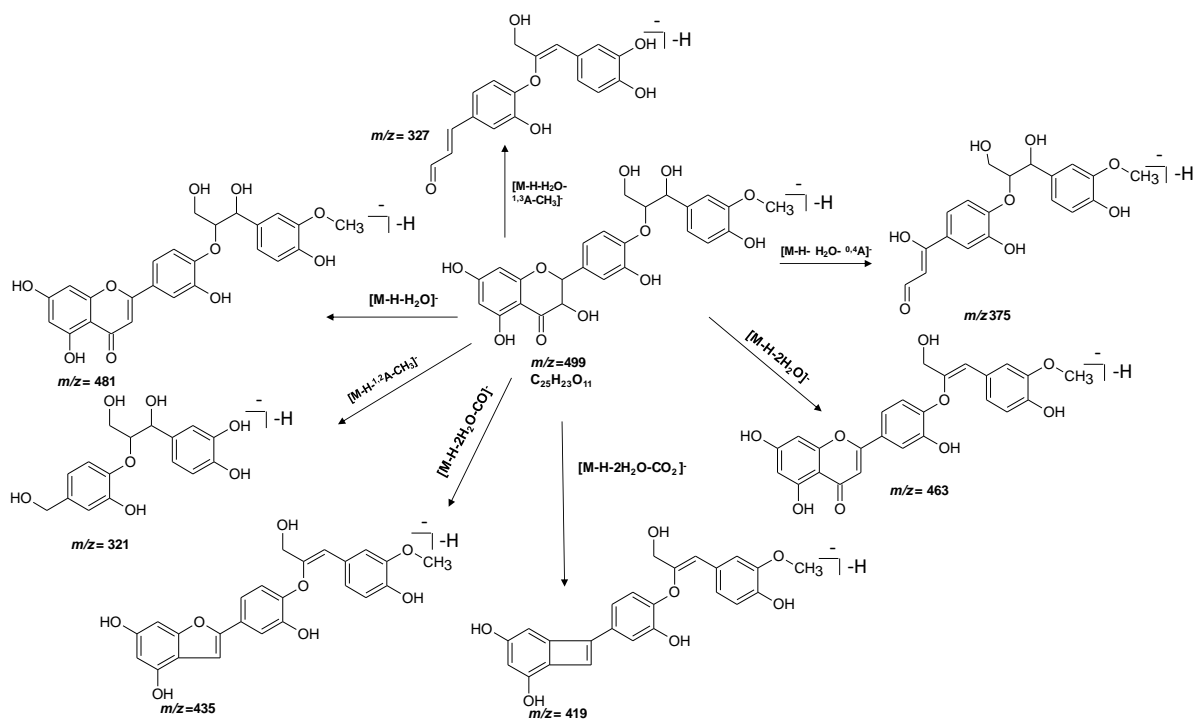


Figure 102 : Fragmentations caractéristiques du composé à m/z 499.

Le composé à 12,26 min dont l'ion pseudomoléculaire est à m/z 469 $[M-H]^-$ pourrait également correspondre à un flavonolignane (P31) (figures 103 et 104). Sur le spectre MS/MS, le pic de base correspond au fragment ion à m/z 285 qui indique la présence de la taxifoline. Il en est de même pour l'ion à m/z 303 et pour la plupart des ions présentant des rapport m/z inférieur à 285. L'ion fragment à m/z 451 $[M-H-H_2O]^-$ est généré par la perte de H_2O au niveau du cycle C de la taxifoline (m/z 303). L'ion à m/z 327 $[M-H-2H_2O-^{0,4}A]^-$ est généré par la rupture des liaisons 0 et 4 du cycle C (perte du cycle A) associée à la perte de $2H_2O$ dont l'un provient du carbone C_9 du monolignol. L'ion à m/z 345 $[^{1,4}B]^-$ est formé par la rupture des liaisons 1 et 4 du cycle C entraînant la perte du cycle A. Ce composé est constitué d'une unité taxifoline et d'une unité d'alcool dihydroconiférylique. La structure de ce composé n'a pas été confirmée car elle n'a pas été décrite dans la littérature.

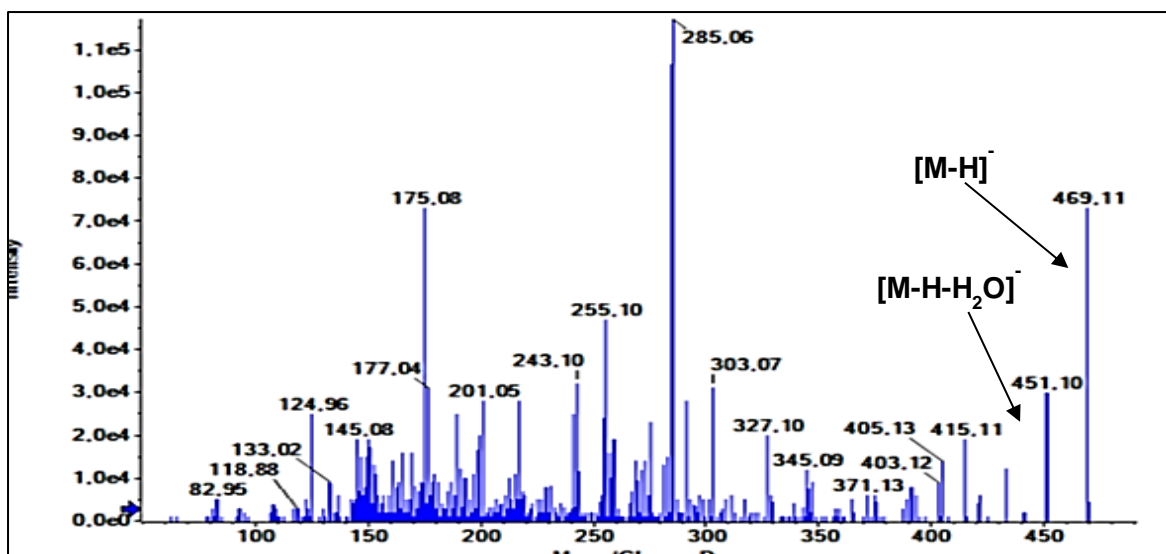


Figure 103 : Spectre MS/MS du composé à m/z 469.

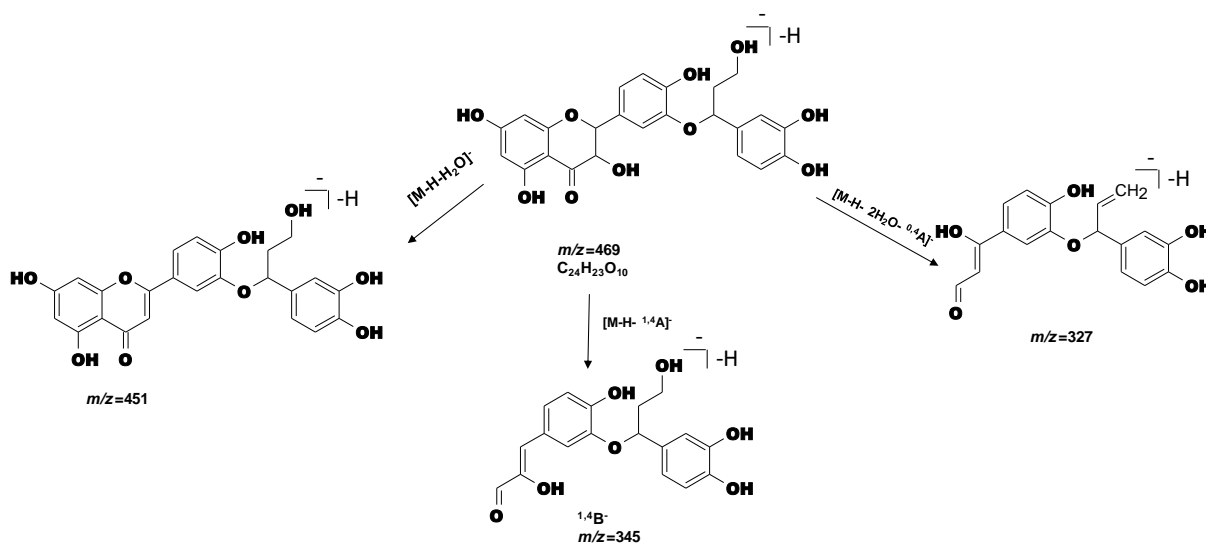


Figure 104 : Fragmentations caractéristiques du composé à m/z 469.

IV.2.2.3. Terpènes

IV.2.2.3.1. Sesquiterpènes

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 251 ($t_R = 23,13$ min) a été identifié comme étant l'acide todomatuique (P32) (figures 105 et 106) [152]. L'ion majoritaire possède un rapport m/z de 207 et est généré par la décarboxylation qui se produit au niveau du carbone 1. En dehors de l'ion pseudomoléculaire à m/z 251 $[M-H]^-$, les autres ions intenses sont ceux qui sont à m/z 125 et 99. L'ion à m/z 99 est formé après la rupture de la liaison situées entre les carbones 2' et 3' tandis que le second à $m/z = 125$ est généré après le clivage de la liaison située entre les carbones 1' et 4. Ces deux fragmentations sont caractéristiques aux sesquiterpènes dérivés de la juvabione comme l'acide todomatuique [153]. Ce composé à été décrit dans le duramen du bois de Douglas [152].

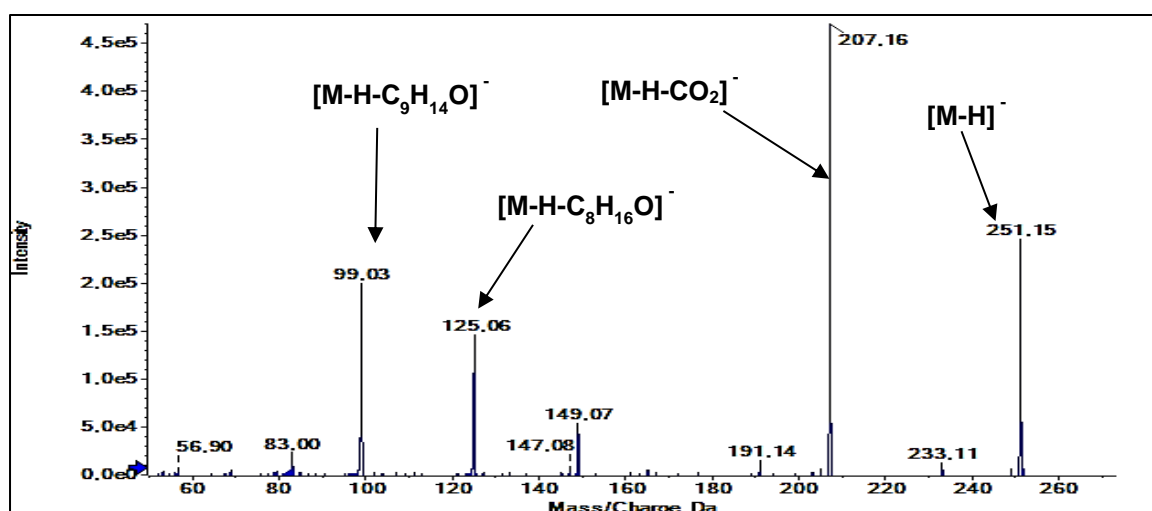


Figure 105 : Spectre MS/MS de l'acide todomatuique.

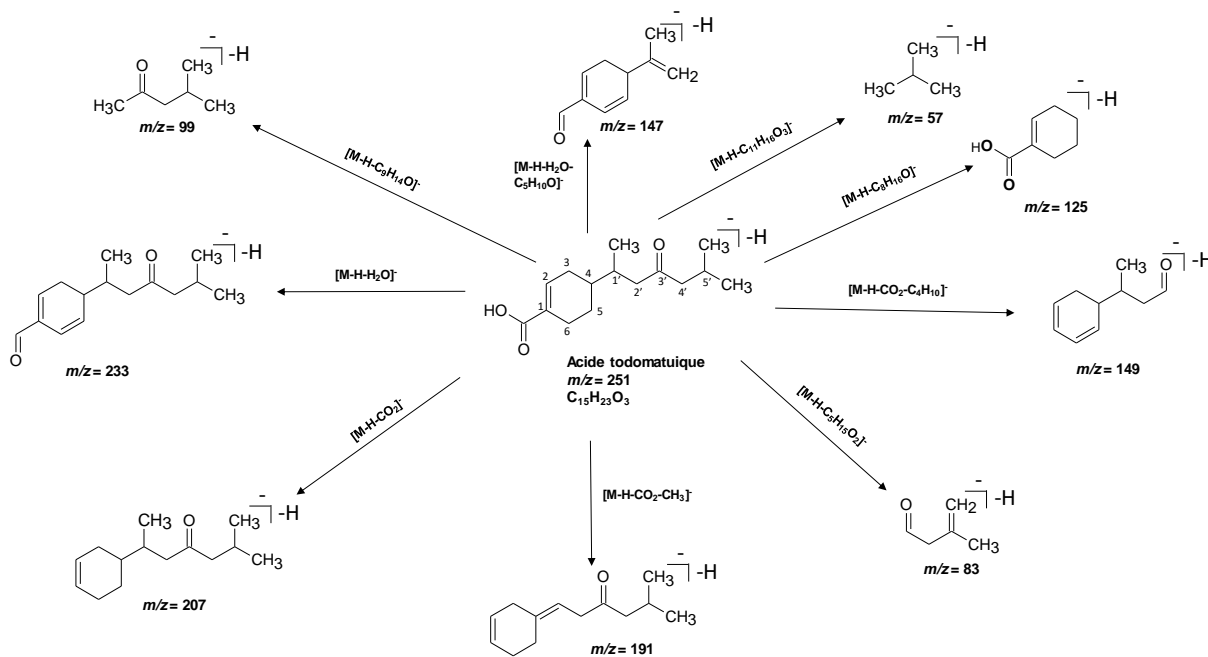


Figure 106 : Fragmentations de l'acide todomatique.

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 253 à 24,64 min correspond à l'acide dihydrotodomatique (P33) [153] (figures 107 et 108). Sur le spectre MS/MS, $[M-H]^-$ est le seul ion intense parmi les 4 ions observés. Le départ de H_2O au niveau de la fonction acide carboxylique lié au carbone 1 à entrainé la formation de l'ion à m/z 235. La perte de la fonction acide par décarboxylation produit l'ion à m/z 209. La rupture de la liaison située entre les carbones 3' et 4' de la chaîne aliphatique linéaire combinée à la perte de la fonction acide par décarboxylation entraine la formation de l'ion à m/z 151. Ce composé a été isolé dans le duramen du bois de Douglas [153].

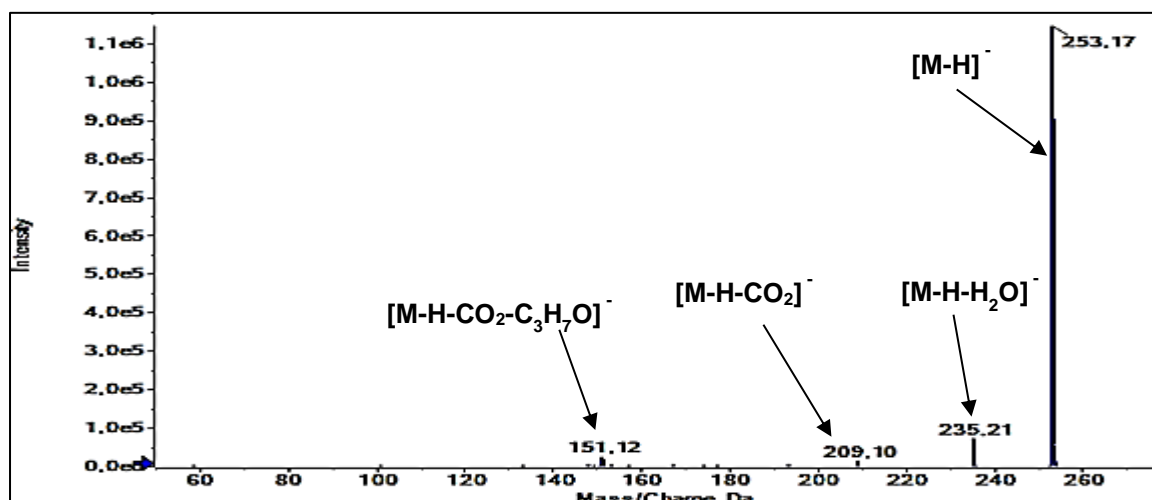


Figure 107 : Spectre MS/MS de l'acide dihydrotodomatique.

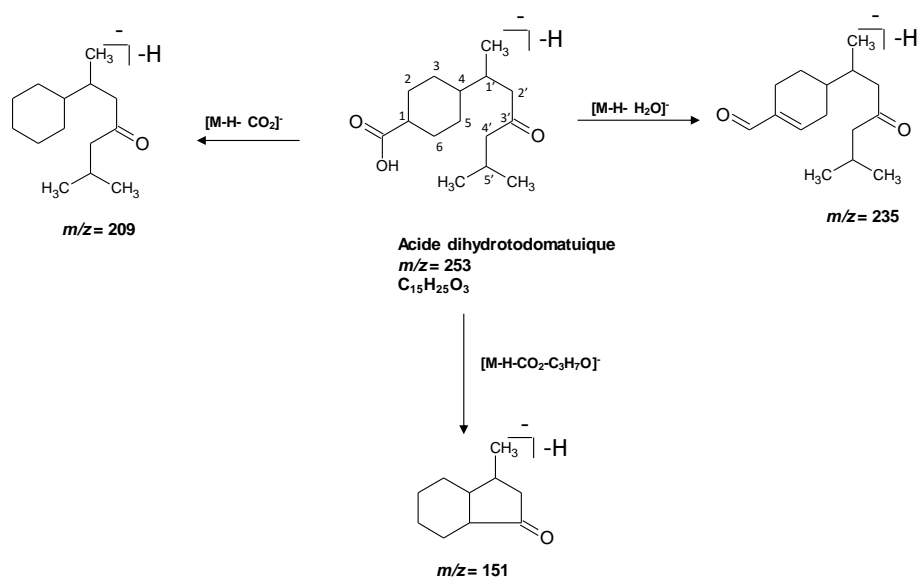


Figure 108 : Fragmentations de l'acide dihydrotodomatique.

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire présente un rapport m/z 235 ($t_R = 20,24$ min) a été identifié comme étant le pseudotsugonal (P34) [152] (figures 109 et 110). Le pic de base qui est à m/z 135 est produit par la perte d'une partie de la chaîne carbonée aliphatique après la rupture de la liaison située entre les carbones 1' et 2'. La chaîne carbonée éliminée forme l'ion à m/z 99. Ce composé a été décrit dans le duramen du bois de Douglas [153].

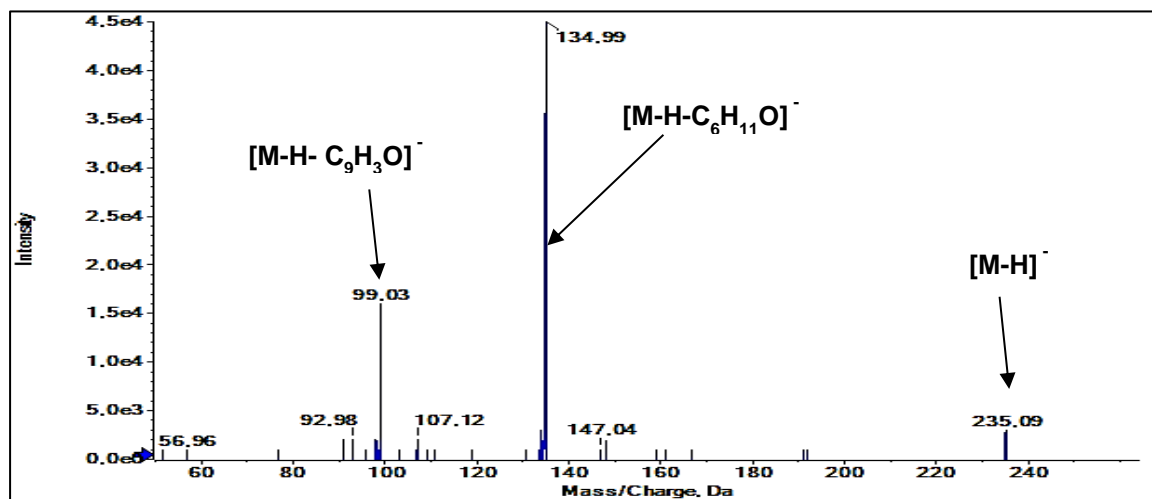


Figure 109 : Spectre MS/MS du pseudotsugonal.

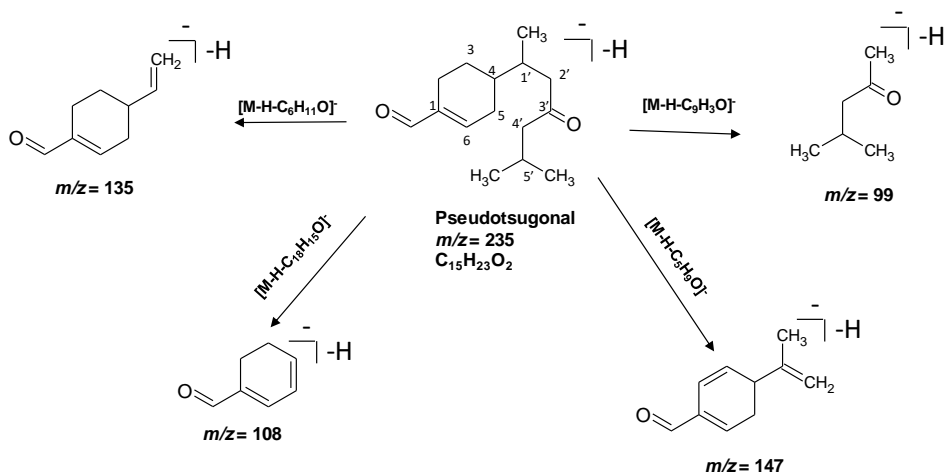


Figure 110 : Fragmentations du pseudotsugonal.

Le composé avec un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ possédant un rapport $m/z = 265$ à 20,50 min semble correspondre à la juvabione (P35) [154] en raison de son temps de rétention et de l'intensité élevée des ions fragments dont les rapports m/z sont compris entre 99 et 92 (figures 111 et 112). Cependant, la quantité élevée d'ions observés sur le spectre MS/MS ainsi que la présence d'ions dont les rapports m/z sont 177, 193 et 221 montrent qu'il pourrait également correspondre à un dérivé de l'acide férulique.

Si la juvabione (figure 112) est considérée comme le composé identifié, sur le spectre MS/MS le pic de base correspond au fragment ion à m/z 95 généré par la perte de la fonction ester ($C_2H_4O_2$) en C_1 associée la perte du CH_3 en $C_{1'}$ et à la rupture de la liaison $C_{1'}-C_{2'}$ entraînant la perte de la chaîne carbonée linéaire ($C_6H_{12}O$). L'ion à m/z 99 $[M-H-C_{10}H_{16}O_2]^-$ est généré par la rupture de la liaison $C_{1'}-C_{2'}$ entraînant la perte du cycle aromatique ($C_{10}H_{16}O_2$). L'ion à m/z 205 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$ est formé par la perte de la fonction ester ($C_2H_4O_2$) en C_1 . L'ion à m/z 193 $[M-H-CH_3-C_2H_4O_2]^-$ est formé par les pertes consécutives de la fonction ester en C_1 et de CH_3 en $C_{1'}$. L'ion à m/z 221 $[M-H-C_3H_8]^-$ est généré par la rupture des liaisons $C_4'-C_{5'}$ entraînant la perte d'une partie de la chaîne carbonée (C_3H_8). Les ions à m/z 93 et m/z 95 sont générés par la perte de la fonction ester en C_1 associée à la perte de CH_3 et à la rupture de la liaison $C_{1'}-C_{2'}$ entraînant la perte d'une partie de la chaîne carbonée linéaire ($C_6H_{12}O$). L'ion à m/z 165 $[M-H-C_6H_{12}O]^-$ est généré par la rupture de la liaison $C_{1'}-C_{2'}$ entraînant la perte d'une partie de la chaîne carbonée linéaire ($C_6H_{12}O$). L'ion à m/z 149 $[M-H-C_2H_4O_2-C_4H_9]^-$ est produit par la perte de la fonction ester associée à la rupture des liaisons $C_3'-C_{4'}$ entraînant la perte d'une partie de la chaîne carbonée linéaire ($C_6H_{12}O$). La

juvabione est un métabolite qui a été décrit dans les nœuds (zones d'insertion des feuilles ou d'aiguilles au niveau du tronc de l'arbre) de sapin de Douglas bois [155].

Si un dérivé de l'acide férulique (figure 112) est considéré comme le composé identifié, il est susceptible de correspondre au 2-hydroxybutylférulate en raison de la présence de l'ion intense à m/z 265 et des ions fragments générés à m/z 247 [M-H-H₂O]⁻, 221[M-H-C₂H₄O]⁻. Les ions Fragment à m/z 193, 177, 165, 149 et 121 indique la présence d'un groupe acide férulique. Le pic de base a été observé à m/z 95.

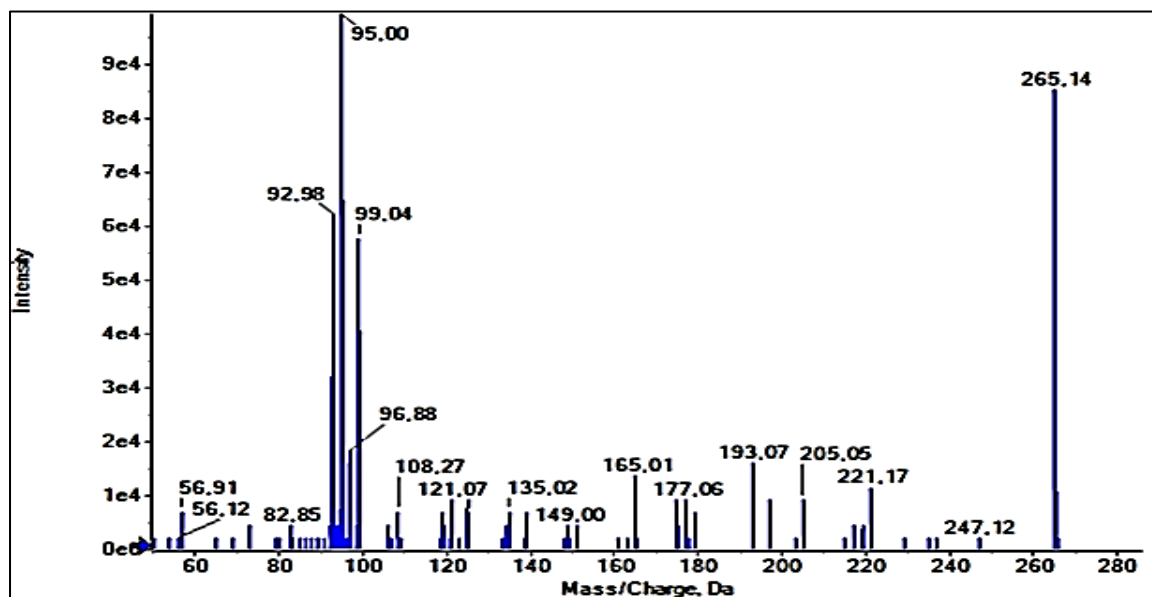


Figure 111 : Spectre MS/MS du composé à 20,50 min.

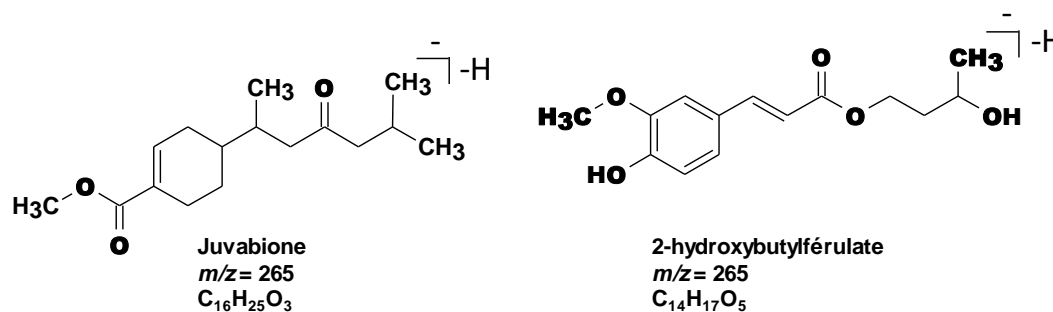


Figure 112 : Structures de la juvabione et du 2-hydroxybutylférulate.

IV.2.2.3.2. Diterpène

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire présente un rapport m/z 299 [M-H]⁻ ($t_R = 17,98$ min) a été identifié comme étant le 3,18-dihydroxyabieta-7-ène (P36) (figures 113 et 114) [156]. Sur le spectre MS/MS le pic de base correspond à l'ion pseudomoléculaire à m/z

299 $[M-H]^-$. L'ion à m/z 271 $[M-H-CO]^-$ est généré par perte de CH_2OH . L'ion à m/z 227 $[M-H-C_3H_7]^-$ est formé par la perte du groupe isopropyl au niveau du carbone 13 sur le cycle C du composé. L'ion à m/z 209 $[M-H-C_3H_7-H_2O]^-$ est formé par les pertes consécutives du groupe isopropyl sur le cycle C et de H_2O sur le cycle A. L'ion à m/z 253 $[M-H-CH_2OH-CH_3]^-$ est généré par les pertes consécutives de CH_2OH et CH_3 au niveau du cycle A. L'ion à m/z 163 est produit par la rupture des liaisons C_9-C_{10} et C_7-C_8 du cycle B entraînant la perte du cycle C. La structure de ce composé a été proposée car elle n'a pas été répertoriée dans la littérature.

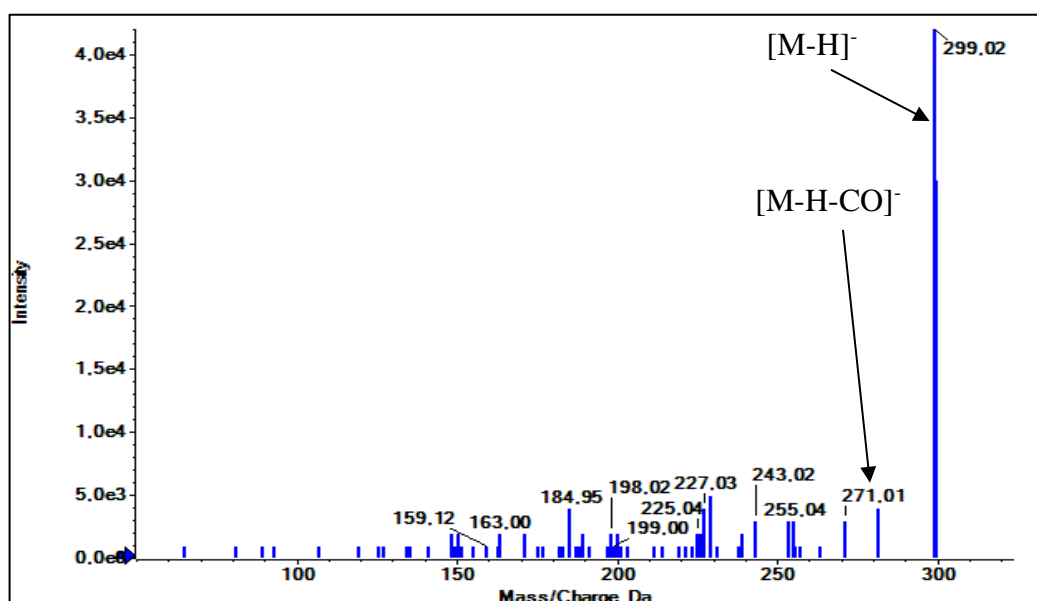


Figure 113 : Spectre MS/MS du 3,18-dihydroxyabieta-7-ène.

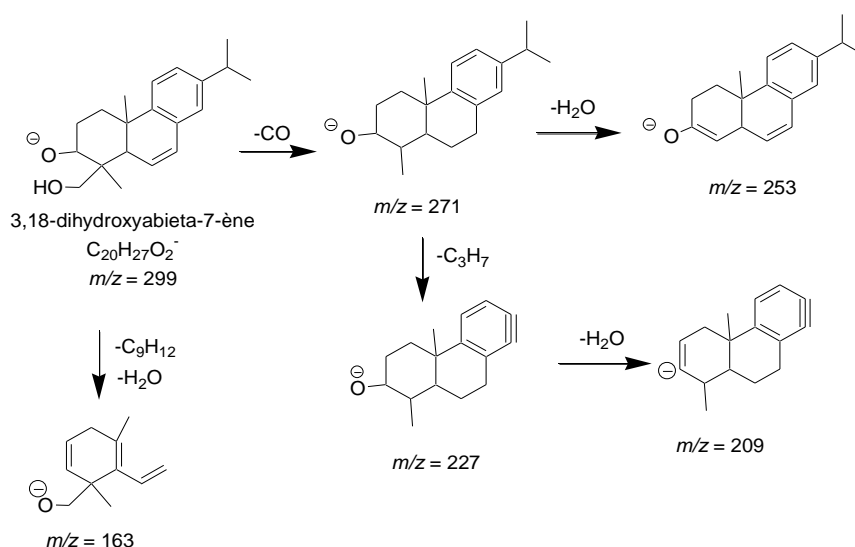


Figure 114 : Fragmentations du 3,18-dihydroxyabieta-7-ène.

IV.2.2.4. Acides alcanoïques

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z de 187 $[M-H]^-$ a été identifié comme étant l'acide azélaïque (P37) (figures 115 et 116) [154]. Sur le spectre MS/MS l'ion à m/z 143 $[M-H-CO_2]^-$ est produit par une décarboxylation qui informe sur la présence d'une fonction acide carboxylique dans la structure chimique. Le pic de base à m/z 125 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ est généré par la perte consécutive de H_2O et d'une fonction acide par décarboxylation. Le départ de H_2O s'effectue sur l'une des fonctions acide carboxylique. L'ion intense à m/z 97 $[M-H-2CO_2]^-$ est issu d'une double décarboxylation et confirme la présence de deux fonctions acides carboxyliques dans la structure du composé. Cet acide gras a été isolé dans l'écorce de sapin de Douglas [157].

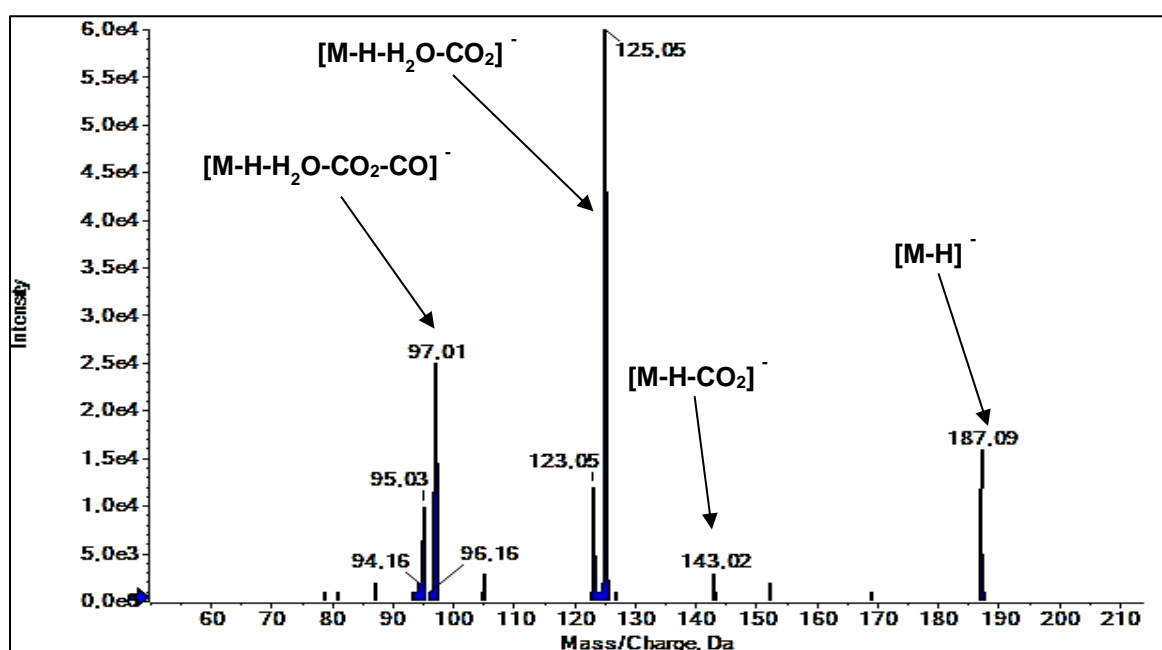


Figure 115 : Spectre MS/MS l'acide azélaïque.

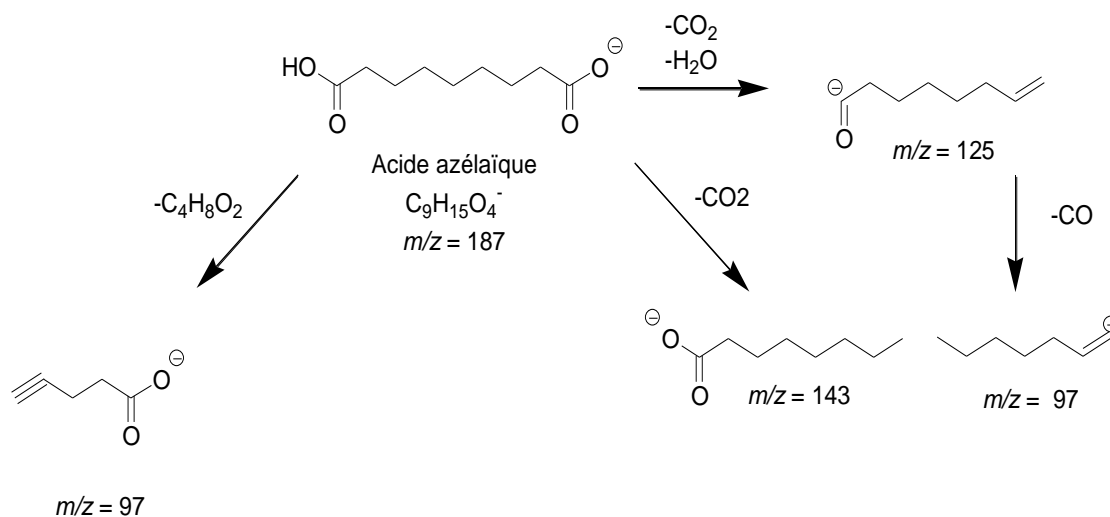


Figure 116 : Fragmentations de l'acide azélaïque.

IV.2.2.5. Acide phénolique

Le composé à 8,37 min qui présente un ion pseudomoléculaire à m/z 315 $[M-H]^-$ a été identifié comme étant l'acide protocatéchuique hexoside (P38) (figures 117 et 118) [158]. Le pic de base correspond à l'ion à m/z 109 $[M-H-162-CO_2]^-$ qui est généré par les pertes successives d'hexose et de CO_2 au niveau du cycle aromatique. L'ion à m/z 107 est également généré par les mêmes pertes d'hexose et de CO_2 . L'ion à m/z 153 $[M-H-162]^-$ est généré par la perte de l'hexose tandis que l'ion à m/z 269 $[M-H-CO_2]^-$ est produit par la perte de CO_2 au niveau du cycle aromatique.

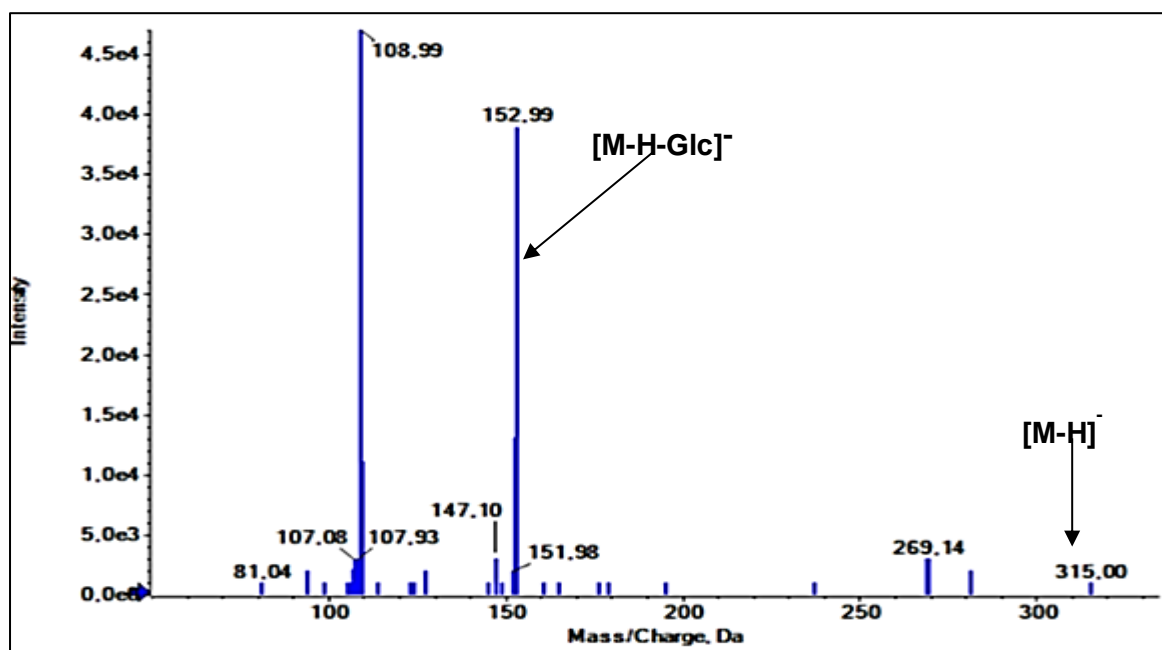


Figure 117 : Spectre MS/MS de l'acide protocatéchuique hexoside

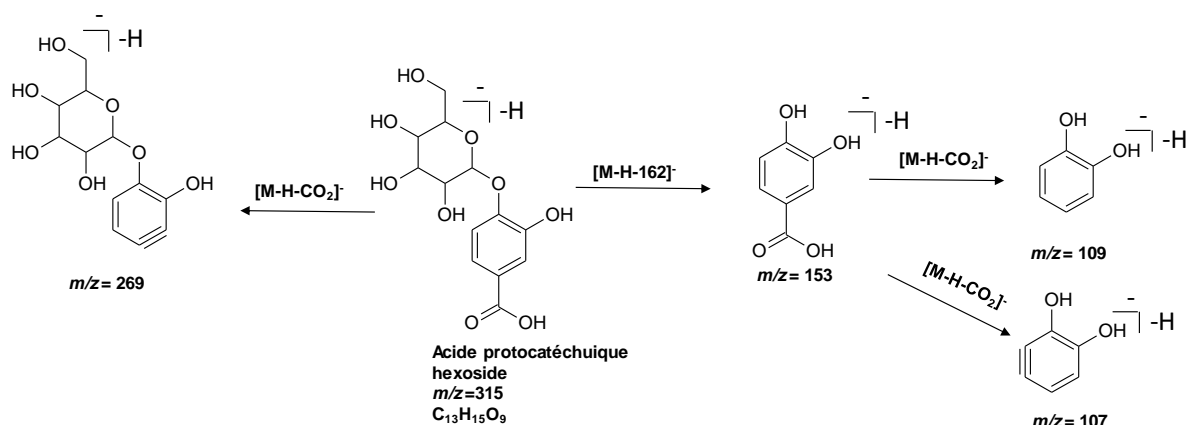


Figure 118 : Fragmentations de l'acide protocatéchuique hexoside.

IV.2.2.6. Autre composé

La molécule dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z de 173 a été identifié comme étant un intermédiaire biochimique appelé acide shikimique (P39) (figures 119 et 120) [159]. Les ions fragments présents dans le spectre MS/MS ont été expliqués avec les schémas de fragmentations observées au niveau des cyclohexènes [159]. Sur le spectre MS/MS, le pic de base observé à m/z 111 est formé par les pertes consécutives de H_2O et de la fonction acide par décarboxylation. L'ion peu intense à m/z 129 $[M-H-CO_2]^-$ est issu de la décarboxylation de l'acide shikimique.

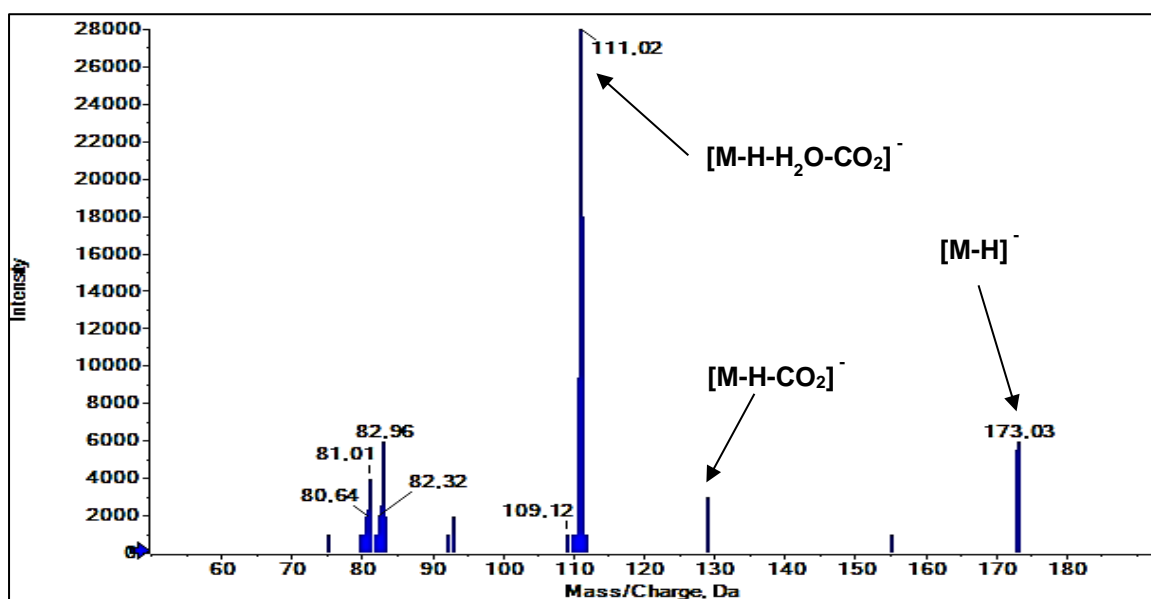


Figure 119 : Spectre MS/MS du acide shikimique.

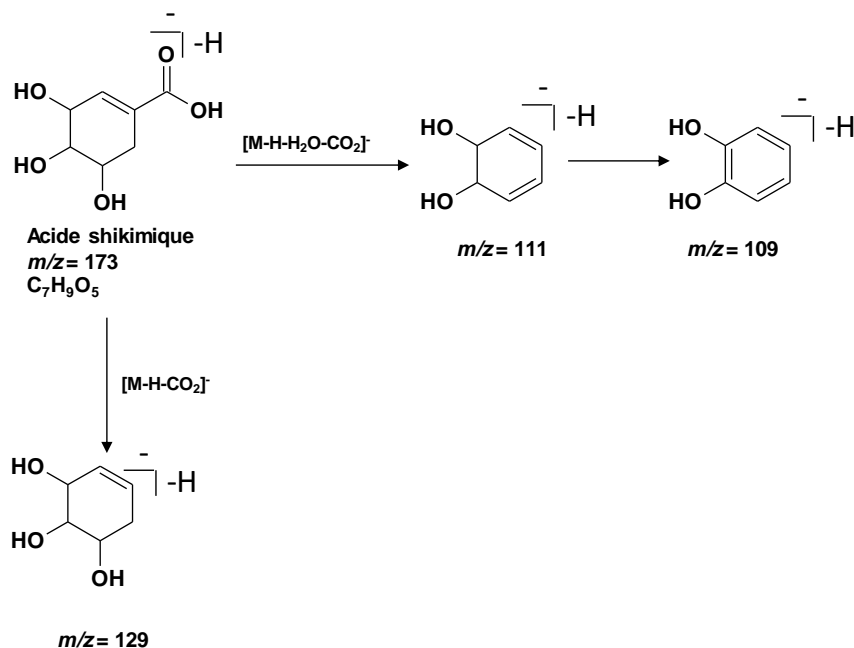


Figure 120 : Fragmentations de l'acide shikimique.

IV.2.2.7. Bilan des composés identifiés dans les fractions du duramen

Les résultats de l'analyse des fractions du duramen ont permis d'identifier 17 composés (sans prendre en compte les composés qui ont également été identifiés dans les extrait de duramen mais aussi dans l'extrait et les fractions de l'aubier). Lorsque les composés identifiés dans l'extrait sont également pris en compte, les flavonoïdes constituent le groupe de métabolites prédominant suivi des terpènes et des acides organiques. Une grande partie des flavonoïdes identifiés a été décrit dans le bois Douglas. Les autres flavonoïdes sont retrouvés dans d'autres espèces de gymnospermes ou d'angiospermes. Dans le cas des terpènes, tous les composés ont été décrits dans le sapin de Douglas (duramen et nœuds) [152], excepté le 3,18-dihydroxyabieta-7-ène qui est un composé non décrit dans le bois de Douglas et dont la structure a été proposée. Des flavonolignanes ont été identifiés dans les fractions du duramen. Il s'agit du pseudotsuganol décrit dans l'écorce de bois de Douglas [151] et deux autres composés (m/z 499 et 465) dont les structures chimiques proposées n'ont pas été retrouvées dans la littérature. D'autres ont également été identifiés. Il s'agit du coniférylacétate qui est un monolignol rencontré dans d'autres plantes [150], l'acide azélaïque qui a été décrit dans l'écorce de sapin de Douglas [157], l'acide shikimique qui est un intermédiaire de la

biosynthèse des polyphénols [65] et l'acide protocatéchuique hexoside qui est un dérivé de l'acide protocatéchuique retrouvé dans les plantes appartenant à la famille des Astéracées.

Au niveau des fractions analysées, certains composés ont été identifiés plusieurs fois mais à des temps de retentions différents. Ces composés sont pour la plupart des polyphénols et des terpènes qui sont considéré comme étant les groupes de métabolites les plus abondants dans le duramen du Douglas [5]. Ces métabolites pourraient donc être à l'origine de la très grande résistance du duramen contre les agents pathogènes extérieurs.

V. Zone de transition

L'exploitation des résultats de l'analyse en LC-MS/MS de l'extrait de la zone de transition (Figure 121) a permis de détecter 49 composés. Sur le TIC, il est observé trois composés à 14,39 min, 24,64 min et 30,90 min qui sont majoritaires.

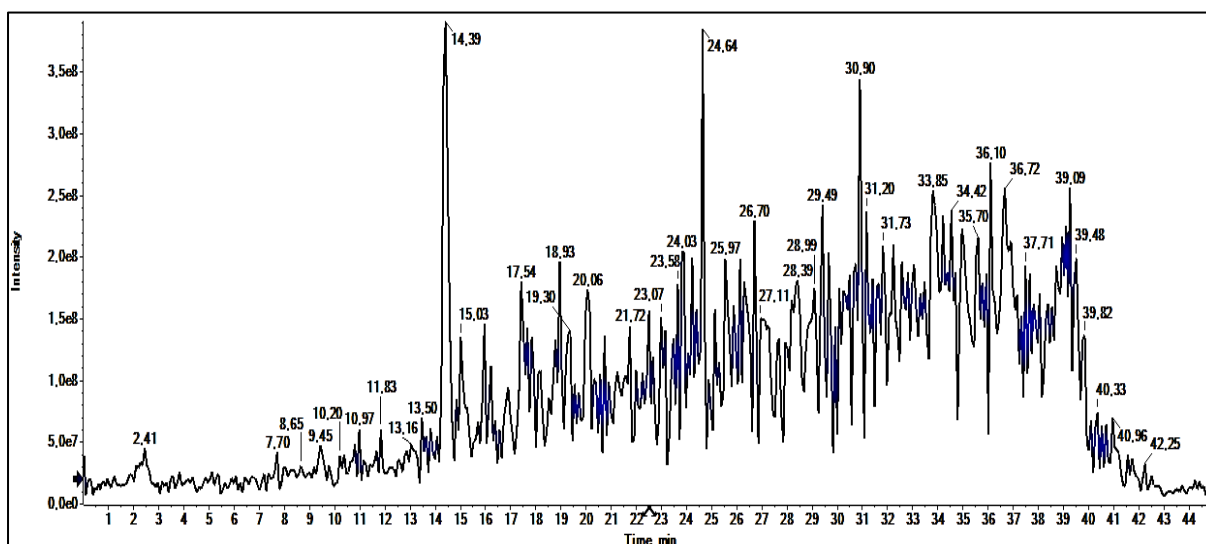


Figure 121 : Représentation du TIC de l'extrait de la zone de transition.

V.1. Polyphénols

Presque tous les polyphénols identifiés dans l'extrait de la zone de transition ont été identifiés dans les extraits et fractions de l'aubier et du duramen. Il s'agit des composés qui présentent les rapports m/z de 221, 255, 271, 285, 287, 301, 303, 331, 465, 481 correspondant respectivement au coniférylacétate, à la pinocembrine, la pinobanksine, le kaempférol, le dihydrokaempférol, la quercétine, la taxifoline, taxifoline-7,3'-diméthyl ether, la taxifoline-3'-*O*-glucoside et la silybine.

V.1.1. Dihydroflavonols

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 317 ($t_R = 15,94$ min) a été identifié comme étant la taxifoline-4'-méthyléther (P40) (figures 122 et 123) [160]. Sur le spectre MS/MS, le pic de base à m/z 289 est formé par la perte de CO au niveau du cycle C. On observe d'autres ions intenses comme $[M-H]^-$, $[M-H-CO_2]^-$ à m/z 273 formé par la perte de CO_2 au niveau C, $[M-H-^{0,4}A-CH_3^\bullet]^-$ à m/z 192 généré par la rupture des liaisons associé à la perte du cycle A et du radical CH_3^\bullet ; et $[M-H-CH_3^\bullet-CO_2]^-$ à m/z 258 produit par les pertes successives de CH_3^\bullet et CO_2 . La perte du radical CH_3^\bullet est fréquente chez les flavonoïdes méthylés [120]. Les ions à m/z de 125 $[^{1,4}A]^-$ et 152 $[^{1,3}A]^-$ sont également intenses et sont caractéristiques à la taxifoline (cf fragmentation de la taxifoline). La présence de ces deux derniers ions et de $[M-H-H_2O]^-$ peu intense à m/z 299, montre que taxifoline n'est pas méthylé au niveau des cycles A et C. La position du CH_3 sur le cycle B en C-4' a été confirmé par la littérature [160]. Ce composé a été décrits chez les espèces appartenant à la famille des Asteraceae et Fabaceae [160].

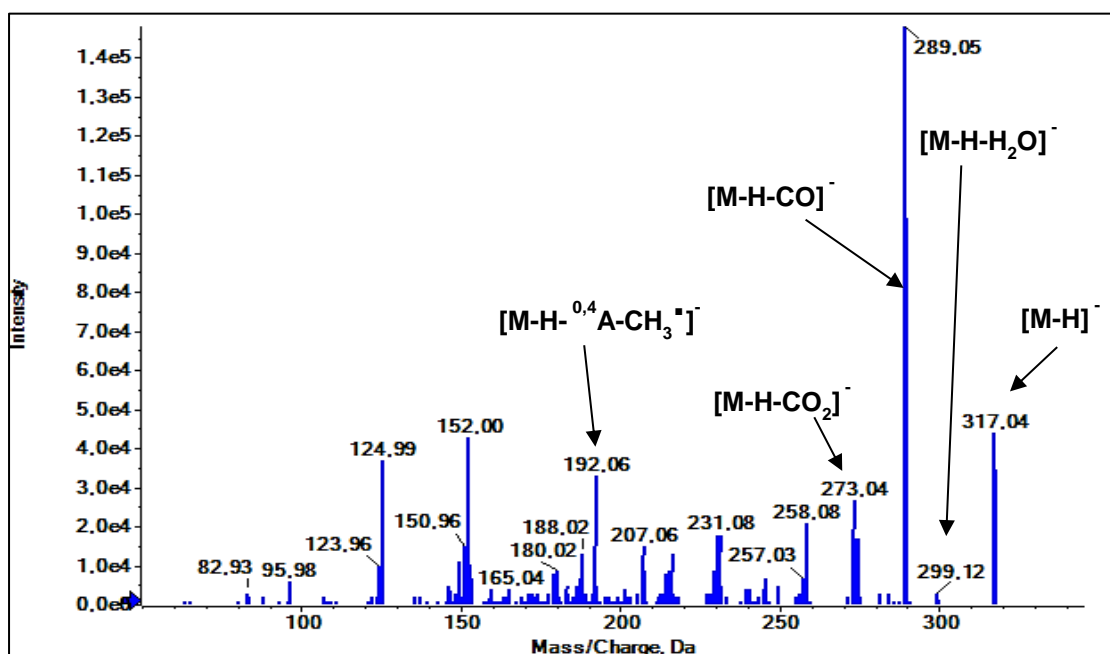


Figure 122 : Spectre MS/MS de la taxifoline-4'-méthyléther.

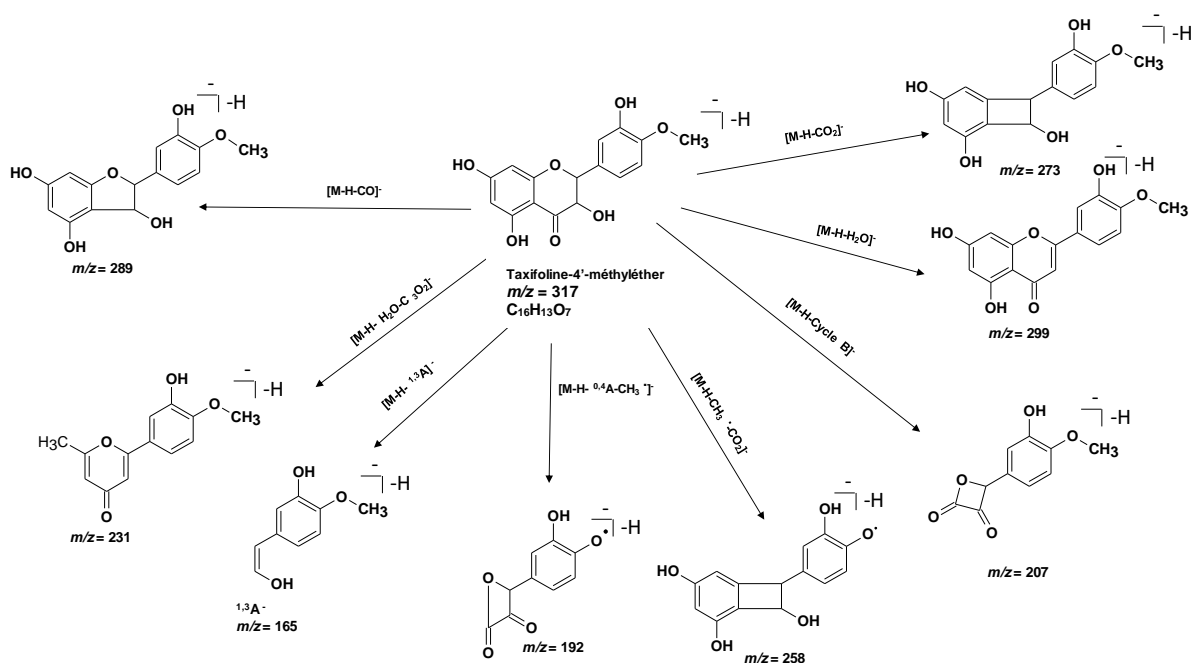


Figure 123 : Fragmentations de la taxifoline-4'-méthyléther.

V.1.2. Flavonols

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport $m/z = 299$ correspond au 6-méthylkaempférol (P41) [161] (figures 124 et 125). L'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ correspond au pic de base et les autres ions présents sur spectre MS/MS sont de faible intensité car leurs fragmentations sont peu favorables. Parmi ces ions peu intenses ceux qui sont prédominant sont à m/z 243 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$ formé par la rupture des liaisons 2 et 4 du cycle C suivi d'un réarrangement de la molécule ; à m/z 213 $[M-H-C_2H_4O_2-CO]^-$ qui est généré par la perte de CO sur l'ion précédent ; et à m/z 271 $[M-H-CO_2]^-$ qui est produit par une décarboxylation réalisée au niveau du C. Ce composé a été isolé dans le pin tordu (*Pinus contorta*) [161].

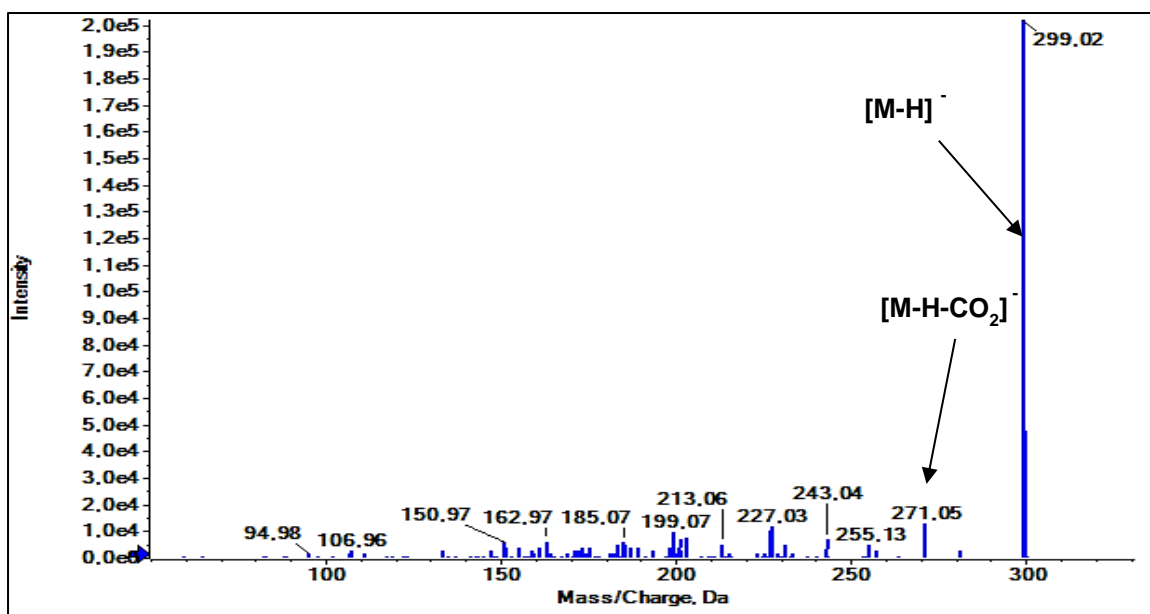


Figure 124 : Spectre MS/MS du 6-méthylkaempférol.

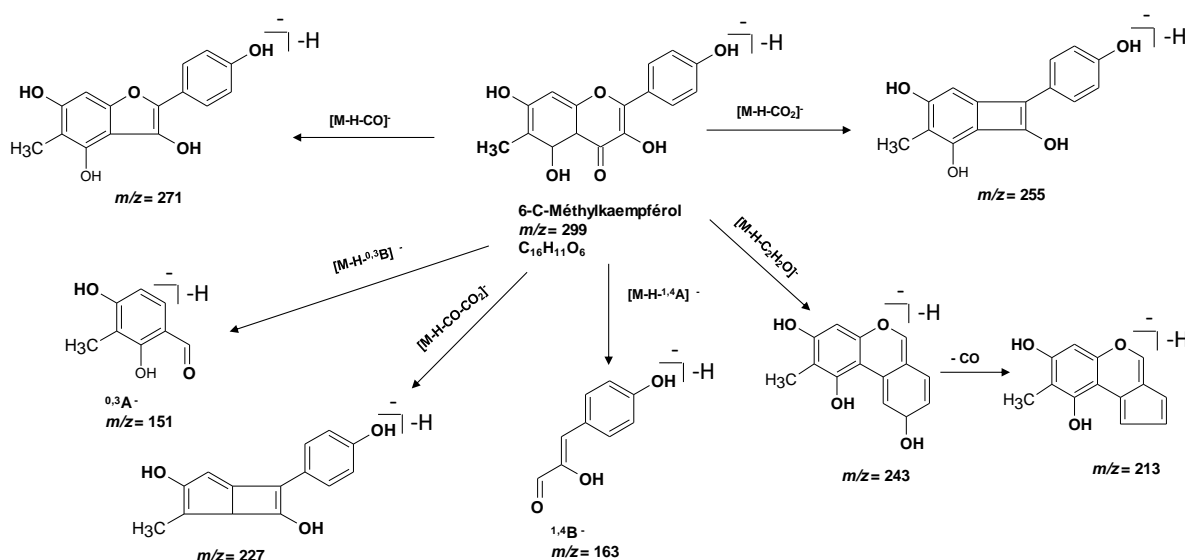


Figure 125 : Fragmentations du 6-méthylkaempférol.

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 315 ($t_R = 19,42$ min) a été identifié comme étant l'isorhamnétine (P42) (figures 126 et 127) [146]. Sur le spectre MS/MS, on observe deux ions majoritaires qui sont $[M-H]^-$ et $[M-H-CH_3^\bullet]^-$ à m/z 300. Ce dernier est formé par la perte du radical CH_3^\bullet caractéristique au flavonoïdes méthylés. Parmi les ions restant ceux qui prédominent sont $[M-H-CO_2]^-$ à m/z 271 formé par une décarboxylation au niveau du cycle C ; $[M-H-CH_3^\bullet-0,3A]^-$ à m/z 164 généré par la perte de CH_3^\bullet associé à la rupture des liaisons 0 et 3 du cycle C entraînant la perte du cycle A ; et $1,3A^-$

à m/z 151 qui est produit par la perte du cycle B après la rupture des liaisons 1et 3 du cycle C. Ce composé a été décrit dans plusieurs plantes angiospermes dont celles de la famille des Asteraceae [162].

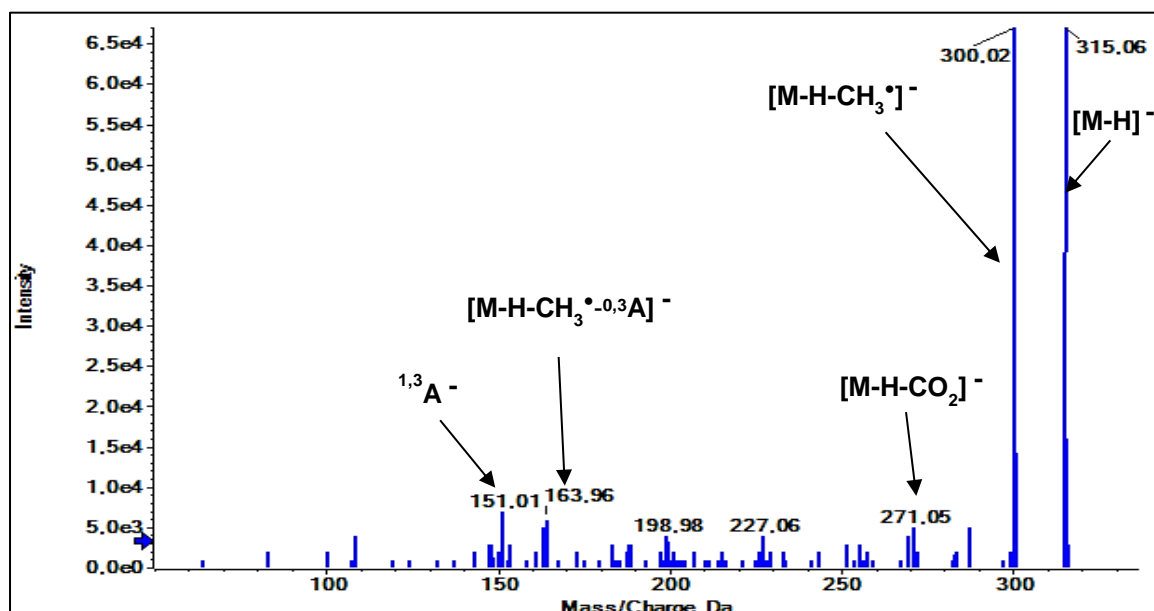


Figure 126 : Spectre MS/MS de l'isorhamnétine.

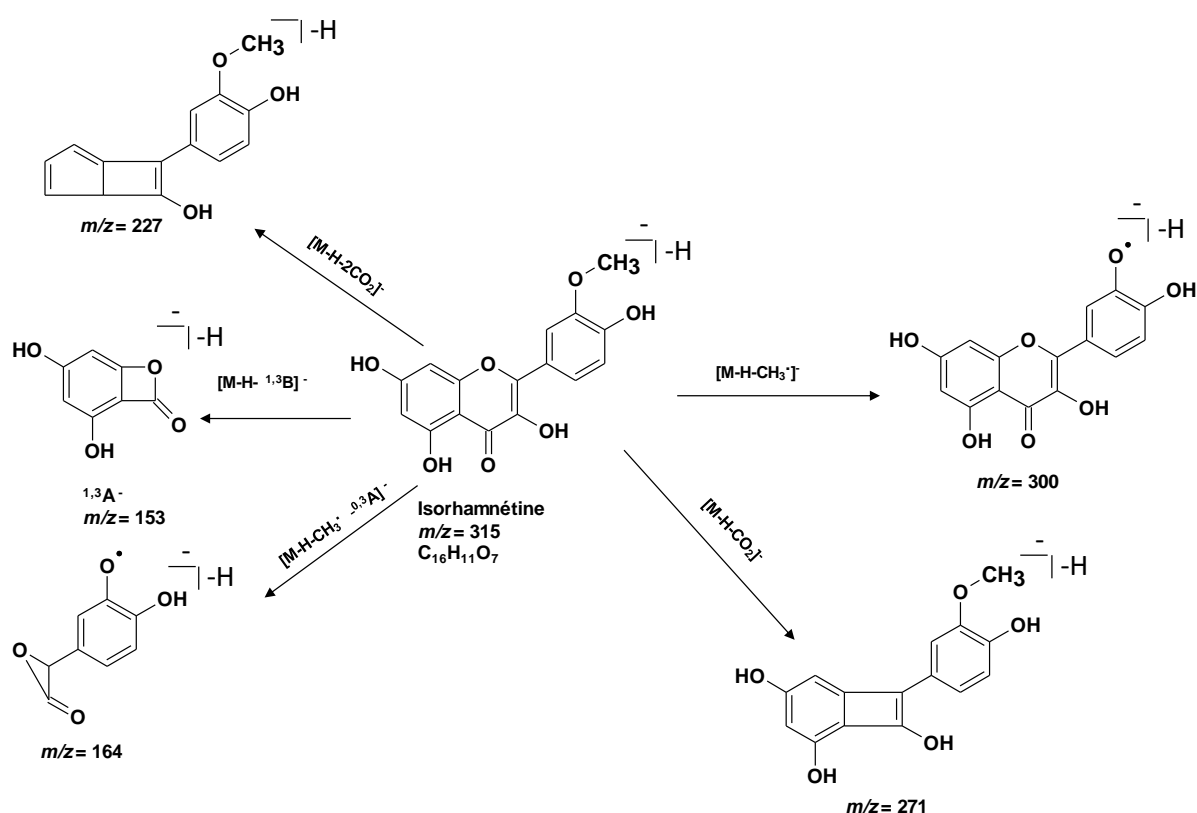


Figure 127 : Fragmentations de l'isorhamnétine

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 285, à 17,29 min, a été identifié comme étant la lutéoline (P43) (figures 128 et 129) [120]. Sur le spectre MS/MS, l'ion pseudomoléculaire à m/z 285 $[M-H]^-$ est le pic de base. Les fragments ions à m/z 133 $[^{1,3}B^-]$ et m/z 151 $[^{1,3}A^-]$ sont générés par la rupture des liaisons 1 et 3 du cycle C. D'autres ions issus de pertes neutres sont observés. C'est le cas de l'ion $^-$ à m/z 175 $[M-H-C_3O_2-C_2H_2O]$ produit par les pertes consécutives de C_3O_2 et C_2H_2O ; l'ion à m/z 199 $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$ généré par les pertes successives de C_2H_2O et CO_2 ; et à m/z 241 $[M-H-CO_2]^-$ produit par la perte de CO_2 .

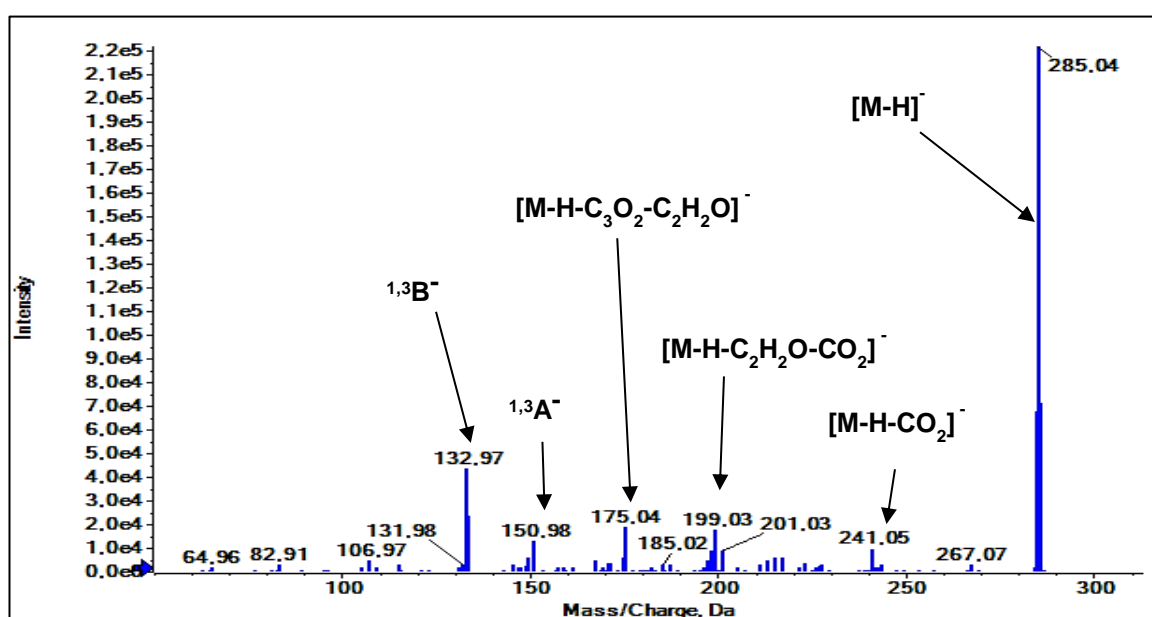


Figure 128 : Spectre MS/MS de la lutéoline.

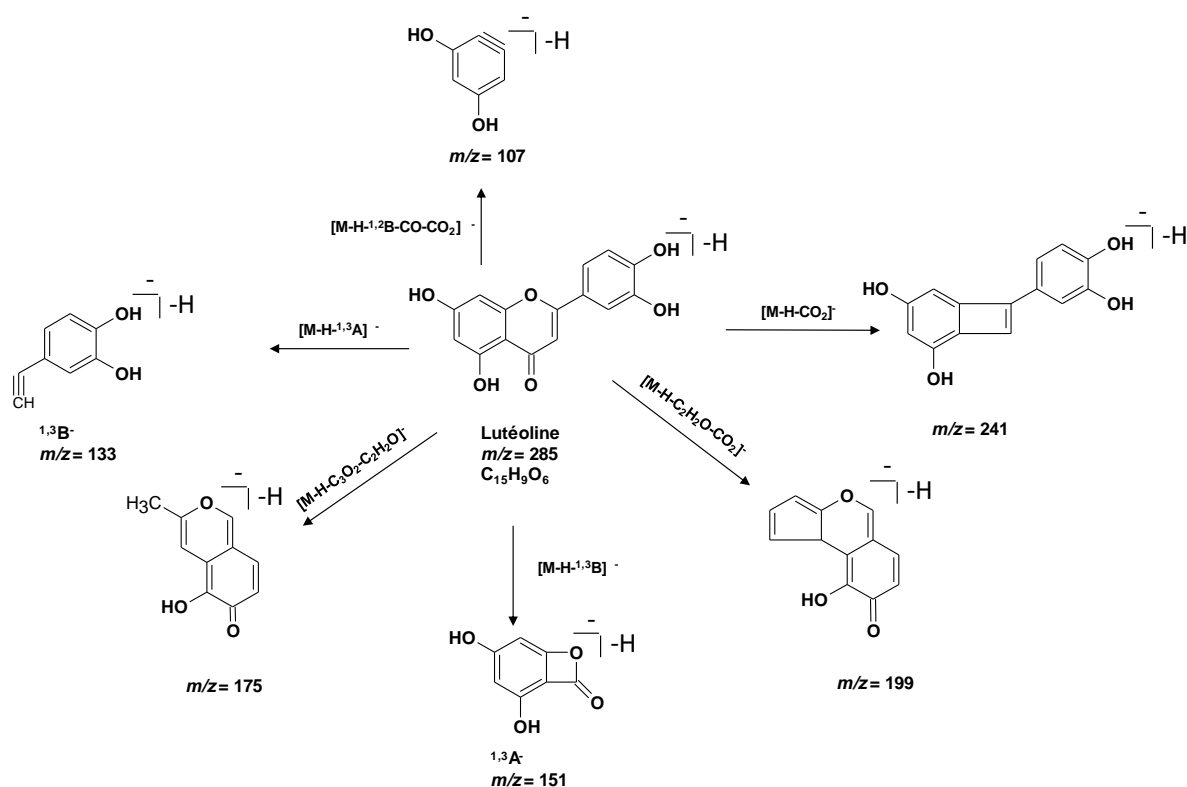


Figure 129 : Fragmentations de la lutéoline.

V.1.3. Lignanes

V.1.3.1. Tétrahydrofurane lignanes

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 391 ($t_R = 13,51$ min) pourrait correspondre au massonirésinol (P44) (figures 130 et 131) [163]. Sur le spectre MS/MS, on note la présence de 4 ions intenses présentant les rapports m/z de 343, 195, 165 et 150. L'ion $m/z = 343$ est généré par la perte de H_2O en C8' accompagné par la perte de CH_2O en C8. L'ion à m/z 195 est produit par la rupture des liaisons C8-C8' et O-C7 tandis que l'ion à m/z 165 est généré par la rupture des liaisons C8-C8' et C8-C9'. Ce composé a été isolé dans le pin de masson (*Pinus massoniana*) [163].

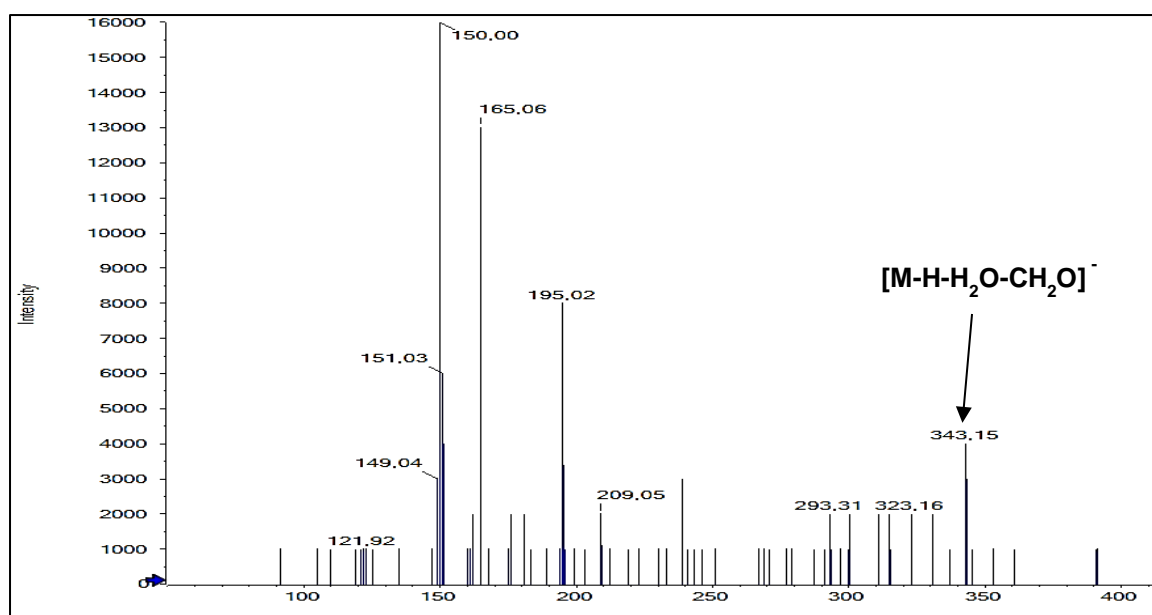


Figure 130 : Spectre MS/MS du massonirésinol.

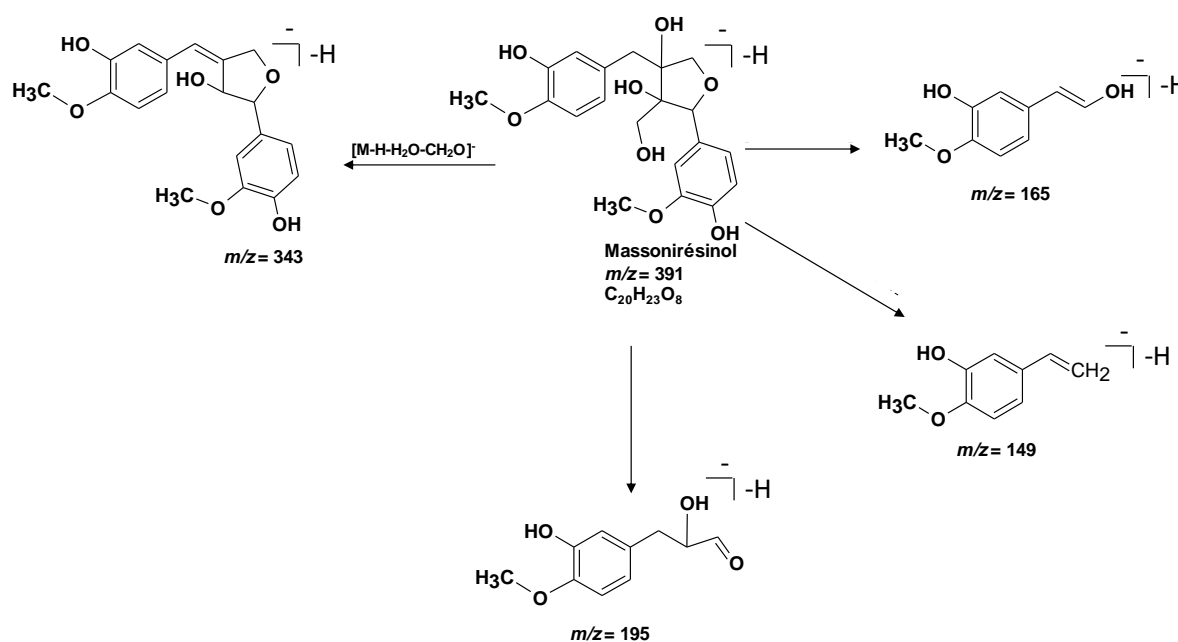


Figure 131 : Fragmentations du massonirésinol.

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport $m/z = 389$ ($t_R = 13,51$ min) a été identifié comme étant le 5'-méthoxyaricirésinol (P45) [164] (figures 132 et 133). Sur le spectre MS/MS, l'ion à m/z 329 $[M-H-2CH_3-CH_2O]^-$ correspond au pic de base. Il est formé par la perte de $2CH_3$ substitués aux groupes hydroxyles portés les cycles

aromatiques, associé à une perte de CH_2O au niveau du carbone 8. L'ion à m/z 374 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$ est produit par la perte du radical CH_3^\bullet au niveau de l'hydroxyle porté par le carbone 4. C'est l'absence d'encombrement stérique dans cette région de la molécule qui a favorisé le départ du CH_3 radicalaire en C4. Les ions à m/z 343 et 341 sont formés par la perte de H_2O associée à la rupture des liaisons $\text{C}8'-\text{C}9'$ et $\text{O}-\text{C}7$ entraînant la perte de CH_2O . Ce composé a été isolé dans les racines de *Rubia yannanensis* [164].

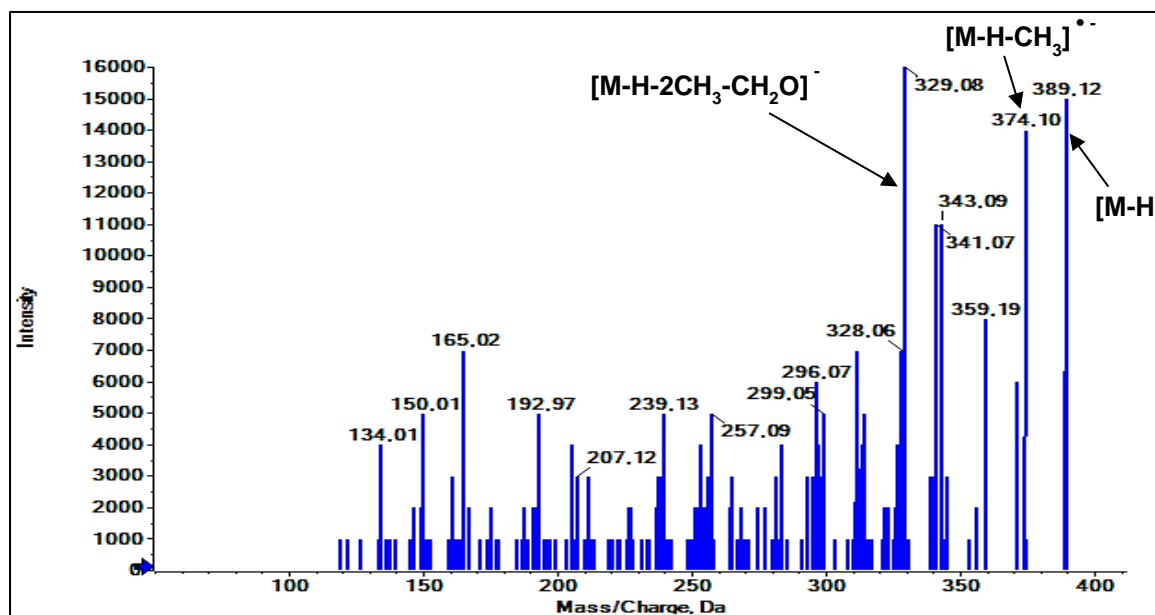


Figure 132 : Spectre MS/MS du 5'-méthoxylaricrésinol.

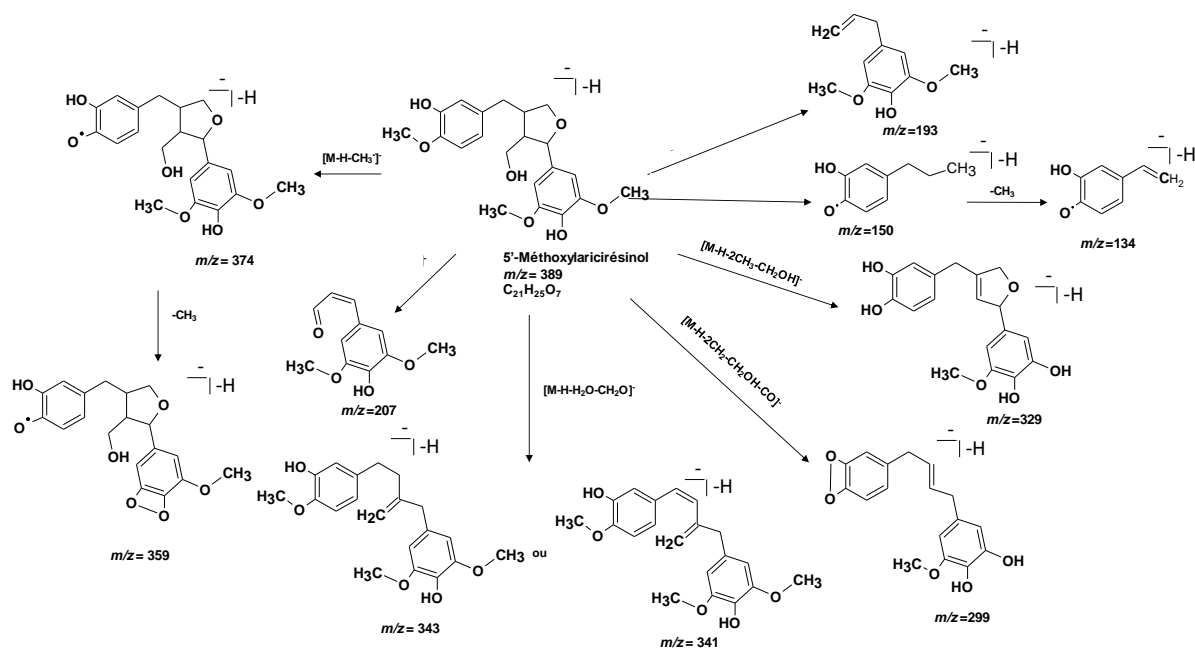


Figure 133 : Fragmentations du 5'-méthoxyaricirésinol.

V.1.3.2. Dibenzylbutyrolactone lignane

Le composé dont l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ présente un rapport m/z 373 ($t_R = 15,15$ min) a été identifié comme étant l'hydroxymatairésinol (P46) (figures 134 et 135) [137]. Sur le spectre MS/MS, le pic de base à m/z 173 $[M-H-CO_2-H_2O-C_7H_8O_2]^-$ est formé par la perte de CO_2 au niveau de la fonction lactone, associée à la perte de H_2O en C7' et à la rupture de la liaison C1'-C7' (perte d'un cycle aromatique). On note également la présence d'un ion à m/z 355 généré par la perte de H_2O en C7'. Les ions à m/z 313 et m/z 311 sont produits par les pertes consécutives de CO et H_2O au niveau de la fonction lactone, associées la déméthylation de l'un des groupes hydroxyles porté par les cycles aromatiques. Ce composé a été isolé dans les aiguilles du cyprès de Taiwan (*Chamaecyparis formosensis*) [165].

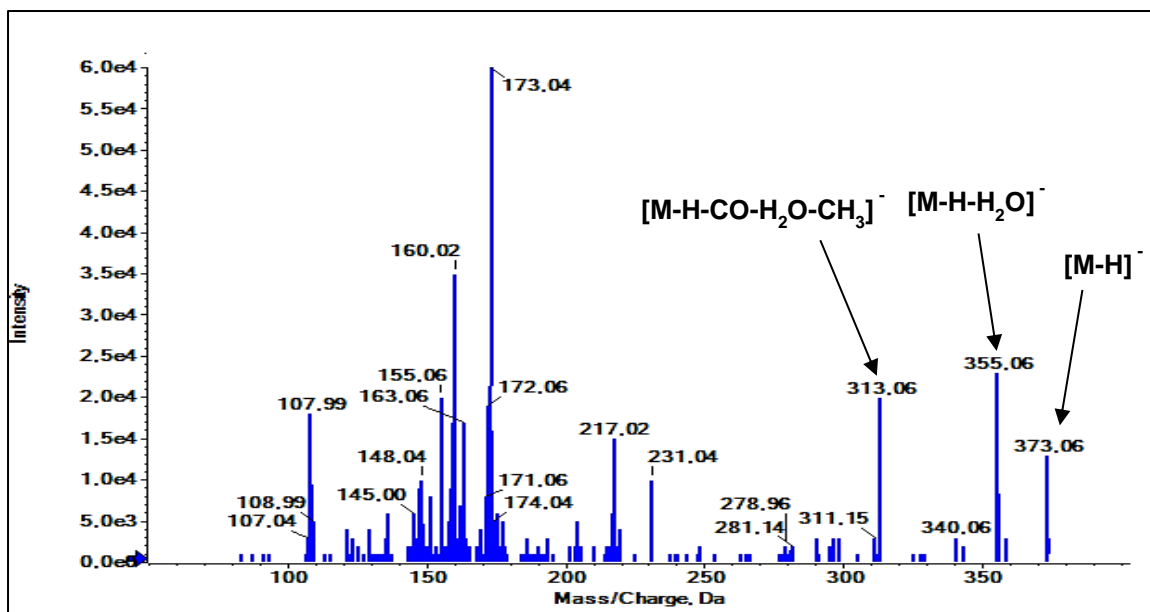


Figure 134 : Spectre MS/MS du 7-hydroxymatairesinol.

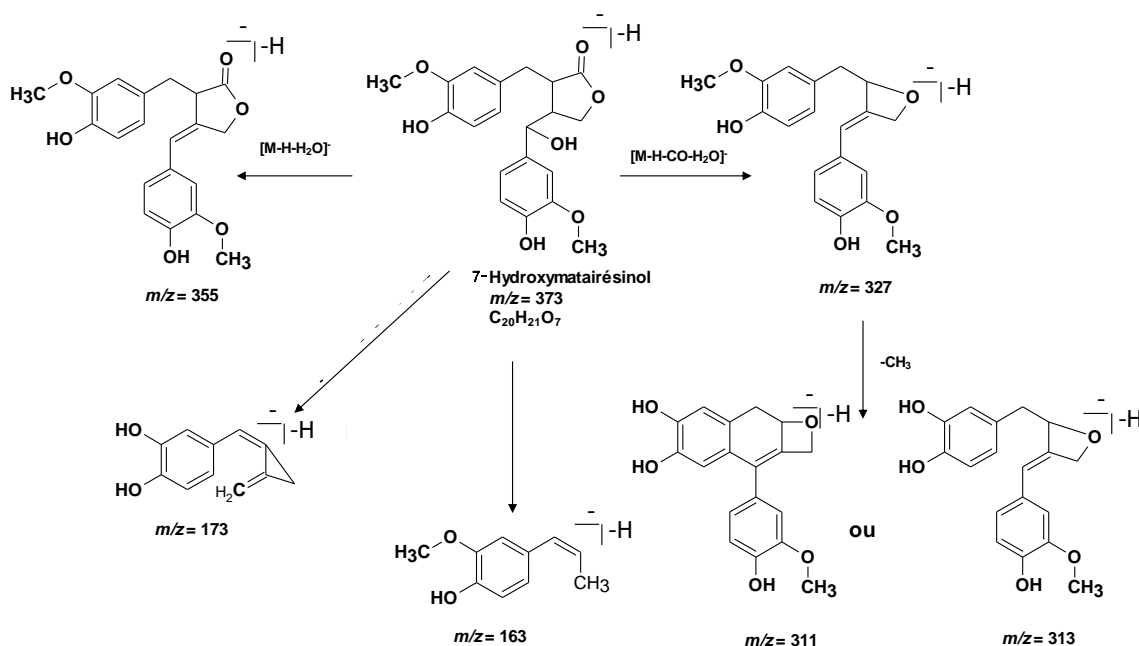


Figure 135 : Spectre MS/MS du 7-hydroxymatairesinol.

V.2. Terpènes

Parmi les terpènes identifiés dans l'extrait de la zone de transition, certains ont été retrouvés dans les fractions duramen. Il s'agit de l'acide dihydrotodomatuique ($m/z = 253$, $t_r = 23$ min et 24 min) et le pseudotsugonal ($m/z = 235$). Le composé présentant un rapport $m/z = 265$ à 21,54 min a été précédemment détecté dans la zone de transition ($m/z = 265$ à 20,50 min). Les structures possibles de ce composé sont celles de la juvabione ou un dérivé de l'acide ferrulique.

V.3. Autres composés

Le composé à 9,15 min qui présente un ion pseudomoléculaire à m/z 211 $[M-H]^-$ a été identifié comme étant le 1-(3,4 dimethoxyphenyl)-2,3-propanediol (P47) (figures 136 et 137). Le pic de base correspond à l'ion à m/z 148 $[M-H-2CH_2O-CH_3]^-$ qui est généré par les pertes successives de $2CH_2O$ (sur la chaîne aliphatique) et CH_3^\bullet (une perte sur le cycle aromatique). Cette fragmentation est passée par des étapes intermédiaire qui ont permis la formation des fragments ions à m/z 181 $[M-H-2CH_2O]^-$ et m/z 163 $[M-H-CH_3^\bullet-2CH_2O]^-$. L'ion à m/z 166 $[M-H-CH_2O-CH_3^\bullet]^-$ est généré par les pertes de CH_2O et CH_3^\bullet . L'ion à m/z 109 $[M-H-2CH_2O-C_2H_3]^-$ est formé par la perte de la chaîne carbonée linéaire associé à la perte de CH_3 . L'ion à m/z 135 $[M-H-2CH_2O-2CH_3]^-$ est formé par les successives de $2CH_2O$ et $2CH_3$.

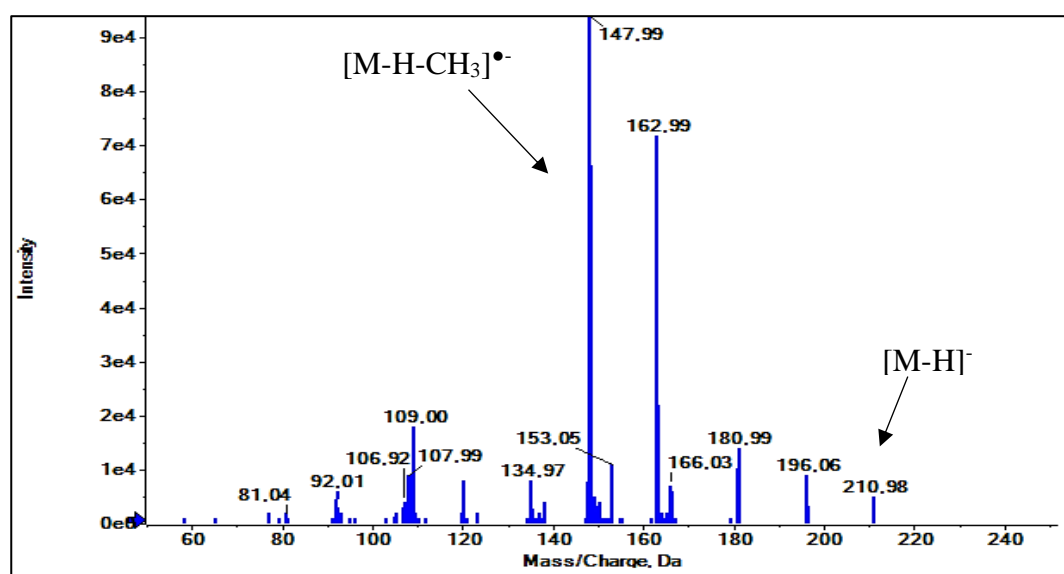


Figure 136 : Spectre MS/MS de de la 1-(3,4 dimethoxyphenyl)-2,3-propanediol.

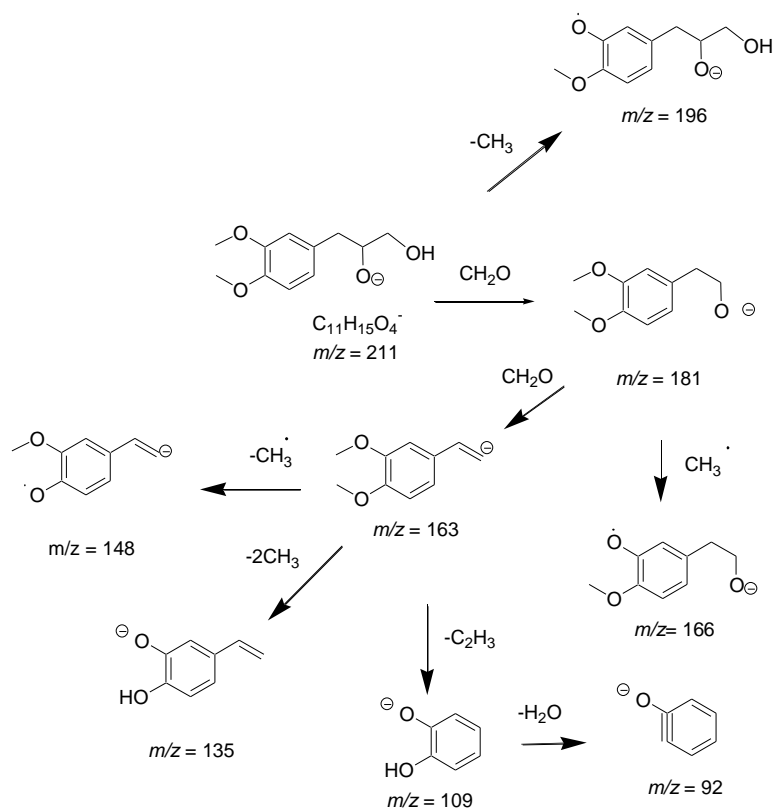


Figure 137 : Fragmentations de la 1-(3,4 diméthoxyphényl)-2,3-propanediol.

L'acide azélaïque (m/z 187) qui est un acide gras retrouvé dans les fractions du duramen a également été identifié dans l'extrait de la zone de transition.

V.4. Bilan des composés identifiés dans la zone de transition.

Les résultats de l'analyse de l'extrait de la zone de transition ont permis d'identifier 36 composés. Des polyphénols ont été identifiés (tableau 7). Parmi ces polyphénols certains n'ont pas été décrit dans le sapin de Douglas comme le massonirésinol retrouvé dans *Pinus massoniana* [163], le 5'-méthoxylaricirésinol présents dans *Rubia yunnanensis* [164], le 7-hydroxymatairésinol retrouvé dans cyprès de Taiwan (*Chamaecyparis formosensis*) [165] et l'isorhamnétine que l'on peut retrouver dans le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) [166] et également dans d'autres plantes (tableau 7).

Les autres métabolites identifiés sont les terpènes et les acides gras. Parmi les terpènes identifiés, il y a l'acide dihydrotodomatique et le pseudotsugonal qui ont été décrits dans le duramen du sapin Douglas [152]. Le seul acide gras identifié est l'acide azélaïque également décrit dans le sapin de Douglas [157].



Au niveau de l'extrait de la zone de transition presque tous les flavonoïdes identifiés sont également présents dans les extraits d'aubier et de duramen. Cela montre que la zone intermédiaire est liée à l'aubier et au duramen. Les autres composés détectés sont présents dans le tableau 7 ou en annexe (annexe 2).

Tableau 7 : Composés identifiés dans l'extrait de la zone de transition

t_R (min)	[M-H]⁺ (m/z)	Identification
9,15	211	1-(3,4 dimethoxyphenyl)2,3propanediol
11,19	303	Taxifoline
12,48	375	7-Hydroxybutyltaxifoline
13,51	389	5'-Methoxylariciresinol
13,86	391	Massoniresinol
14,37	303	Taxifoline
14,54	285	Kaempferol
14,89	187	Acide azélaïque
15,15	373	7-Hydroxymatairesinol
15,83	317	Taxifoline-4'-méthyléther
15,92	287	Dihydrokaempferol
16,60	221	Coniferylacétate
16,78	373	7-Hydroxymatairesinol
17,29	285	Luteoline
17,38	301	Quercétine
17,80	331	Taxifoline-7,3'-diméthylether
17,97	299	6-Méthylkaempférol
18,41	329	Gibbérelline A7
18,57	481	Silybine
18,99	271	Pinobanksine
19,42	315	Isorhamnétine
20,36	235	Pseudotsugonal
21,54	265	Juvabione
22,78	255	Pinocembrine
24,68	253	Acide dihydrotodomatuique

VI. Propriétés biologiques des métabolites identifiés dans les différentes zones du bois de Douglas.

Les composés qui ont été identifiés dans les trois zones du bois de Douglas mettent en évidence principalement trois groupes de métabolites : les polyphénols, les terpènes et les acides gras. Les polyphénols se caractérisent surtout par des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et antifongiques. Ce sont ces propriétés qui permettent de considérer les polyphénols comme les principaux métabolites responsables de la protection du bois contre les champignons et d'autres microorganismes pathogènes. Tous les polyphénols identifiés

sont des antioxydants et leur activité varie en fonction de la structure de chaque composé. Dans le cas par exemple des flavonoïdes, la présence de la double liaison 2-3 et de la fonction 4-one sur le cycle C ainsi que la présence de groupe hydroxyles au niveau du cycle B augmente l'activité antioxydant de la molécule. La taxifoline par exemple à une activité antioxydante beaucoup moins élevée que la quercétine [167]. Cependant, la glycosylation diminue l'activité antioxydante du flavonoïde. Dans le bois, ces antioxydants permettent d'inhiber les composés oxygénés qui entraînent la détérioration du bois par oxydation [116] [168]. En dehors de leur activité antioxydante, les polyphénols identifiés possèdent également des propriétés antibactériennes et antiprolifératives [57]. Ces propriétés pourraient être à l'origine de résistance du bois face aux microorganismes pathogènes.

Les terpènes identifiés dans les extraits et fractions exploités présentent des propriétés biologiques variées spécifiques à chaque type de terpènes. Les dérivés de la juvabione (pseudotsugonal, acides dihydrotodomatuique et todomatuique,) par exemple, sont des sesquiterpènes qui ont des effets ovicides (capacité à empêcher l'évolution de l'embryon) chez certains insectes [83]. Ces propriétés insecticides pourraient être à l'origine de la résistance du bois Douglas contre les attaques des insectes. Certains diterpènes comme les gibbérélines et l'acide 7'-hydroxyabscissique sont des phytohormones (molécules qui régulent la croissance et le développement de la plante) [169]. Ce qui explique leur présence dans les tissus végétaux en développement (bourgeons, cônes,...).

Quelques composés appartenant à d'autres groupes de métabolites ont été identifiés dans les extraits et fractions du bois de Douglas. C'est le cas par exemple des flavolignanes, et des acides alcanoïques qui sont des antioxydants et antibactériens [170]. L'acide azélaïque par exemple joue un rôle important dans la défense des plantes contre les agents pathogènes extérieurs [171]. On retrouve également des acides gras et des phytostérols qui sont des métabolites qui participent à la protection de la plante contre les agressions environnementales (sécheresse, température,...) [172].

VII. Répartition des métabolites secondaires au sein du bois de Douglas.

L'analyse en LC-MS/MS des extraits d'aubier, de la zone de transition et de duramen a permis de détecter plusieurs composés. L'identification de ces composés par l'explication des ions fragments présents dans les spectres MS/MS a permis de mettre en évidence différents groupes de métabolites dont les principaux sont : les polyphénols (flavonoïdes,

lignanes et procyanidines), les terpènes et les acides gras (figure 138). Dans l'extrait de duramen il a été noté une forte concentration en polyphénols notamment en flavonoïdes telles que la taxifoline et la quercétine (cf tableau 8). En effet, dans la littérature il a été montré que le duramen est la zone au niveau de laquelle l'on retrouve majoritairement des polyphénols de défense [11]. L'extrait de la zone de transition présente une plus grande variété des métabolites (polyphénols, terpènes et acides gras). Cela peut s'expliquer par une activité métabolique intense qui peut s'observer au niveau de cette zone intermédiaire car les précurseurs biosynthétiques des polyphénols sont produits en grande quantité aux alentours de la zone de transition [54].

Lorsque l'on observe les polyphénols identifiés, on constate que certains métabolites sont retrouvés dans les trois zones. C'est le cas de la taxifoline, du dihydrokaempferol et la pinocembrine. La taxifoline par exemple est considéré comme le métabolite secondaire le plus abondant dans le bois de Douglas [5]. Ce qui explique sa présence dans les trois extraits. Cependant, au niveau de l'extrait d'aubier on remarque l'absence de la quercétine qui est censé être présent (et il a été également isolé dans les fractions de l'aubier). L'absence de ce composé est peut-être due à une faible concentration dans l'extrait.

Parmi les composés qui ont été détectés dans les trois zones du bois, certains n'ont pas pu être identifiés car il pourrait s'agir de nouveaux composés ou de métabolites dont les données de spectrométries de masse ne sont pas répertoriées dans la littérature. En effet, il serait préférable d'isoler ces nouveaux composés en envisageant des nouvelles techniques de purification.



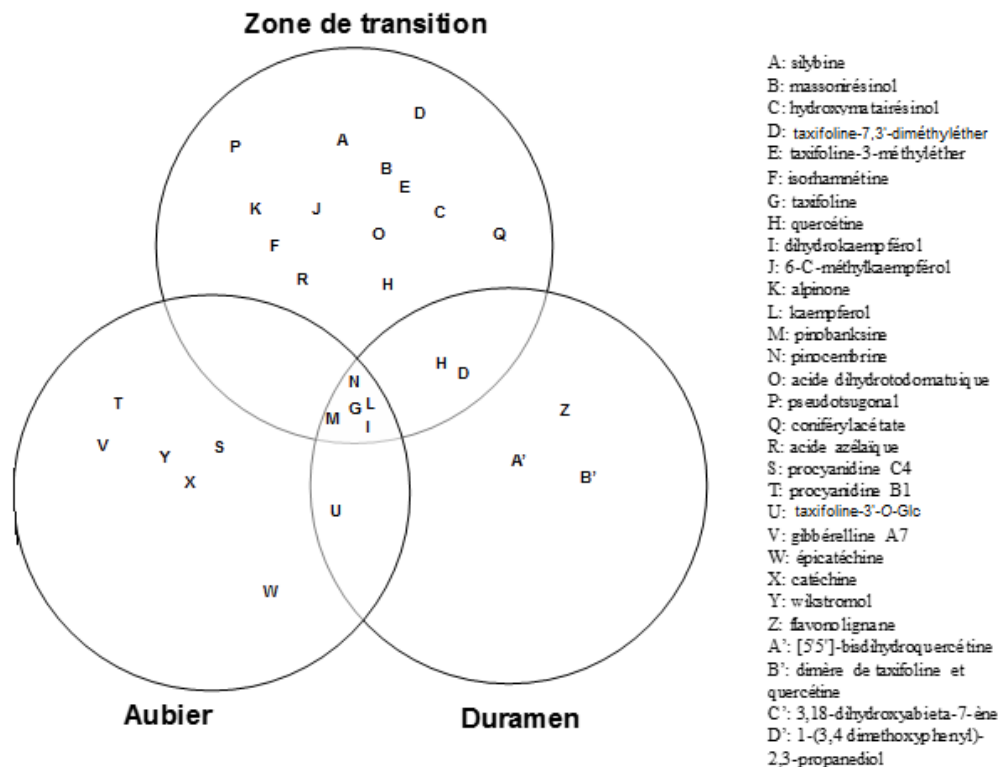


Figure 138 : Répartition des métabolites identifiés dans les extraits d'aubier, de duramen et de la zone de transition.

Pour pouvoir comparer les résultats obtenus lors de l'analyse en LC-MS/MS des différents extraits de bois de Douglas, des réseaux moléculaires ont également été générés. Le réseau moléculaire est une forme de représentation qui permet d'organiser les composés identifiés par LC-MS/MS en se basant sur les fragments communs aux différentes molécules [173]. Ils peuvent être réalisés en ligne sur le site GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) ou exportés pour être visualisés sur le logiciel cytoscape.

Après avoir effectué l'analyse en LC-MS/MS des extraits de bois, les résultats de chaque extrait ont été recueillis dans des fichiers au format « wiff ». Ces derniers ont ensuite été convertis au format « mzXML » à partir de l'outil « MSConvertGUI ». En effet, pour générer les réseaux moléculaires les fichiers doivent être préalablement convertis dans des format adapté (mzXML ou mzML) [174] à la plateforme GNPS ou logiciel GNPS pour générer les réseaux moléculaires. Ces fichiers ont été insérés dans GNPS afin d'effectuer un traitement des données de LC-MS/MS en modifiant un certain nombre des paramètres pour obtenir des réseaux moléculaires exploitables et adaptés aux conditions d'analyses utilisées. Les paramètres qui ont été modifiés sont la tolérance (intervalle d'erreur) de la masse des ions

précurseurs, des fragments ions et le nombre minimum de fragments ions appariés (fragments en commun entre composés apparentés). Une tolérance de 0,2 a été utilisée pour les ions précurseurs tandis que pour les fragments ions, elle a été de 0,1. Le nombre minimum de fragments ions appariés a été 4. Ces modifications ont été soumises à la plateforme GNPS qui a généré des fichiers sous plusieurs formats dont certains ont permis de visualiser les réseaux sur GNPS et d'autres ont été utilisés pour la visualisation sur cytoscape.

Pour réaliser les réseaux moléculaires, GNPS ou cytoscape va effectuer une corrélation spectrale pour détecter les ensembles de spectres qui appartiennent à des molécules apparentées. Dans la visualisation, chaque spectre est représenté par un nœud et les spectres similaires sont reliés par des lignes d'intersection qui apparaissent entre les nœuds (figure 143). Sur chaque nœud est indiqué la valeur du rapport m/z de l'ion pseudomoléculaire du composé.

Au niveau du réseau généré par cytoscape, les spectres qui ne possèdent aucune similarité avec les autres spectres apparaissent sous la forme d'un nœud relié à eux-même (figure 139). L'épaisseur de la liaison entre les nœuds augmente avec la similarité entre les spectres représentés. Lorsqu'un composé est présent dans la base de données de GNPS, il est possible d'obtenir sa structure chimique en cliquant sur le nœud concerné pour être renvoyé vers la page de GNPS contenant les informations sur la structure de la molécule.



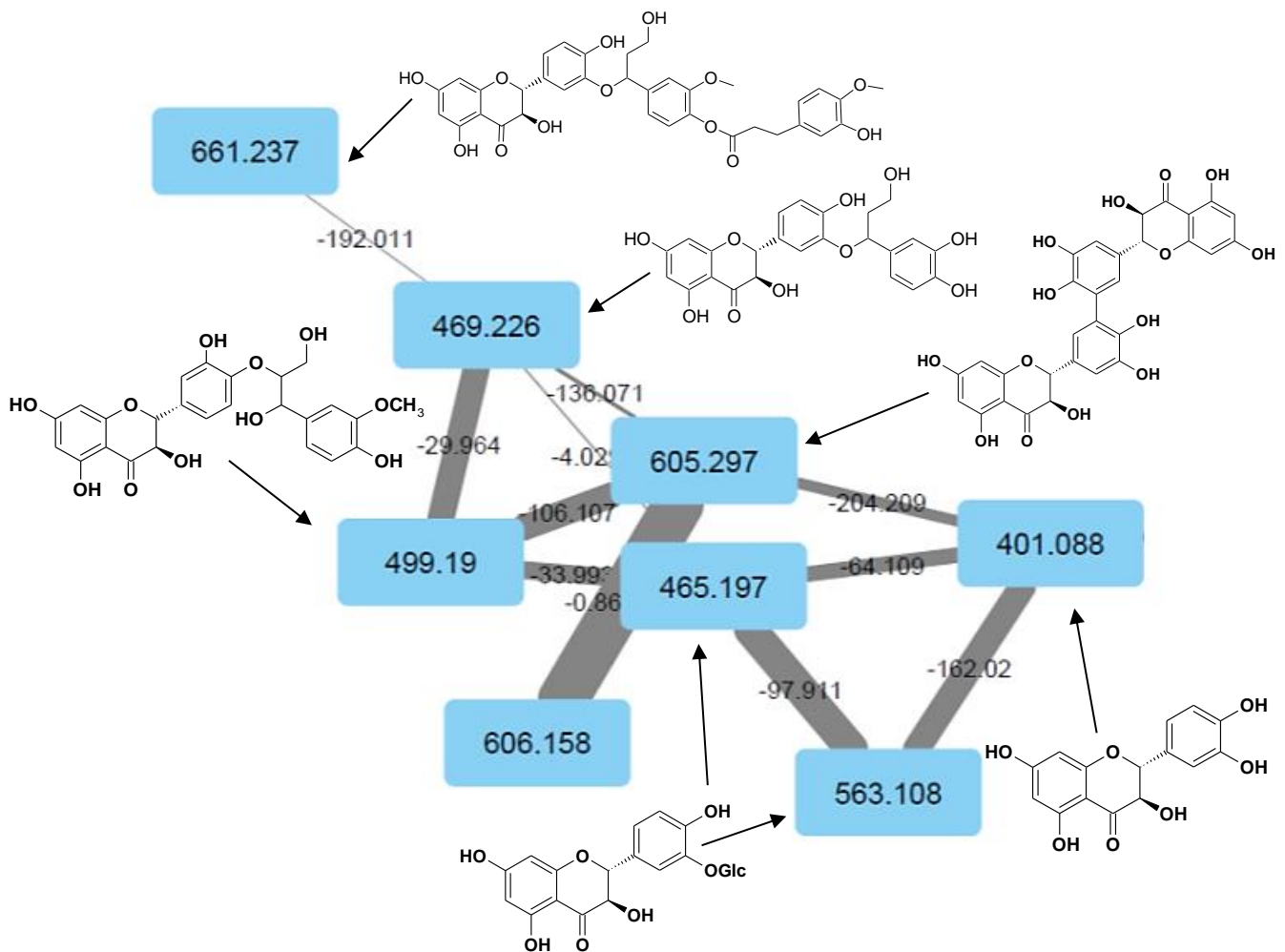


Figure 139 : Fragment d'un réseau moléculaire réalisé à partir des fractions du duramen.

Dans les réseaux moléculaires qui ont été générés l'absence de certains composés est observée. C'est le cas par exemple du dihydrokaempférol ($m/z = 287$) et de la pinobanksine ($m/z = 271$) qui sont des métabolites qui ont été identifiés dans les trois zones du bois. Certains composés non identifiés sont également absents et le phénomène est encore plus marquant lorsque les réseaux moléculaires sont générés sur GNPS. Néanmoins, certaines parties des réseaux moléculaires montrent des corrélations qui peuvent s'expliquer. C'est le cas par exemple du réseau moléculaire réalisé à partir des données de spectrométries de masse du duramen (figure 139). Au niveau d'une région du réseau, il se forme une liaison entre le composé à m/z 606 et le composé à m/z 465 qui sont des dérivés de la taxifoline identifiés précédemment. Les composés à m/z 401 et m/z 563 qui correspondent à la taxifoline + un adduit de 98 uma (H_2SO_4) et m/z 465 + 98 uma est également lié à ces deux composés. D'autres composés à m/z 469, 499 et 661 sont également corrélés aux molécules précédentes car ce sont des flavonolignanes dérivés de la taxifoline (figure 139). Mais ces informations ne sont pas suffisantes pour exploiter efficacement le réseau moléculaire car d'autres composés non identifiés ou qui n'apparaissent pas dans les résultats de LC-MS/MS sont également observés.

Les données de LC-MS/MS ont été modifiées afin d'obtenir des réseaux moléculaires exploitables. Les résultats n'ont pas été concluant car ces données modifiées n'ont pas été reconnues par GNPS. Cela est peut-être dû aux différents paramètres présents sur Cytoscape ou GNPS qui ne sont pas adaptés aux conditions d'analyse en LC-MS/MS ou aux types d'extraits utilisés. Il serait préférable d'envisager un certain nombre de modifications au niveau des conditions d'analyse des extraits en LC-MS/MS avant de réaliser les réseaux moléculaires pour avoir la possibilité d'obtenir des données de spectrométrie de masse compatible avec les paramètres présents sur GNPS.

VIII. Variation quantitative des métabolites majoritaires au cours de l'année.

C'est une méthode utilisant la spectrométrie de masse en tandem pour quantifier des molécules d'intérêts en se basant sur l'abondance d'un ou plusieurs ions fragments caractéristiques présents dans les échantillons. Des « transitions » sont effectuées en indiquant la masse de l'ion parent à fragmenter puis en surveillant un ou plusieurs ions fragments spécifiques à des temps de rétentions différents.

La quantification relative des métabolites a été réalisée en effectuant une analyse par MRM/MS des composés d'intérêts contenus dans tous les extraits ou fractions analysés précédemment en LC-MS/MS [175]. Cette analyse a permis de déterminer l'abondance des composés d'intérêts dans chacune des zones du bois de Douglas aux différentes saisons de l'année. Ce sont les composés majoritaires (identifiés ou non identifiés) dans les extraits et fractions du bois de Douglas qui ont été sélectionnés (tableau 8). Pour chaque composé, 1 à 3 transitions ont été suivies à plusieurs temps de rétentions. La première a été utilisée pour la quantification tandis que les autres sont des transitions de confirmation. Pour l'analyse des composés, les conditions d'analyses utilisées ont été différentes pour chaque composé (tableau 8). L'identité de chaque composé est confirmée par la superposition des transitions suivies sur le spectre MRM (montrant que tous les fragments ions apparaissent au même temps de rétention caractéristique à la molécule considérée). Chaque composé a été quantifié à partir de l'aire de la transition la plus intense (cf annexe 1). Ne disposant pas de témoins pour tous les composés sélectionnés, Il n'est pas possible de faire une quantification absolue. Pour chaque composé, la variabilité saisonnière est ainsi observée.

Tableau 8 : Conditions d'analyses en MRM des différents composés sélectionnés.

Composé	[M-H] ⁻ (m/z)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EC (V)	EP (V)	CXP (V)
Procyanidine C1/C2/C4	865	289	407 ; 525	90	40	10	10
659 A	659	481	329 ; 177	90	25	10	10
659 B	659	533	641	90	40	10	10
Pseudotsuganol	659	641	285	50	55	10	10
643	643	625	465 ; 519	90	40	10	10
633	633	311	285 ; 177	90	40	10	10
609	609	407	289 ; 231	50	40	10	10
[5',5'''] - bisdihydroquercétine	605	479	285 ; 179	90	55	10	10
Dimère taxifoline-quercétine	603	585	299	90	40	10	10
Procyanidine B1/B2	577	407	289 ; 245	50	40	10	10
521	521	475	169 ; 123	50	55	10	10
Taxifoline-3'-O-2(5-hydroxyconiferyl)glycerol)	515	467	271 ; 165	50	25	10	10
Dihydrodiconiferylalcohol-p-4-dihydrocoumaroyl	505	163	145 ; 327	90	40	10	10
Famille de silybine	481	453	301 ; 257 ; 179 ; 152 ; 125	90	30	8	10
Taxifoline-3'-O-Glc	465	285	217 ; 125	90	25	10	10
Quercitrine	447	301	271 ; 179	90	25	10	10
Quercétine-4'-hexenol	399	301	165 ; 97	90	25	10	10
Dérivé diphenylpropan-2-ol	349	331	269 ; 207	90	25	10	10
Hydroxymatairésinol	373	164	179 ; 355	90	40	10	10
Gibbérelline A1	347	329		50	25	10	10
3,7,12-trihydroxyabiéta-8,13-dien-18-al	333	287	315	90	40	10	10
Taxifolin-7,3'-dimethyl ether	331	303	153 ; 179	90	55	10	10
Taxifolin-7,3'-dimethyl ether	331	287	269 ; 191	90	40	10	10
Taxifoline-4-méthylether	317	289	152 ; 125	90	55	10	10
315	315	203	251 ; 269	90	40	10	10
Acide 15-hydroxy-6-èn-dihydroabietique	313	251	175 ; 146	90	25	10	10
Férule d'octyle	305	175	147	90	55	10	10
Taxifoline	303	285	125 ; 175	90	55	10	10
Quercétine	301	179	151	94	26	10	8
3-Hydroxyabiéta-8,13-dien-18-al	301	255		50	40	10	10
Acide 10-Hydroxyoctadécanoïque	299	237	271 ; 227	50	40	10	10
Acide Feruloylpentanoïque	293	249	193 ; 177	50	25	10	10
Catéchine/epicatéchine	289	245	179 ; 125	115	20	10	15
Sandaracopimarinol	287	151	135 ; 107	50	55	10	10
Dihydrokaempférol	287	259	201 ; 125	50	55	10	10
Pinobanksine	271	119	151 ; 177	50	40	10	10
265	265	95	165 ; 193	50	55	10	10
Pinocembrine	255	171	185 ; 213	90	40	10	10
Acide dihydrotodomatuique	253	235	209 ; 151	90	25	10	10

Les valeurs de DP, CE, et EP (qui devraient être négatives) sont positives pour faciliter leur insertion dans le tableau.

DP (peclustering potential) : potentiel de décomposition.

CE (collision energy) : énergie de collision utilisée pour générer l'ion fragment de quantification.

EP (entrance potential) : potentiel émis à l'entrée du spectromètre.

CXP (collision cell exit potential) : potentiel émis à la sortie de la cellule de collision.

Q1 : ion fragment de quantification

Q3 : ion fragment de confirmation

L'analyse par MRM/MS des composés sélectionnés a abouti à l'obtention de plusieurs aires de transitions dont les valeurs varient selon la zone du bois ou la saison impliquée. Pour chaque composé, au lieu de représenter la variation des aires en fonctions des saisons et des zones du bois (figure 140), les résultats ont été présentés à partir de la quantité relative de chaque composé en prenant comme référence (quantité initiale) la saison d'automne pour simplifier leur interprétation. Parmi les composés quantifiés, trois composés majoritaires ont été détectés : la taxifoline, la taxifoline-3'-O-glucoside et la quercétine.

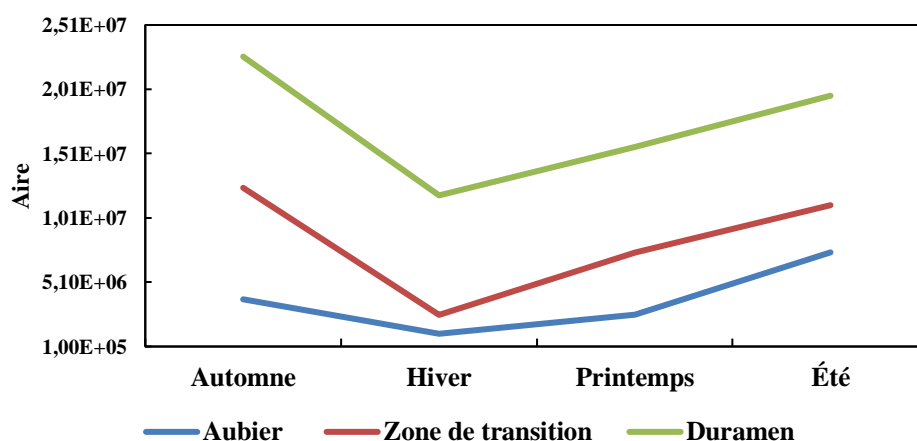


Figure 140 : Variation de l'aire de la taxifoline dans chaque zone en fonction des saisons.

Taxifoline (dihydroflavonol)

Les résultats obtenus en fonction des saisons, permettent de remarquer une variation relativement importante (figure 141). Dans l'aubier, la quantité du composé est 2 fois moins importante en hiver. Entre l'hiver et le printemps sa quantité augmente légèrement et atteint une valeur proche de celle obtenue en automne. A partir de la saison de printemps, on observe une progression significative de la quantité de taxifoline pour atteindre la valeur maximale en été qui est 2 fois plus importante par rapport à la saison d'automne. Au niveau de la zone de transition, il est observé une baisse plus significative de la quantité de la taxifoline entre

l'automne et l'hiver où elle est 4 fois plus importante. Entre l'hiver et l'été elle augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale qui est légèrement supérieure à celle obtenue en automne. Dans le duramen, l'évolution de la quantité de taxifoline au cours des saisons est similaire à ce qui est observé dans l'aubier.

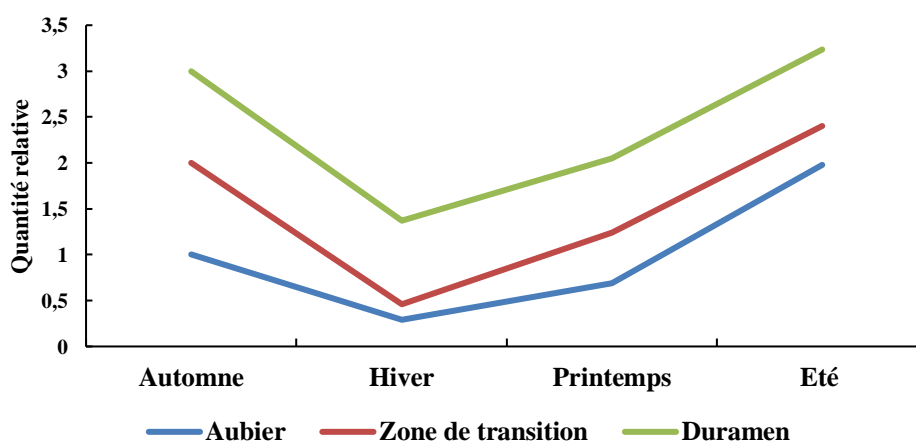


Figure 141 : Variation de la quantité relative de taxifoline au cours des saisons.

Taxifoline-3'-O-glucoside (dihydroflavonol)

Pour ce composé, l'observation de la variation de sa quantité au cours des saisons (figure 142), montre qu'au niveau de l'aubier, sa quantité est relativement stable entre l'automne et l'hiver. Au printemps sa quantité augmente progressivement pour devenir deux fois plus importante en été. Au sein de la zone de transition, la quantité du composé augmente progressivement en automne et devient deux fois importante en hiver. Entre l'hiver et le printemps, elle diminue pour atteindre une quantité proche de la valeur initiale. A partir du printemps, elle augmente progressivement et devient 3 fois plus importante en été. Dans le cas du duramen, entre l'automne et l'hiver la quantité du composé augmente progressivement et devient 2 fois plus importante. Elle reste stable entre l'hiver printemps et augmente en été où elle devient 4 fois plus importante par rapport à sa valeur initiale (automne).

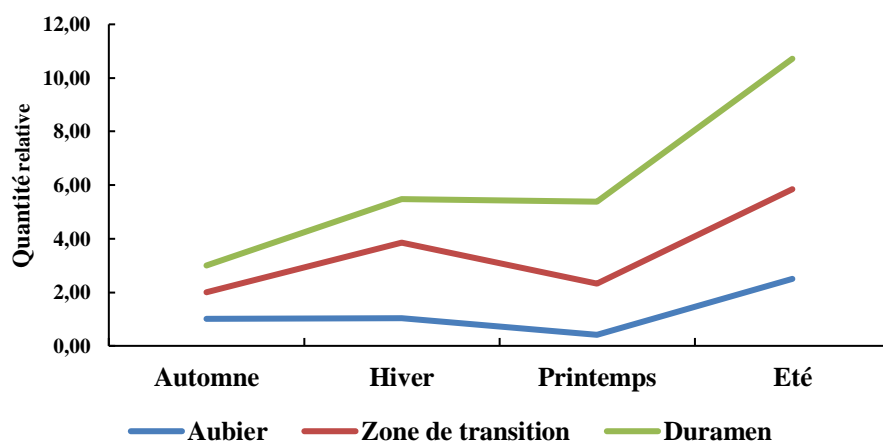


Figure 142 : Variation de la quantité relative de taxifoline-3'-O-glucoside au cours des saisons.

Quercétine (flavonol)

L'observation de l'évolution de la quantité de ce composé au cours des saisons (figure 143), montre que dans les trois zones du bois elle est deux fois plus importante en hiver. Entre l'hiver et le printemps il est observé une baisse significative de sa quantité dans l'aubier pour atteindre une valeur proche de la quantité initiale. Dans la zone de transition et le duramen, la diminution de sa quantité est moins importante entre l'hiver et le printemps mais devient plus significative entre le printemps et l'été. Dans la zone transition elle devient 2 fois moins importante par rapport à sa valeur initiale (automne).

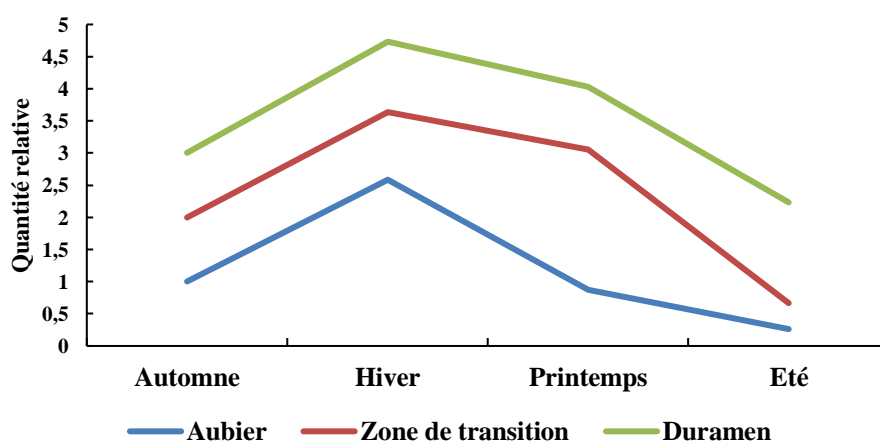
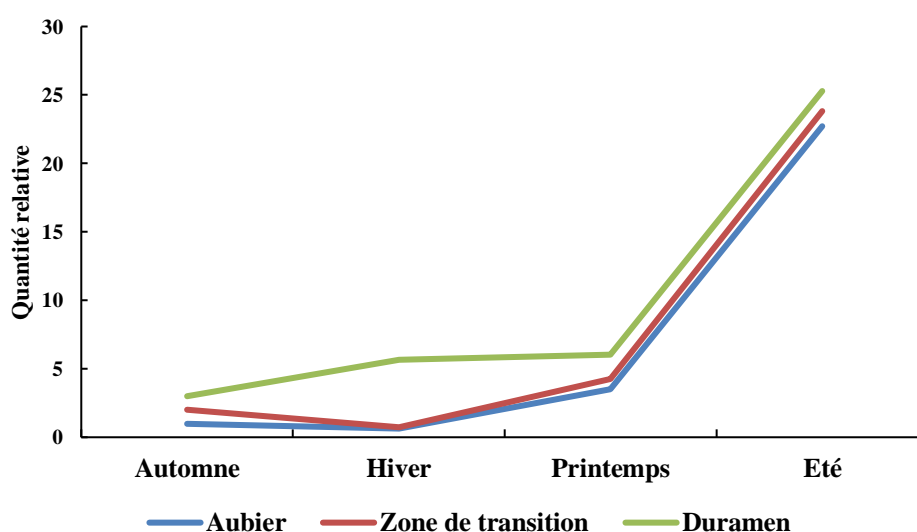


Figure 143 : Variation de la quantité relative de quercétine au cours des saisons.

Les autres composés qui sont minoritaires par rapport aux trois métabolites décrits précédemment, l'analyse a abouti à plusieurs résultats qui ont été représentés selon les différents groupes de molécules concernés.

1- Autres dihydroflavonols

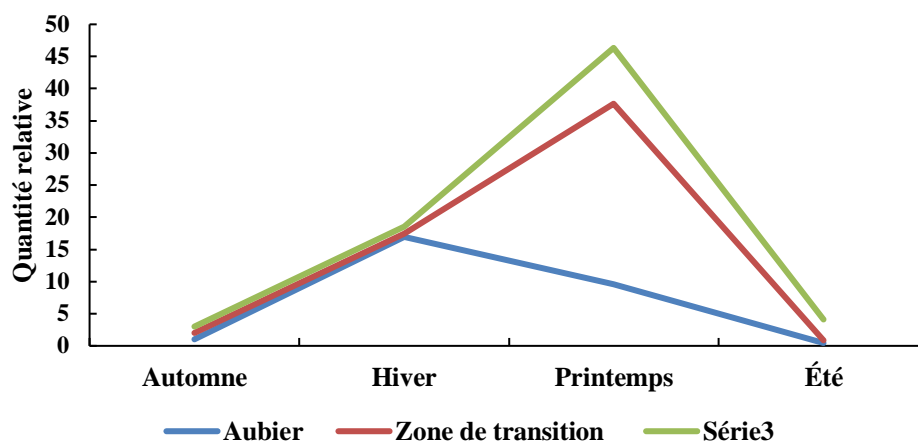
Pour cette classe de flavonoïdes, il a été constaté que parmi les 3 composés quantifiés, la taxifolin-7,3'-diméthyléther est le seul composé qui présente une variation différente de sa quantité relative au cours de l'année (figure 144 A). En effet, entre l'automne et le printemps, sa quantité est relativement stable puis augmente progressivement à partir du printemps et devient 25 fois plus importante en été (figures 144 A).



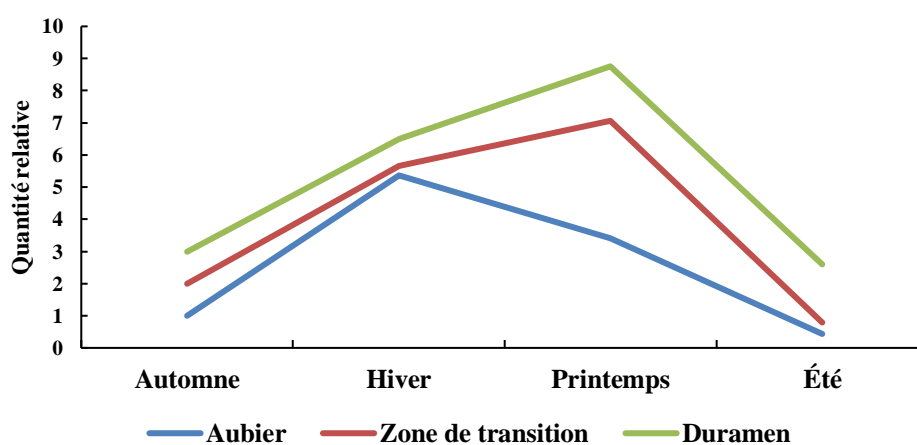
A : Taxifolin-7,3'-diméthyléther (m/z 331 ; 18,02 min)

Dans le cas du dihydrokaempférol et de la pinobanksine c'est entre l'hiver et le printemps qu'ils sont plus abondants dans le bois tandis que leur quantité est minimale en automne et en hiver (figures 144B et C). On remarque également qu'au niveau de l'aubier la quantité maximale est atteinte en hiver (5 à 15 fois plus importante) tandis que dans la zone de transition et dans le duramen elle est maximale au printemps (6 à 45 fois plus importante) (figures 2B et C). L'allure de la variation quantitative de ce composé est proche de celui de la taxifoline-3'-O-glucoside et de la taxifoline. Cela permet de supposer que la quantité des dérivées de la taxifoline dans le bois évolue de la même manière au cours de l'année.





B : Dihydrokaempférol (m/z 287 ; t_R = 14,43 min)



C: Pinobanksine (m/z 271; t_R = 20,63 min)

Figure 144 : Variation de la quantité relative des 3 dihydroflavonols au cours de l'année.

2- Flavanone

L'évolution de la quantité de relative de la pinocembrine au cours de l'année montre qu'elle atteint sa valeur maximale en hiver (5 à 6 fois plus importante) avant de baisser progressivement et atteindre sa valeur minimale qui est proche de sa quantité initiale dans le bois (figure 145). Cependant au niveau de l'aubier, entre l'hiver et le printemps la chute de la quantité de composés est plus significative que dans les autres zones du bois. Il a été remarqué également que l'allure de variation de la quantité de la pinocembre au cours des saisons est proche de celle qui a été observé au niveau de l'aubier de la pinobanksine et le dihydrokaempferol (figure 145).

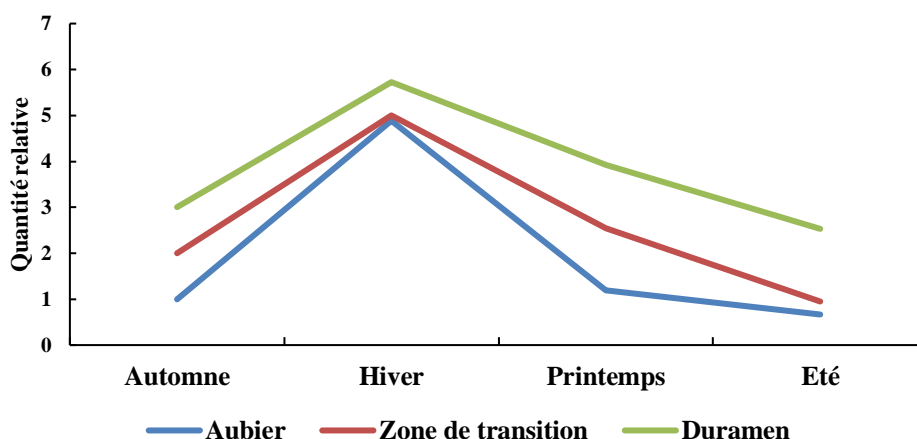


Figure 145 : Variation de la quantité relative de la pinocembrine (m/z 255 ; $t_R = 24,41$ min) au cours de l'année.

3- Flavonols

L'observation de la variation de la quantité de quercitrine (figure 146) au cours de l'année, montre qu'elle est relativement stable entre l'automne et le printemps sauf dans le cas du duramen où elle devient 4 fois plus importante en hiver et reste stable jusqu'au printemps. Entre le printemps et l'été, une augmentation progressive de la quantité du composé jusqu'à sa valeur maximale (2 à 4 fois supérieur à la valeur initiale) est observée.

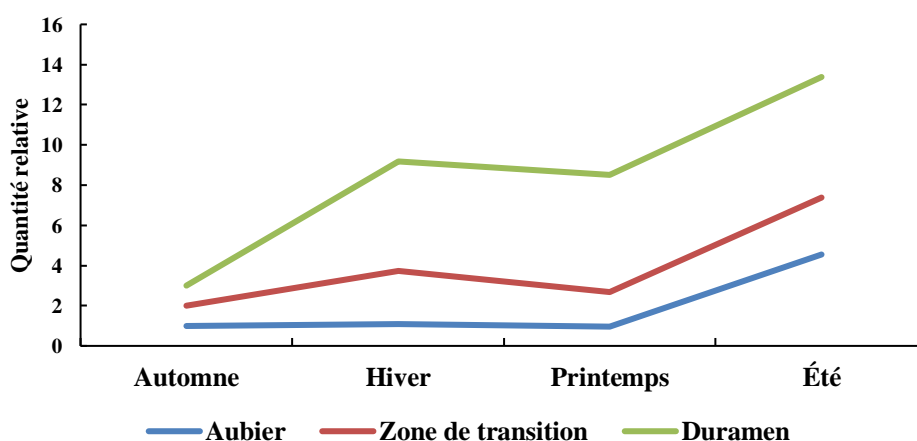


Figure 146 : Variation de la quantité relative de la quercitrine (m/z 447 ; $t_R = 11,78$ min) au cours de l'année



4- Flavan-3-ol

La catéchine et l'épicatéchine sont deux isomères qui ont pu être identifiés en MRM. Après avoir suivi les transitions 289→245, 289→179, et 289→125 au cours du temps puis corrélé les informations obtenues avec les données de la littérature (référence), sur le spectre MRM il a été déduit que le composé à 7,42 min correspond à la catéchine tandis que l'épicatéchine a été identifié comme étant le composé à 8,05 min (figure 147).

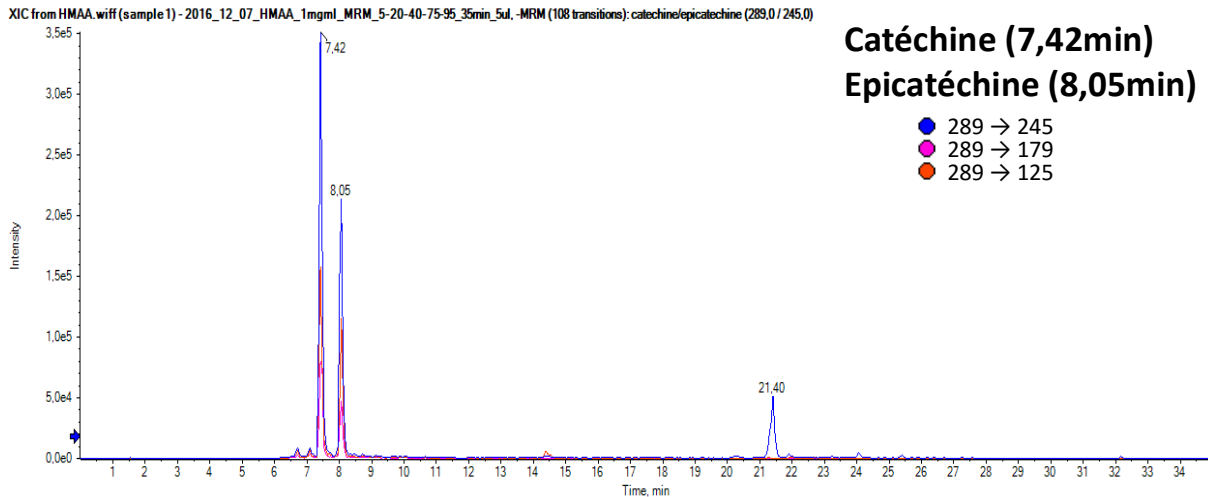
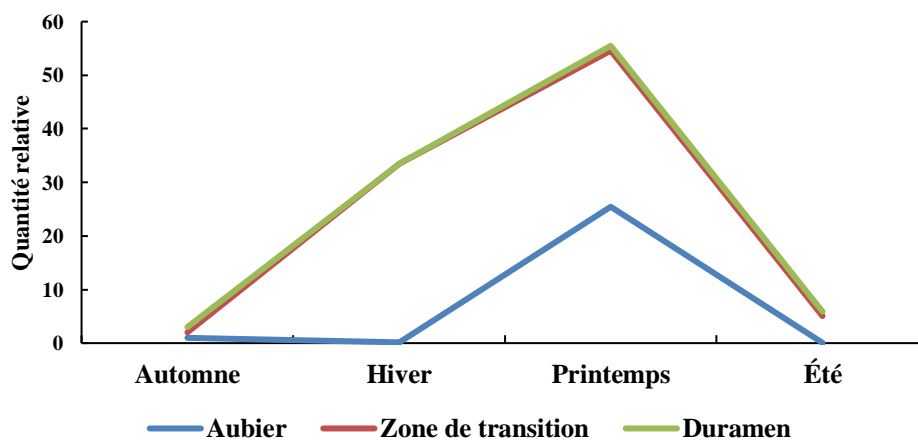
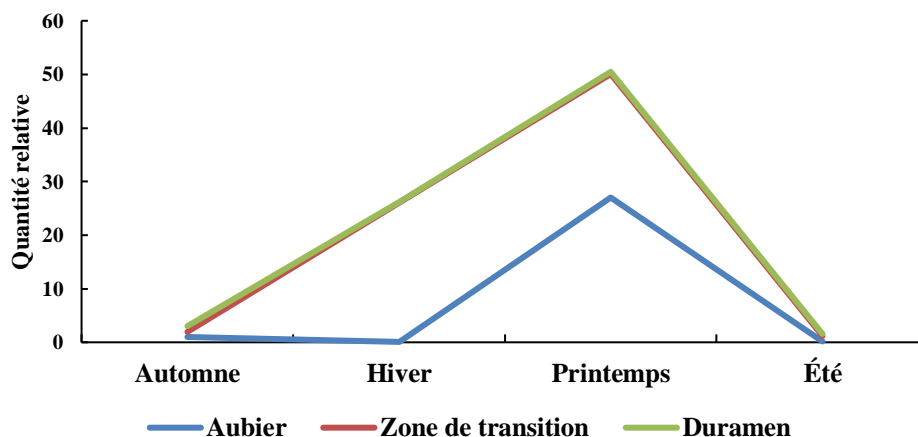


Figure 147 : Chromatogramme MRM de la catéchine et l'épicatéchine

L'évolution de la quantité de ces deux isomères au cours de l'année est similaire. Elle est maximale au printemps et 20 à 50 fois supérieure à sa valeur initiale. Cependant dans l'aubier ces isomères sont absents une partie de l'hiver tandis que dans la zone de transition et le duramen ils y sont présent en quantité importante au cours de cette saison. Ces isomères sont également peu présents ou absents en été dans les trois zones du bois (figures 148A et B).



A : Catéchine (m/z 289 ; t_R = 7,42 min)

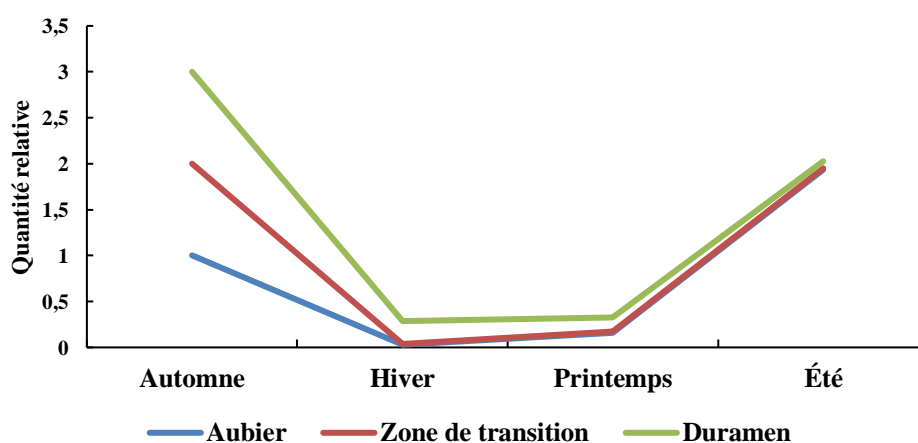


B : Epicatechine (m/z 289 ; $t_R = 8,05$ min)

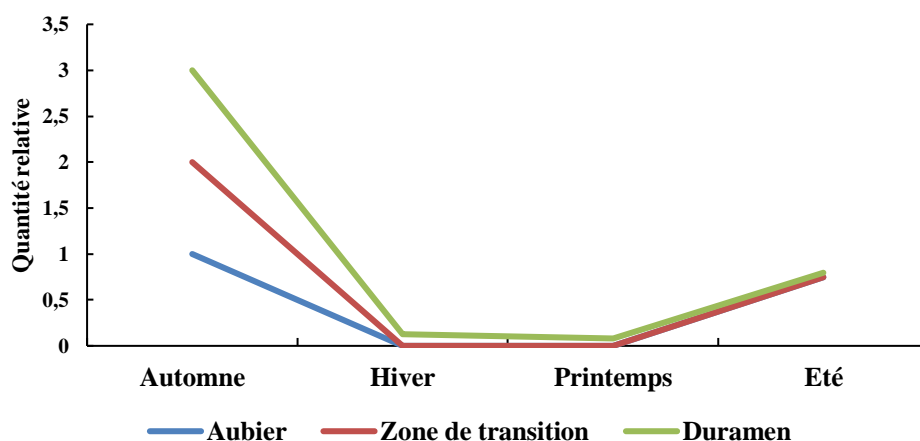
Figure 148 : Variation de la quantité relative des deux flavan-3-ol au cours de l'année.

5- Dimères de flavonoïdes

L'observation de la variation de la quantité de [5',5''']-bisdihydroquercétine et du dimère de taxifoline et quercitrine, montre une similarité dans son évolution au cours de l'année (figures 149A et B). En effet, sa valeur est maximale en automne puis elle baisse progressivement et devient 3 fois moins importante en hivers. Entre l'hiver et le printemps ces deux composés sont absents ou présents en très faible quantité dans le bois. Entre le printemps et l'été on observe une augmentation de leur quantité sans atteindre la valeur maximale.



A : [5',5'''] -bisdihydroquercétine (m/z 605 ; $t_R = 18,64$ min)



B : Dimère de taxifoline et quercétine (m/z 603 ; t_R = 18,64 min)

Figure 149 : Variation de la quantité relative des deux dimères de flavonoïdes au cours de l'année

6- Flavonolignanes

L'isosilybine A et la silybine B sont deux isomères qui ont pu être distingués en MRM. Le suivi des transitions pour le composé à m/z 481 dont le fragment ion de quantification est à m/z 453 et les ions de confirmation sont à m/z 301, 257, 179, 152, 125 a permis d'identifier le composé à 19,35 min comme étant la silybine B et celui à 20,44 min comme étant isosilybine A (figure 150).

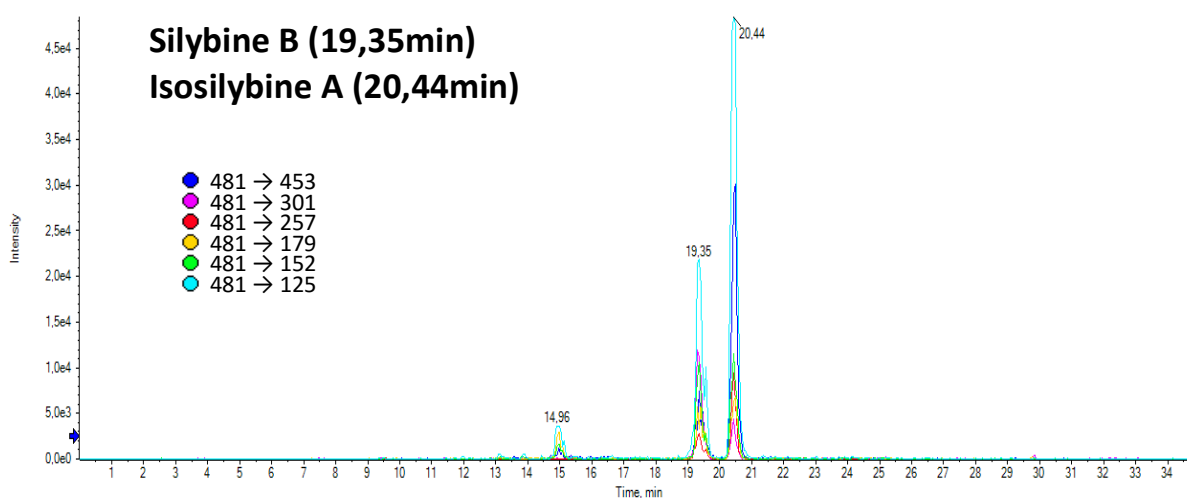


Figure 150 : Chromatogramme MRM de la silybine B et l'isosilybine A.

La littérature a permis de confirmer l'identité de ces deux isomères [126]. Comme dans le cas de la catéchine et de l'épicatéchine, la quantité de ces deux isomères évoluent similairement au cours de l'année (figure 151A et B). Ces composés sont abondants en l'hiver et au printemps. Dans l'aubier c'est en hiver qu'il atteint sa quantité maximale (6 fois plus importante) tandis que dans la zone de transition et le duramen les valeurs maximales sont atteintes au printemps (4 à 6 fois plus importante). Au printemps et l'été on observe une baisse significative de la quantité du composé qui reprend sa valeur initiale.

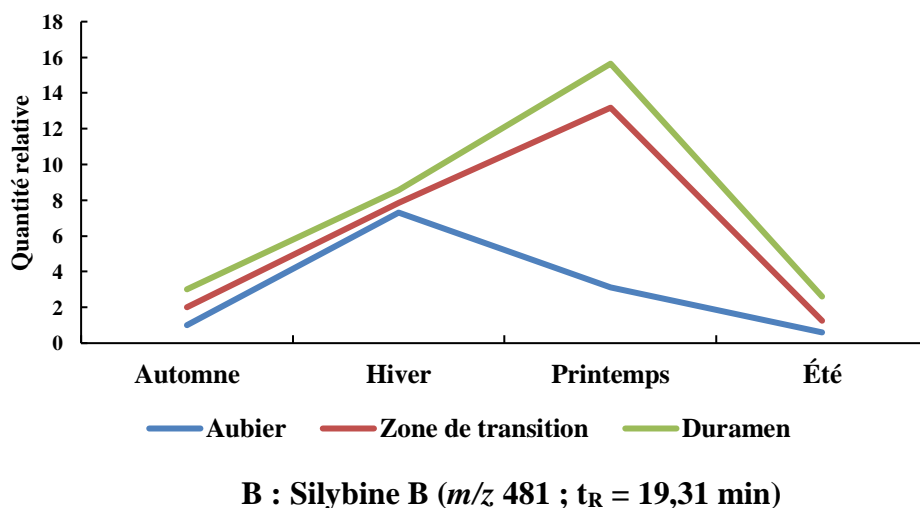
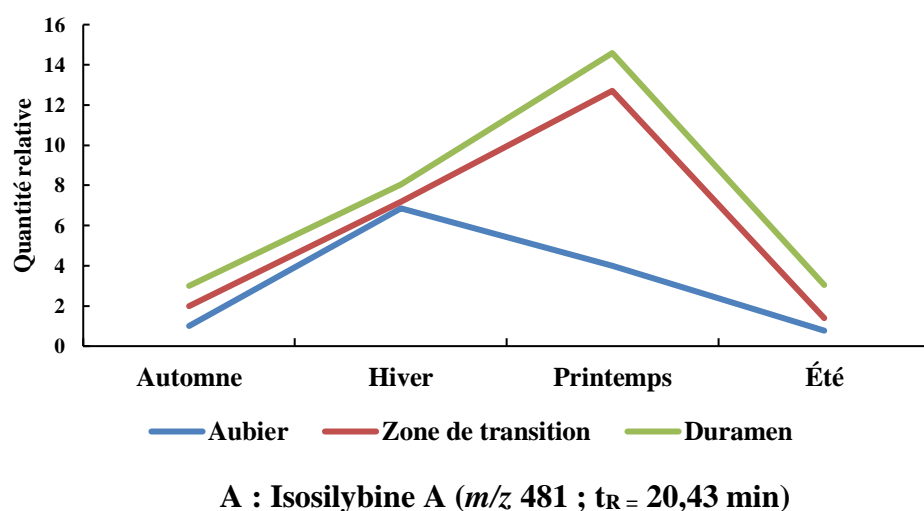


Figure 151 : Variation de la quantité relative des deux flavonolignanes au cours de l'année.



7- Lignanes

La variation de la quantité de 7-hydroxymatairésinol au cours de l'année, montre qu'elle diffère selon la zone du bois concernée (figure 152). En effet, dans l'aubier sa quantité est très faible et presque constante aux cours des saisons. Au niveau de la zone de transition, elle est également très faible et varie légèrement. Au printemps elle atteint sa valeur maximale et sa valeur minimale est atteinte en hiver et en été.

Dans le cas du duramen, on observe une variation importante de la quantité du composé qui augmente progressivement entre l'automne et l'hiver où elle triple et atteint sa valeur maximale avant de baisser légèrement à la saison d'été (elle devient deux fois plus importante par rapport à sa valeur initiale).

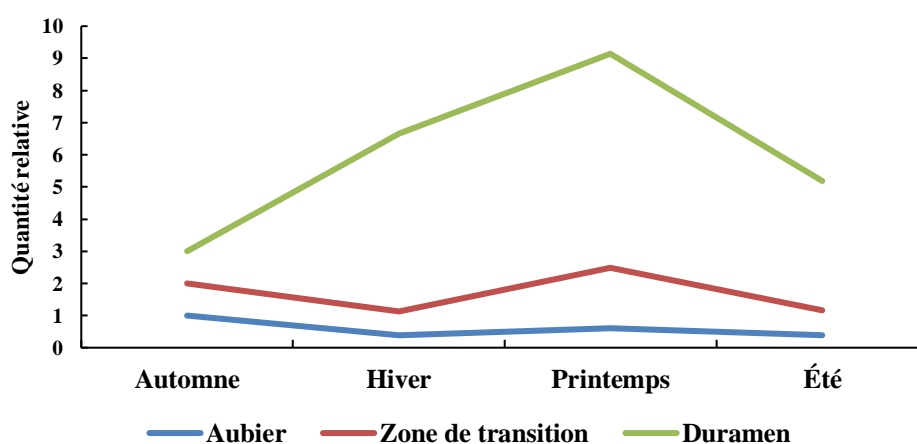


Figure 152 : Variation de la quantité relative du 7-hydroxymatairésinol (m/z 373) au cours de l'année.

8- Dérivé diphénylpropane

L'observation de l'évolution de la quantité de ce composé au cours de l'année, montre qu'en fonction de la zone du bois concerné les variations sont distinctes (figure 153). Dans l'aubier et la zone de transition, son évolution est similaire avec une augmentation progressive jusqu'en hiver où elle atteint sa valeur maximale (30 à 40 fois plus importante par rapport à sa quantité initiale). Cependant dans le cas de l'aubier elle reste constante entre l'hiver et le printemps.

Dans le cas duramen on observe une augmentation significative de la quantité du composé entre l'automne et l'hiver où elle atteint sa valeur maximale (50 fois plus importante). Entre

l'automne et l'hiver, on observe une baisse légère de la quantité du composé avant d'atteindre fois de plus sa valeur maximale en été.

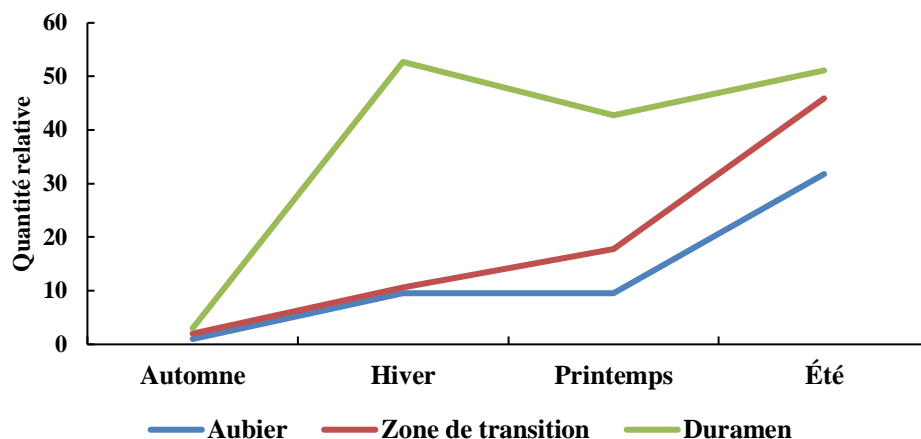


Figure 153 : Variation de la quantité relative du méthyl-3-[3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxypropyl]-2,4,6-trihydroxybenzoate (m/z 349 ; $t_R = 10,49$ min) au cours de l'année.

9- Terpènes

La variation de la quantité de l'acide dihydrotodomatuique au cours de l'année, montre qu'elle diffère selon la zone du bois concernée (figure 154). En effet, dans le cas de l'aubier elle augmente progressivement et est presque de 2 supérieure en hiver. Au printemps on note une baisse de la quantité du composé qui atteint sa valeur minimale légèrement inférieure à sa valeur initiale. En été, elle augmente et atteint sa valeur maximale (2 fois supérieur à la quantité initiale)

Dans la zone de transition et le duramen, on observe une diminution de la quantité du composé entre l'automne et le printemps où elle atteint sa valeur minimale (2 à 3 fois inférieur à sa quantité initiale) puis entre le printemps et l'été, elle augmente significativement et atteint sa valeur initiale.

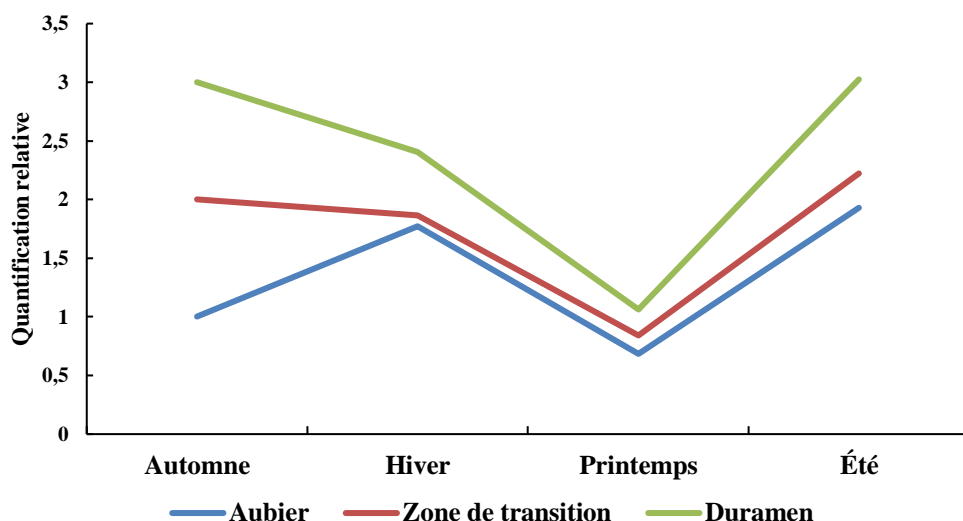


Figure 154 : Variation de la quantité de l'acide dihydroxydomatonique (m/z 253 ; $t_R = 25,57$ min) au cours de l'année.

L'observation de l'évolution de la quantité du composé à m/z 347 (figure 155) au cours de l'année, montre qu'en fonction de la zone du bois concerné les variations sont distinctes. Dans l'aubier et la zone de transition, sa quantité est relativement constante au cours de l'année. Dans le cas du duramen on observe une augmentation significative de la quantité du composé entre l'automne et l'hiver où elle atteint sa valeur maximale (3 fois supérieur à sa quantité initiale). Entre l'automne et l'hiver, une baisse légère de la quantité du composé est observée avant d'augmenter entre été et atteindre une valeur proche de sa quantité maximale.

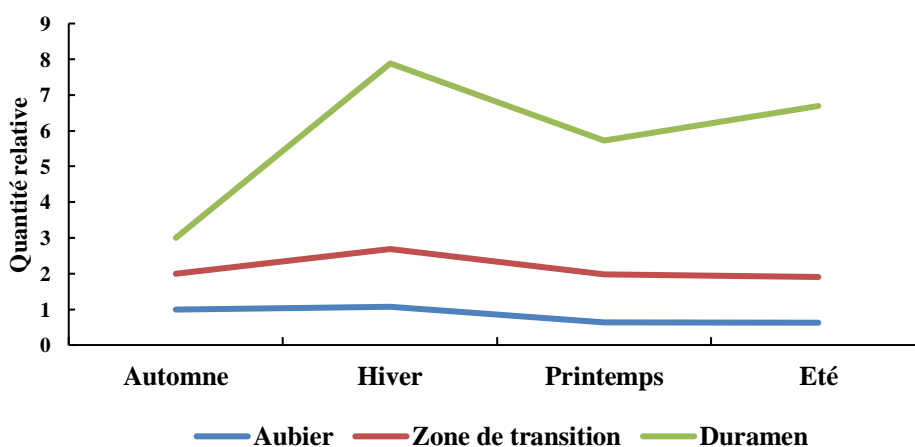


Figure 155 : Variation de la quantité du composé à m/z 347 ($t_R = 25,02$ min) au cours de l'année.

10- Composés non identifiés

Plusieurs composés non identifiés ont été sélectionnés pour réaliser leur quantification relative par MRM au cours de l'année. Les résultats ont montré que l'évolution de leur quantité au cours des saisons diffère selon le composé considéré. Cependant, on remarque que pour la majorité des composés (12 composés) leur quantité est maximale en été. Le printemps est la deuxième saison dans laquelle on observe une forte quantité de métabolites non identifié (4 composés). L'hiver et l'automne sont les saisons dans lesquelles on note une faible teneur en composés non identifié (0 à 2 composés).

Bilan des résultats de quantification

Après avoir observé la variation de la quantité relative des composés au cours des saisons, on remarque qu'elle est plus élevée dans le duramen suivi de la zone transition et l'aubier. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle le duramen serait la zone qui accumulerait la majorité des métabolites responsables de la durabilité naturelle du bois [5] car la plupart de ces métabolites possèdent des propriétés antifongiques, antioxydantes et antibactériennes. Cependant, l'évolution de la quantité est variable selon la molécule étudiée. Par ailleurs, il a été constaté, dans le cas de la majorité de composés analysés, que l'été et le printemps sont des saisons qui sont propices à une forte concentration de ces métabolites dans le bois de Douglas. De plus, au printemps, plusieurs polyphénols (catéchine, épicatechine, pinobanksine, dihydrokaempferol) identifiés atteignent leur quantité maximale. Cela peut s'expliquer par la biosynthèse de molécules protectrices ou osmotiques actives pour faire face à la sécheresse. Ces composés joueraient un rôle dans l'ajustement osmotique en condition hydrique et seraient également des antioxydants [176].

Dans le cas de certains composés comme la quercétine, la quantité du composé est maximale en hiver. Cela pourrait être dû à l'activité métabolique qui devient intense à cette période de l'année pour permettre à l'arbre de résister au froid. En effet, elle correspond à la phase de dormance du cycle saisonnier des cellules du cambium. Pendant cette phase de dormance, il se produit une intense activité métabolique entraînant l'accumulation de molécules telles que les polyphénols, les lipides et les protéines [177].

Conclusion

Le sapin de Douglas est un arbre qui possède un bois présentant de nombreuses qualités telles qu'une croissance rapide, une adaptation physiologique, une résistance mécanique et une durabilité naturelle intermédiaire. Cette dernière qualité permet au bois de Douglas de se protéger contre les agressions extérieures comme les champignons, les insectes et d'autres microorganismes pathogènes. Cette résistance du bois de Douglas serait dû à la présence de métabolites secondaires principalement retrouvés dans le duramen et qui seraient responsables de la protection du bois contre les agents pathogènes extérieurs par des mécanismes complexes. Le bois de Douglas est ainsi un matériau qui présente un intérêt majeur dans la construction des meubles, bâtiments ou maisons en raison de ses nombreuses qualités naturelles.

Ce travail a été réalisé suivant deux axes majeurs qui sont d'une part l'identification des métabolites secondaires et leur répartition au sein du bois et d'autre part la comparaison des profils métaboliques d'échantillons de bois de Douglas prélevé aux 4 saisons.

Dans un premier temps des extractions acétonique aqueux ont été réalisées à partir des 3 zones du bois (duramen, aubier et zone de transition) sur l'échantillon prélevé à l'automne. Ces extraits ont été fractionnés, ce qui a conduit à l'isolement et l'identification de 4 composés majoritaires : la taxifoline, la quercétine, l'acide dihydrotodomatuique et l'acide-4 p-tolyvalérique.

Dans un deuxième temps l'analyse en LC-MS/MS des extraits et des fractions a été réalisée et a permis l'identification d'une cinquantaine de métabolites parmi lesquels les polyphénols, les terpènes et acides gras et d'autres groupes de composés tels que les acides alcanoïques. Les polyphénols sont largement majoritaires et les flavonoïdes sont les composés prédominants, dans toutes les zones du bois.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle le duramen serait la zone responsable de la durabilité naturelle du bois car un grand nombre de métabolites ont été observés au niveau de cette zone.

Enfin, des extractions acétoniques aqueuses ont été réalisées sur des échantillons de bois prélevés aux différentes saisons de l'année. Le profil chromatographique obtenu par LC-MS/MS a été complété par une quantification relative des métabolites par MRM des extraits de bois récoltés aux 4 saisons de l'année. Ces résultats ont permis de mettre en évidence

l'accumulation des métabolites dans le bois de Douglas. Le printemps semble être la période favorable pour la récolte de bois de Douglas en raison de son utilisation dans la construction

Ces informations pourront être utiles dans l'amélioration de la durabilité du bois de Douglas qui fait partie de la Chaire d'excellence « Ressources Forestières et Usages du Bois » dont est inclus ce travail de thèse. Cependant, pour confirmer les hypothèses proposées, il serait intéressant d'envisager de refaire les travaux sur plusieurs échantillons de bois du même génotype et de génotypes différents. Il serait aussi utile d'envisager l'analyse en GC-MS (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) des extraits de bois de Douglas afin de déterminer la présence de composés volatiles comme les terpènes dont les propriétés insecticides et antifongiques sont très largement décrites dans la littérature.



Références bibliographiques

1. Trouy-Triboulot, M.-C., Triboulot, P. (2001). Matériau bois: Structure et caractéristiques. *Techniques de l'ingénieur. Construction*, (C925), C925–1.
2. Bréon, F.-M., & Luneau, G. (2015). *Atlas du climat: Face aux défis du réchauffement*. Autrement.
3. Bary-Lenger, A., Pierson, J., et Poncelet, J. (1999). *Transformation, utilisation et industries du bois en Europe*. Editions du Perron.
4. Ponette, Q., Ranger, J., Ottorini, J.-M., & Ulrich, E. (2001). Aboveground biomass and nutrient content of five Douglas-fir stands in France. *Forest Ecology and Management*, 142(1–3), 109–127.
5. Dellus, V., Mila, I., Scalbert, A., Menard, C., Michon, V., et Herve du Penhoat, C. M. (1997). Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochemistry*, 45(8), 1573–1578.
6. Riou-Nivert, P. (2001). *Les résineux : Connaissance et reconnaissance*. Forêt privée française.
7. Roland, J.-C., Roland, F., Bouteau, F., et Bouteau, H. E. M. (2008). *Atlas de biologie végétale - Tome 2 - 9ème édition - Organisation des plantes à fleurs*. Dunod.
8. Boullard, B. (1988). *Dictionnaire de botanique*. Ellipses.
9. Detienne, P. (1988). *Cours illustré d'anatomie des bois*. Editions Quae.
10. Boutin, V., Fogelgesang, J.-F., Beaux, J.-F., et Ribola, F. (2010). *Atlas de Biologie végétale BCPST 1re et 2e années*. Dunod.
11. Yamada, T. (2001). Defense mechanisms in the sapwood of living trees against microbial infection. *Journal of Forest Research*, 6(3), 127–137.
12. Shaine Tyson, K., Rymes, M., et Hammond, E. (1996). Future potential for MSW energy development. *Biomass and Bioenergy*, 10(2–3), 111–124.
13. Hillis, W. E. (1999). The Formation of Heartwood and Its Extractives. In J. T. Romeo (Ed.), *Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Plant Defense* (pp. 215–253). Springer US.
14. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., et Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
15. Loewus, F. (2012). *The Structure, Biosynthesis, and Degradation of Wood*. Springer Science et Business Media.
16. Hillis, W. E. (n.d.). (1968). Chemical aspects of heartwood formation. *Wood Science and Technology*, 2(4), 241–259.
17. Huang, J., Qi, R., Pang, M., Liu, C., Li, G., et Zhang, Y. (2016). Isolation, chemical characterization and immunomodulatory activity of naturally acetylated hemicelluloses from bamboo shavings. *Journal of Zhejiang University Science B*, 1.
18. Gibeaut, D. M., et Carpita, N. C. (1994). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *The FASEB Journal*, 8(12), 904–915.
19. Mauseth, J. D. (1988). *Plant anatomy* (Vol. 560). Benjamin/Cummings Publ. Co.: Menlo Park, Calif.

20. McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., et Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 625–663.
21. Lloyd, C. W. (1991). *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. London, etc.: Academic Press.
22. Fengel, D., et Wegener, G. (1983). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
23. Haluk, J. P. (2005). Les arbres à parfums.
24. Rowell, R. M. (2005). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. CRC Press.
25. Morot-Gaudry, J.-F., Moreau, F., Prat, R., Maurel, C., et Sentenac, H. (2017). *Biologie végétale : Nutrition et métabolisme - 3e éd.* Dunod.
26. Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
27. Krassig. (1993). *Cellulose*. CRC Press.
28. Kamide, K. (2005). *Cellulose and Cellulose Derivatives*. Elsevier.
29. Joseleau, J.-P., Chambat, G., et Chumpitazi-Hermoza, B. (1981). Solubilization of cellulose and other plant structural polysaccharides in 4-methylmorpholine N-oxide: an improved method for the study of cell-wall constituents. *Carbohydrate Research*, 90(2), 339–344.
30. Navi, P., et Heger, F. (2005). *Comportement thermo-hydrromécanique du bois: Applications technologiques et dans les structures*.
31. Pettersen, R. C. (1984). The chemical composition of wood. *The chemistry of solid wood*, 207, 57–126.
32. Scheller, H. V., et Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, 263–289.
33. Agriculture, U. S. D. of. (2011). *The Encyclopedia of Wood*. Skyhorse Publishing, Inc.
34. Caffall, K. H., et Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900.
35. Stephen, A. M. (1995). *Food Polysaccharides and Their Applications*. CRC Press.
36. Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., et Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1–2), 109–121.
37. Jarvis, M. C. (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant, Cell & Environment*, 7(3), 153–164.
38. Renard, C. M. G. C., Thibault, J.-F., Mutter, M., Schols, H. A., et Voragen, A. G. J. (1995). Some preliminary results on the action of rhamnogalacturonase on rhamnogalacturonan oligosaccharides from beet pulp. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(6), 333–336.
39. Sjostrom, E. (2013). *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Elsevier. Retrieved from
40. Ekman, R. (1979). *Distribution of lignans in Norway spruce*. Åbo Akademi
41. Bertaud, F., et Holmbom, B. (2004). Chemical composition of earlywood and latewood in Norway spruce heartwood, sapwood and transition zone wood. *Wood Science and Technology*, 38(4), 245–256.
42. Cassab, G. I. (1998). Plant cell wall proteins. *Annual review of plant biology*, 49(1), 281–309.
43. Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C. J., et Bacic, A. (2010). Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant physiology*, 153(2), 403–419.

44. Schorger, A. W. (1917). The oleoresin of Douglas fir. *Journal of the American Chemical Society*, 39(5), 1040–1044.
45. Bohlmann, J., Phillips, M., Ramachandiran, V., Katoh, S., et Croteau, R. (1999). cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of Four New Monoterpene Synthase Members of the Tpsd Gene Family from Grand Fir (*Abies grandis*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368(2), 232–243.
46. Phillips, M. A., et Croteau, R. B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*, 4(5), 184–190.
47. Wagner, M. R., Clancy, K. M., Lieutier, F., et Paine, T. D. (2007). *Mechanisms and Deployment of Resistance in Trees to Insects*. Springer Science & Business Media.
48. Kininmonth, J. A., Whitehouse, L. J., et others. (1991). *Properties and uses of New Zealand radiata pine. Volume one-wood properties*. Forest Research Institute.
49. Jean, Bruneton. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. Lavoisier.
50. Oleson, K. R., et Schwartz, D. T. (2016). Extractives in Douglas-fir forestry residue and considerations for biofuel production. *Phytochemistry Reviews*, 15(5), 985–1008.
51. Hemingway, R. W., et Laks, P. E. (2012). *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance* (Vol. 59). Springer Science & Business Media.
52. Taylor, A. M., Gartner, B. L., et Morrell, J. J. (2002). Heartwood formation and natural durability-a review.
53. Harborne, J. B. (2013). *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. Springer.
54. Takayoshi Higuchi, Y. O. (1969). Biochemical Aspects of Heartwood Formation With Special Reference to the Site of Biogenesis of Heartwood Compounds.
55. Taylor, A. M., Gartner, B. L., et Morrell, J. J. (2002). Heartwood formation and natural durability-a review.
56. Higuchi, T., Fukazawa, K., et Shimada, M. (1967). Biochemical studies on the heartwood formation. *Research bulletins of the college experiment forests hokkaido university*, 25(1), 167–193.
57. Hemingway, R. W., et Laks, P. E. (2012). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. Springer Science & Business Media.
58. Hathway, D. E. (1962). CHAPTER 4 - The Lignans. In W. E. HILLIS (Ed.), *Wood Extractives and their Significance to the Pulp and Paper Industries* (pp. 159–190). Academic Press.
59. Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 371–390.
60. Zakzeski, J., Bruijninx, P. C., Jongerius, A. L., et Weckhuysen, B. M. (2010). The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical reviews*, 110(6), 3552–3599.
61. Suzuki, S., et Umezawa, T. (2007). Biosynthesis of lignans and norlignans. *Journal of Wood Science*, 53(4), 273–284.
62. Marcotullio, M. C., Pelosi, A., et Curini, M. (2014). Hinokinin, an emerging bioactive lignan. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(9), 14862–14878.
63. Ayres, D. C., et Loike, J. D. (1990). *Lignans: chemical, biological, and clinical properties*. Cambridge [England]; New York: Cambridge University Press.
64. Fang, J.-M., Jan, S.-T., et Cheng, Y.-S. (1985). (+)-Calocedrin, a lignan dihydroanhydride from *Calocedrus formosana*. *Phytochemistry*, 24(8), 1863–1864.
65. Harborne, J. B. (1989). Flavonoids. In J. W. Rowe (Ed.), *Natural Products of Woody Plants* (pp. 533–570).

66. Leonard, E., Yan, Y., Chemler, J., Matern, U., Martens, S., et Koffas, M. A. (2008). Characterization of dihydroflavonol 4-reductases for recombinant plant pigment biosynthesis applications. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(3), 243–251.
67. Patel, R. N. (1967). Wood anatomy of podocarpaceae indigenous to New Zealand: 2. Podocarpus. *New Zealand journal of botany*, 5(3), 307–321.
68. Pacheco, H., Cronenberger, L., et Mentzer, C. (1957). Flavone compounds of wood extracts. V. Water-soluble derivatives of sweet cherry heart (*Prunus avium*). *Bulletin de la Société de chimie biologique*, 39(4), 439.
69. Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162–169.
70. Khanbabaee, K., et Van Ree, T. (2001). Tannins : classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641–649.
71. Lavender, D. P., et Hermann, R. K. (2014). Douglas-fir : The Genus *Pseudotsuga*. Corvallis, OR: Forest Research Publications Office, Oregon State University.
72. Hubert, M., et Courraud, R. (2002). *Élagage et taille de formation des arbres forestiers*. Forêt privée française.
73. Turner, N. J. (2009). Plantes aromatiques dans l'alimentation et la médecine des régions Nord-Ouest de l'Amérique du Nord. *Phytothérapie*, 7(3), 135–146.
74. Bennett, B. C., et Prance, G. T. (2000). Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of Northern South America. *Economic Botany*, 54(1), 90–102.
75. Herzog, T., Krippner, R., et Lang, W. (2007). *Construire des façades*. PPUR presses polytechniques.
76. Natterer, J. (2004). *Construction en bois : matériau, technologie et dimensionnement*. PPUR presses polytechniques.
77. Benoit, Y. (2011). *Le guide des essences de bois : 74 essences, les choisir, les reconnaître, les utiliser - 13 nouvelles essences*. Editions Eyrolles.
78. Rowe, J. W. (1989). *Natural Products of Woody Plants Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from
79. Howes, F. N., et others. (1949). Vegetable gums and resins. Waltham, Mass., U.S.A. : Chronica Botanica Co.,
80. Srinivas, K., de Carvalho Oliveira, F., Teller, P. J., Gonçalves, A. R., Helms, G. L., et Ahring, B. K. (2016). Oxidative degradation of biorefinery lignin obtained after pretreatment of forest residues of Douglas Fir. *Bioresource Technology*, 221, 394–404.
81. Conner, A. H., et Foster, D. O. (1981). Triterpenes from Douglas fir sapwood. *Phytochemistry*, 20(11), 2543–2546.
82. Foster, D. O., Zinkle, D. F., et Conner, A. H. (1980). Tall oil precursors of Douglas-fir. *Tappi;(United States)*, 63(12).
83. Sakai, T., et Hirose, Y. (1973). Absolute Configurations of (+)-Methyl Todomatuate and Its New Analogues, Pseudotsugonal and ar-Pseudotsugonal, Isolated from Douglas-Fir Wood. *Chemistry Letters*, 2(5), 491–494.
84. Fischer, F., Koch, H., Borchers, B., Hontsch, R., et Pruzina, K. D. (1981). Preparation and use of phytosterols from wood. *Pharmazie*, 36(7), 456–462.
85. Krauze-Baranowska, M., Sowiński, P., Kawiak, A., et Spzarak, B. (2013). Flavonoids from *Pseudotsuga menziesii*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(3–4), 87–96.

86. Foo, L. Y., et Karchesy, J. J. (1991). Procyanidin tetramers and pentamers from Douglas fir bark. *Phytochemistry*, 30(2), 667–670.
87. Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S., et Gérardin, P. (2015). Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Annals of forest science*, 72(2), 277–284.
88. Kaundun, S. S., Lebreton, P., et Bailly, A. (1998). Needle flavonoid variation in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*) populations. *Canadian journal of botany*, 76(12), 2076–2083.
89. Foo, L. Y., et Karchesy, J. (1989). Pseudotsuganol, a biphenyl-linked pinoresinol-dihydroquercetin from douglas-fir bark: isolation of the first true flavonolignan. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (4), 217–219.
90. Squire, G. B., Swan, E. P., et Wilson, J. W. (1967). Untersuchung der Verteilung von Flavonoiden innerhalb der Jahresringe in Douglasie mittels einer neuen Mikrotechnik. *Pulp and Paper Magazine of Canada*, 68(9), T431–T437.
91. Fougerousse, M. (1960). Durabilité naturelle du bois. *Revue Bois d Forêts des Tropiques*, (73), 43.
92. Rudman, P., et Da Costa, E. W. B. (1961). The causes of natural durability in timber. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 15(1), 10–15.
93. Guillaumin, J.-J. (2005). *L'armillaire et le pourridié-agaric des végétaux ligneux*. Editions Quae.
94. Kutnik, M., et Bagnères, A.-G. (2005). Les termites : outils de détermination des espèces (cas des Reticulitermes en Europe). *Bois et forêts des tropiques*, (283), 1.
95. Bouget, C., Brustel, H., et Nageleisen, L.-M. (2005). Nomenclature des groupes écologiques d'insectes liés au bois : synthèse et mise au point sémantique. *Comptes Rendus Biologies*, 328(10), 936–948.
96. Green, D. J., Shortle, W. C., et Shigo, A. L. (1981). Notes: compartmentalization of discolored and decayed wood in red maple branch stubs. *Forest Science*, 27(3), 519–522.
97. Shain, L. (1967). Resistance of sapwood in stems of loblolly pine to infection by *Fomes annosus*. *Phytopathology*, 57, 1034–1045.
98. Boddy, L. (1992). Microenvironmental aspects of xylem defenses to wood decay fungi. In *Defense mechanisms of woody plants against fungi* (pp. 96–132). Springer.
99. Dumas, M. T., et Hubbes, M. (1979). Resistance of *Pinus densiflora* and *Pinus rigida* x *radiata* to *Fomes annosus*. *European Journal of Forest Pathology*, 9(3–4), 229–238.
100. Paxton, J. D. (1981). Phytoalexins—a working redefinition. *Journal of phytopathology*, 101(2), 106–109.
101. Yamada, T. (1992). Biochemistry of Gymnosperm Xylem Responses to Fungal Invasion. In P. D. R. A. Blanchette & P. D. A. R. Biggs (Eds.), *Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi* (pp. 147–164). Springer Berlin Heidelberg.
102. Natural products of woody plants: Chemicals extraneous to the lignocellulosic cell wall. (1990). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 96(2), 355.
103. Cheniclet, C. (1987). Effects of wounding and fungus inoculation on terpene producing systems of maritime pine. *Journal of Experimental Botany*, 38(9), 1557–1572.
104. Rishbeth, J. (1972). Resistance to fungal pathogens of tree roots. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 181(1064), 333–351.

105. Lieutier, F., et Berryman, A. A. (1988). Elicitation of defensive reactions in conifers. In *Mechanisms of Woody Plant Defenses Against Insects* (pp. 313–319). Springer.
106. Reid, R. W., Whitney, H. S., et Watson, J. A. (1967). Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* Hopkins and blue stain fungi. *Canadian Journal of Botany*, 45(7), 1115–1126.
107. Schultz, T. P., et Nicholas, D. D. (2000). Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, 54(1), 47–52.
108. Pâques, L. E., García-Casas, M. del C., et Charpentier, J.-P. (2012). Distribution of heartwood extractives in hybrid larches and in their related European and Japanese larch parents: relationship with wood colour parameters. *European Journal of Forest Research*, 132(1), 61–69.
109. Hegger, M. (2011). *Construction et énergie : architecture et développement durable*. PPUR Presses polytechniques.
110. Witzell, J., et Martín, J. A. (2008). Phenolic metabolites in the resistance of northern forest trees to pathogens—past experiences and future prospects. *Canadian Journal of Forest Research*, 38(11), 2711–2727.
111. Elsinghorst, P. W., Cavlar, T., Müller, A., Braune, A., Blaut, M., et Gütschow, M. (2011). The thermal and enzymatic taxifolin–aliphitonin rearrangement. *Journal of natural products*, 74(10), 2243–2249.
112. Buckingham, J. (1997). *Dictionary of Natural Products, Supplement 4*. CRC Press.
113. Redemann, C. T. (1971). Extracting 4-p-tolylvaleric acid from Douglas fir. Brevet US3631098 A.
114. Jost, P. C., et Hayes Griffith, O. (1978). The spin-labeling technique. In S. N. T. C.H.W. Hirs (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 49, pp. 369–418). Academic Press.
115. Kubow, S., Dubose Jr., C. M., Janzen, E. G., Carlson, J. R., & Bray, T. M. (1983). The spin-trapping of enzymatically and chemically catalyzed free radicals from indolic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 114(1), 168–174.
116. Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Ismail, M. R., Farah, A., et Chaouch, A. (2009). Évaluation de la qualité de la colophane du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 156(3), 427–435.
117. Gao, Z., Huang, K., Yang, X., et Xu, H. (1999). Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1472(3), 643–650.
118. Rice-Evans, C. A., et Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 790–795.
119. Ma, Y. L., Li, Q. M., Van den Heuvel, H., et Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357–1364.
120. Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., et Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707–715.
121. De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., et Brinkman, U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 31–63.
122. Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., et Bryce, D. L. (2014). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley et Sons.

123. Kolesnik, Y. A., Demyanovich, V. M., Tashlitsky, V. N., Tikhonov, V. P., Titova, E. V., et Shmatkov, D. A. (2007). The composition of a flavonoid complex from *Larix* wood (Pinaceae). The stereochemistry of dihydroquercetin. *Planta Medica*, 73(09), P_369.
124. Harborne, J. B., Baxter, H., & others. (1999). *The handbook of natural flavonoids. Volume 1 and Volume 2*. John Wiley & Sons.
125. Seo, O. N., Kim, G.-S., Kim, Y.-H., Park, S., Jeong, S. W., Lee, S. J., ... et Shin, S. C. (2013). Determination of polyphenol components of Korean *Scutellaria baicalensis Georgi* using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Contribution to overall antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1741–1750.
126. Chang, C.-L., et Wu, R.-T. (2011). Quantification of (+)-catechin and (–)-epicatechin in coconut water by LC–MS. *Food Chemistry*, 126(2), 710–717.
127. Foo, L. Y., et Karchesy, J. J. (1989). Procyanidin dimers and trimers from Douglas fir inner bark. *Phytochemistry*, 28(6), 1743–1747.
128. De Freitas, V. A., Glories, Y., Bourgeois, G., et Vitry, C. (1998). Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*, 49(5), 1435–1441.
129. Callemien, D., et Collin, S. (2008). Use of RP-HPLC-ESI (-)-MS/MS to Differentiate Various Proanthocyanidin Isomers in Lager Beer Extracts. *Journal-american society of brewing chemists*, 66(2), 109.
130. Harborne, J. B. (1999). *The Handbook of Natural Flavonoids. Vol. 2. Flavans and proanthocyanidins*. London: Taylor et Francis Ltd.
131. Cheng, X.-L., Wan, J.-Y., Li, P., et Qi, L.-W. (2011). Ultrasonic/microwave assisted extraction and diagnostic ion filtering strategy by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of flavonoids in *Spatholobus suberectus*. *Journal of Chromatography A*, 1218(34), 5774–5786.
132. Cuyckens, F., et Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1–15.
133. Hvattum, E., et Ekeberg, D. (2003). Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 43–49.
134. Domon, B., et Costello, C. E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate journal*, 5(4), 397–409.
135. Benayad, Z., Gómez-Cordovés, C., et Es-Safi, N. E. (2014). Characterization of flavonoid glycosides from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) crude seeds by HPLC–DAD–ESI/MS analysis. *International journal of molecular sciences*, 15(11), 20668–20685.
136. Lundgren, L. N., et Theander, O. (1988). Cis-and trans-dihydroquercetin glucosides from needles of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry*, 27(3), 829–832.
137. Eklund, P. C., Backman, M. J., Kronberg, L., Smeds, A. I., et Sjöholm, R. E. (2008). Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 43(1), 97–107.
138. Kawai, S., Sugishita, K., et Ohashi, H. (1999). Identification of *Thuja occidentalis* lignans and its biosynthetic relationship. *Phytochemistry*, 51(2), 243–247.
139. Kamienska, A., Durley, R. C., et Pharis, R. P. (1976). Isolation of gibberellins A3, A4 and A7 from *Pinus attenuata* pollen. *Phytochemistry*, 15(3), 421–424.

140. Hamberg, M. (1986). Isolation and structures of lipoxygenase products from *Saprolegnia parasitica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 876(3), 688–692.
141. Buckingham, J. (1997). *Dictionary of Natural Products, Supplement 4* (Vol. 11).
142. Kong, L., Von Aderkas, P., Owen, S. J., Jaquish, B., Woods, J., et Abrams, S. R. (2012). Effects of stem girdling on cone yield and endogenous phytohormones and metabolites in developing long shoots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *New Forests*, 43(4), 491–503.
143. Kato, T., Hirukawa, T., et Yano, M. (1994). Synthesis of (E)-9, 10, 13-Trihydroxy-11-octadecenoic Acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 67(3), 839–842.
144. Hou, C. T., et Bagby, M. O. (1991). Production of a new compound, 7, 10-dihydroxy-8-(E)-octadecenoic acid from oleic acid by *Pseudomonas* sp. PR3. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 7(2), 123–129.
145. Li, X.-C., ElSohly, H. N., Nimrod, A. C., et Clark, A. M. (1999). Two Auronols from *Pseudolarix amabilis*. *Journal of Natural Products*, 62(5), 767–769.
146. Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y., et Zhang, C. (2015). Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. *Molecules*, 20(10), 18352–18366.
147. Lee, J. I., Hsu, B. H., Wu, D., et Barrett, J. S. (2006). Separation and characterization of silybin, isosilybin, silydianin and silychristin in milk thistle extract by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1116(1–2), 57–68.
148. Harborne, J. B., et Williams, C. A. (1988). Flavone and flavonol glycosides. In *The flavonoids* (pp. 303–328). Springer.
149. Timmermann, B. N., Hoffmann, J. J., Jolad, S. D., Bates, R. B., et Siahhan, T. J. (1986). Diterpenoids and flavonoids from *Grindelia discoidea*. *Phytochemistry*, 25(3), 723–727.
150. Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D. R., Vassão, D. G., Jackson, B. L., Kish, C. M., ... others. (2006). Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 10128–10133.
151. Foo, L. Y., et Karchesy, J. (1989). Pseudotsuganol, a biphenyl-linked pinoresinol–dihydroquercetin from Douglas-fir bark: isolation of the first true flavonolignan. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (4), 217–219.
152. Sakai, T., et Hirose, Y. (1973). Structures of new sesquiterpenes related to pseudotsugonal and todomatuic acid isolated from Douglas-fir wood. *Chemistry Letters*, 2(8), 825–828.
153. Negishi, E.-I., Sabanski, M., Katz, J.-J., et Brown, H. C. (1976). An efficient synthesis of juvabione and todomatuic acid via hydroboration-carbonylation. *Tetrahedron*, 32(8), 925–926.
154. Baxter, H., Harborne, J. B., et Moss, G. P. (1998). *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants*. CRC press.
155. Kebbi-Benkeder, Z., Dumarçay, S., Touahri, N., Manso, R., Gérardin, P., et Colin, F. (2016). Les noeuds: un bois méconnu et une source importante de composés extractibles. *Biologie et écologie*.
156. Lewinsohn, E., Savage, T. J., Gijzen, M., et Croteau, R. (1993). Simultaneous analysis of monoterpenes and diterpenoids of conifer oleoresin. *Phytochemical Analysis*, 4(5), 220–225.
157. Pan, S., Pu, Y., Foston, M., et Ragauskas, A. J. (2013). Compositional characterization and pyrolysis of loblolly pine and Douglas-fir bark. *BioEnergy Research*, 6(1), 24–34.

158. Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R. M., Bastida, J., Viladomat, F., et Codina, C. (2003). Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1008(1), 57–72.
159. Escamilla-Treviño, L. L., Shen, H., Hernandez, T., Yin, Y., Xu, Y., et Dixon, R. A. (2014). Early lignin pathway enzymes and routes to chlorogenic acid in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant molecular biology*, 84(4–5), 565–576.
160. Ruangrungsi, N., Tappayuthpijarn, P., Tantivatana, P., Borris, R. P., et Cordell, G. A. (1981). Traditional Medicinal Plants of Thailand. I. Isolation and Structure Elucidation of Two New Flavonoids, (2R, 3R)-Dihydroquercetin-4'-Methyl Ether and (2R, 3R)-Dihydroquercetin-4', 7-Dimethyl Ether From *Blurnea balsamifera*. *Journal of Natural Products*, 44(5), 541–545.
161. Higuchi, R., et Donnelly, D. M. (1978). Acylated flavonol glucosides of *Pinus contorta* needles. *Phytochemistry*, 17(4), 787–791.
162. Wollenweber, E., Dörr, M., Fritz, H., Papendieck, S., Yatskievych, G., et Roitman, J. N. (1997). Exudate flavonoids in Asteraceae from Arizona, California and Mexico. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 52(5–6), 301–307.
163. Shen, Z., et Theander, O. (1985). (—)-Massoniresinol, a lignan from *Pinus massoniana*. *Phytochemistry*, 24(2), 364–365.
164. Tao, J., Morikawa, T., Ando, S., Matsuda, H., et Yoshikawa, M. (2003). Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XI. inhibitors on NO production and degranulation in RBL-2H3 from *Rubia yunnanensis*: structures of rubianosides II, III, and IV, rubianol-g, and rubianthraquinone. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 51(6), 654–662.
165. Lin, T.-C., Fang, J.-M., et Cheng, Y.-S. (1999). Terpenes and lignans from leaves of *Chamaecyparis formosensis*. *Phytochemistry*, 51(6), 793–801.
166. Niemann, G. J. (1977). Flavonoids and Related Compounds in Leaves of Pinaceae. II*. *Cedrus atlantica* cv *Glauca*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 32(11–12), 1015–1017.
167. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933–956.
168. Outahyon, A. (2008). *Influences de paramètres d'usinage et de stockage sur les propriétés fonctionnelles des surfaces de bois de Douglas*. Arts et Métiers ParisTech.
169. Williams, R. S., Feist, W. C., et Forest Products Laboratory (U.S.). (1999). *Water repellents and water-repellent preservatives for wood*. Madison, WI: Forest Products Laboratory.
170. Liu, P., Guo, H., Tian, Y., Wang, Q., & et Guo, D. (2006). Benzoic acid allopyranosides from the bark of *Pseudolarix kaempferi*. *Phytochemistry*, 67(13), 1395–1398.
171. Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 459–464.
172. Shepherd, T., et Wynne Griffiths, D. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171(3), 469–499.
173. Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., ... others. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology*, 34(8), 828–837.
174. Yang, J. Y., Sanchez, L. M., Rath, C. M., Liu, X., Boudreau, P. D., Bruns, N., ... others. (2013). Molecular networking as a dereplication strategy. *Journal of natural products*, 76(9), 1686–1699.

175. Robinson, A. R., Ukrainetz, N. K., Kang, K.-Y., et Mansfield, S. D. (2007). Metabolite profiling of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) field trials reveals strong environmental and weak genetic variation. *New Phytologist*, 174(4), 762–773.
176. Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208(15), 2819–2830.
177. Catesson, A.-M., et Lachaud, S. (1993). Le cambium, structure, fonctionnement et contrôle de l'activité saisonnière. *Acta Botanica Gallica*, 140(4), 337–350.



Annexes

Annexe 1. Les différentes aires des transitions les plus intenses pour chaque composé quantifié par MRM.	204
Annexe 2. Les composés détectés en LC-MS/MS après l'analyse des extraits de bois de Douglas.....	205



Annexe 2. Les composés détectés en LC-MS/MS après l'analyse des extraits de bois de Douglas.

Tableau 1. Temps de rétention, données MS/MS et identification des composés dans l'aubier de *Pseudotsuga menziesii*

R _t (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS fragments (m/z)	Identification
9,63	577	451, 425, 407, 289, 285, 281, 245, 205, 161, 125	Procyanidine B1/ B2
10,16	609	565, 485, 457, 407, 329, 313, 289, 275, 231, 203, 165, 137	Non identifié
10,34	321	277, 259, 233, 215, 191, 173, 167, 149, 147, 109	Acide 6-hydroxyglucuronide hexan-1-oïque
10,52	289	245, 205, 203, 187, 161, 137, 109	Catéchine
11,41	289	271, 245, 221, 205, 203, 187, 175, 161, 151, 137, 123, 109	Epicatéchine
11,67	865	767, 739, 695, 587, 577, 525, 407, 287, 243, 217, 161, 125	Procyanidine C4
12,47	465	437, 447, 303, 285, 259, 217, 177, 175, 152, 125	Taxifoline-3'-O-Glc
12,56	465	437, 447, 421, 303, 285, 259, 217, 177, 175, 152, 125	Taxifoline-3'-O-Glc
13,98	285	257, 241, 199, 175, 201, 174, 171, 157, 146	Kaempferol
14,07	303	285, 275, 259, 241, 217, 199, 177, 175, 151, 125	Taxifoline
14,16	303	285, 275, 241, 217, 177, 175, 151, 125	Taxifoline
15,58	287	269, 259, 243, 215, 201, 177, 173, 161, 151, 125, 107	Dihydrokaempferol
16,46	373	355, 340, 327, 312, 296, 237, 223, 193, 176, 164, 163, 159, 147	Neotrachelogenine ou wikstromol
16,91	287	269, 161, 151, 135, 107	Dihydrokaempferol
18,06	329	311, 293, 283, 229, 211, 183, 171, 153, 139, 127	Gibberellin A7
18,60	271	253, 229, 209, 201, 187, 177, 165, 151, 119, 107	Pinobanskine
19,04	399	353, 331, 301, 283, 203, 199, 165, 135, 121	Quercétine -4'-hexen-ol
19,66	329	311, 293, 275, 267, 227, 199, 171, 149	Acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécenoïque
20,64	349	331, 317, 306, 287, 259, 244, 229, 217, 193, 163, 150, 135	Non identifié
21,44	365	347, 329, 321, 303, 259, 247, 205, 179, 163	Non identifié
22,33	255	227, 213, 185, 171, 164, 151, 145, 107	Pinocembrin
22,86	347	315, 304, 275, 260, 245, 227, 205, 179, 149, 135	Guaiacylglycérol-8-O-4-vanilline ether
26,06	315	297, 279, 271, 269, 235, 217, 199, 181	Acide 9,14 Dihydroxyoctanoïque
29,17	333	315, 287, 269, 247, 237, 203, 191, 167	3,7,12-trihydroxyabiéta-8,13-dien-18-al



Tableau 2. Temps de rétention, données MS/MS et identification des composés dans la zone de transition

t_R (min)	[M-H]⁻ (m/z)	MS/MS fragments (m/z)	Identification
9,15	211	196, 181, 166, 163, 148, 135, 120, 109	1-(3,4 dimethoxyphenyl)2,3propanediol
10,34	521	475, 321, 297, 237, 219, 169, 161, 153,127, 123,	Lignane non identifié
11,19	303	285, 275, 259, 241, 217, 199, 177, 175, 151,147, 125	Taxifoline
11,46	515	467, 419, 373, 299, 285, 271, 256, 241, 195, 165, 150, 134	Taxifoline-3'- O-2(5-hydroxyconiferyl)glycerol)
12,14	357	339, 329, 311, 297, 267, 205, 179, 164, 153	Dehydrodiconiferylalcool
12,48	375	357, 347, 313, 297, 285, 275, 251, 225,191, 177, 175, 151, 125, 109	7-hydroxybutyltaxifolin
13,51	389	374, 359, 343, 341, 329, 299, 257, 239, 207, 193, 165, 150, 134	5' Methoxyilaricresinol
13,86	391	343, 323, 293, 209, 195, 165, 151, 150	Massonirésinol
14,11	693	675, 663, 477, 419, 355, 343, 313, 271, 256, 207, 151	Non identifié
14,37	303	285, 275, 259, 241, 217, 199, 177, 175, 151, 125	Taxifoline
14,54	285	257, 241, 217, 201, 199, 175, 143	Kaempferol
14,89	187	143, 125, 123, 97, 80	Acide Azelaïque
15,15	373	355, 340, 313, 231, 217, 173, 163, 160, 155, 108	7-hydroxymatairésinol
15,83	317	299, 289, 273, 258, 231, 207, 192, 188, 180, 152, 125	4'-Methyltaxifoline
15,92	287	269, 259, 243, 215, 201, 177, 173, 151, 125	Dihydrokaempferol
16,00	289	274, 261, 201, 175, 158	Non identifié
16,26	643	625, 615, 581, 519, 477, 465, 405, 381, 363, 285, 258, 217, 177,	Taxifolin-7
16,26	643	151	-dihydroferuloylglucoside
16,60	221	206, 177, 162, 149, 134	Coniferylacétate
16,78	373	355, 327, 311, 296, 235, 223, 179, 164, 163, 149, 135	7-hydroxymatairésinol
17,03	225	207, 181, 163	Acide 3,4 dimethoxy- 2hydroxy-propanoïque
17,21	287	225, 203, 161, 151, 135, 125, 107	Ériodictyol
17,29	285	267, 241, 217, 201, 199, 175, 151, 133	Lutéoline
17,38	301	273, 257, 229, 193, 179, 151, 121, 107	Quercétine
17,80	331	313, 303, 287, 269, 241, 208, 201, 191, 179, 152, 151, 124, 109	Taxifoline-7,3' -dimethyl ether
17,71	291	273, 245, 229, 227, 213, 175, 161	Acide 13-keto- 9,11,15-octadecatrienoïque
17,97	299	271, 255, 243, 227, 213, 199, 185, 163, 151	6-methylkaempferol
18,41	329	311, 283, 229, 211, 183, 171, 139, 127	Gibberellin A7
18,57	481	453, 435, 423, 311, 301, 273, 257, 229, 215, 179, 152, 125	Silybine
18,91	207	192, 189, 163, 161, 147, 135, 133, 119	Dérivé phenylpropane
18,99	271	253, 229, 227, 187, 151, 143, 119, 107	Pinobanksine
19,42	315	300, 271, 227, 199, 164, 151	Isorhamnetine
19,50	289	245, 215, 211, 175, 149	Non identifié
19,59	331	313, 285, 255	Non identifié
20,02	349	331, 313, 287, 275, 269, 251, 233, 207, 189, 177, 173, 161, 147	Non identifié
20,36	235	163, 148, 147	Pseudotsugonal
20,78	333	315, 287, 275, 271, 219, 199, 161	3,7,12- Trihydroxyabieta- 8,13-dien-18-al
22,94	315	279, 255, 247, 211, 203, 185, 145	3-oxo -7,18 dihydroxyabieta -1,8,13-triene
21,12	505	459, 437, 327, 311, 275, 203, 191, 177, 163, 145, 119, 117	4-p-dihydrocoumaroyldehydro diconiferylalcohol
21,46	313	295, 265, 251, 185, 183, 153, 97	Acide 15-hydroxy -6 -èn-dihydroabiétique
21,54	265	247, 221, 205, 193, 177, 165, 149, 135, 121, 108	Juvabione
22,29	253	235, 209, 185, 181, 165, 145, 139	Acide 3-hexadecenoïque
22,78	255	227, 2132, 193, 185, 171, 151, 145, 136, 107	Pinoembrine
22,94	315	279, 255, 247, 229, 227, 211, 203, 185, 145	Non identifié
24,68	253	235, 209, 151	Acide dihydrotodomatuique
25,26	315	313, 297, 279, 269, 221, 141	3,7-dihydroxyabieta -5,8,13-trien-18-al
25,76	333	305, 290, 275, 265, 246, 173, 123, 108	3,7-Dihydroxyabieta-12oxo -13-ne-18-al
27,08	313	295, 269, 251, 235, 198, 185, 173, 117	3-Hydroxy-6-en- dehydroabietic acid
28,72	317	299, 271, 249, 229	7,15-dihydroxyabieta -8,13-dien-18-al

30,69	299	281, 253, 237, 223, 183, 169 255, 241, 227, 151	Acide 10-hydroxyoctadénoïque 3-Hydroxyabiéta- 8,13-diène-18-al
33,85	301		
39,52	305	277, 249, 220, 203, 193, 175, 165, 147, 131, 119, 103	Férule d'octyle

Tableau 3. Temps de rétention, données MS/MS et identification des composés dans duramen de *Pseudotsuga menziesii*

R_t (min)	[M-H]⁻ (m/z)	MS/MS fragments (m/z)	Identification
12,37	465	437, 421, 303, 285, 259, 241, 217, 175, 125, 97	Taxifolin-3'-O-glucoside
13,94	285	267, 257, 241, 223, 217, 213, 201, 199, 175, 171, 161, 157, 143, 117	Kaempferol
13,85	303	285, 259, 241, 217, 199, 177, 175, 153, 125	Taxifoline
14,02	303	285, 275, 259, 241, 217, 199, 189, 177, 175, 153, 125	Taxifoline
14,11	303	285, 275, 177, 175, 125	Taxifoline
14,37	303	285, 275, 177, 125	Taxifoline
14,90	293	195, 177, 159, 97	Acide féruoylpentanoïque
15,34	605	587, 569, 525, 479, 461, 443, 389, 351, 295, 281, 179, 165, 151	[5 ^{5''}]-bisdihydroquercétine
15,51	287	269, 259, 243, 215, 201, 177, 151, 125, 107, 93	Dihydrokaempferol
15,59	288	260, 259, 244, 177, 173, 159, 79	Non identifié
15,94	317	299, 289, 274, 258, 231, 230, 201, 199, 180, 152, 149, 125, 124	4'-Methyltaxifoline
16,46	605	587, 569, 479, 461, 443, 375, 353, 335, 327, 309, 281, 179, 175, 165, 163, 151	[5 ^{5''}]-bisdihydroquercétin
16,72	633	571, 437, 402, 329, 311, 303, 301, 285, 267, 241, 225, 201, 199, 177, 175, 151, 125	Non identifié
16,89	287	269, 225, 161, 151, 135, 107, 97	Dihydrokaempferol
16,98	301	273, 257, 245, 229, 211, 193, 179, 151, 121, 107	Quercétine
17,07	605	587, 569, 543, 479, 461, 301, 285, 283, 257, 217, 179, 175, 151, 147, 125	[5 ^{5''}]-bisdihydroquercétine
17,34	331	313, 303, 294, 277, 269, 233, 191, 179, 177, 175, 153, 151, 124	Taxifoline-7,3'-dimethyl ether
18,12	603	585, 541, 523, 477, 459, 451, 422, 405, 381, 361, 299, 285, 271, 255, 193, 179, 163, 151	Dimère quercétine-taxifoline
18,12	603	151	
18,55	271	253, 227, 185, 177, 165, 151, 119, 107	Pinobanksine
18,91	285	257, 239, 185, 92	Non identifié
19,52	603	585, 531, 517, 449, 413, 373, 299, 271, 255, 227, 193, 179, 165, 151, 107	Dimère quercétin-taxifolin
22,39	255	227, 213, 185, 171, 164, 151, 145, 107, 83	Pinocembrine
22,48	256	228, 214, 186, 172, 151, 144, 107, 83	Non identifié
	293	249, 243, 193, 177, 159, 136, 97, 79	Acide 9-Hydroxy- 10,12,15 octadécatriénoïque
24,23			
30,67	299	297, 263, 237, 185	Non identifié
37,91	339	275, 197, 183, 170	Non identifié
38,62	441	384, 348, 333, 294, 280, 254, 238, 196	Non identifié

Metabolites of *Pseudotsuga menziesii*: metabolomic approach and role in resistance

Pour l'identification et l'accès aux métabolites secondaires du bois de Douglas, les optimisations des conditions d'extractions ont été réalisées dans différents solvants. L'identification de composés par LC-MS/MS a été privilégiée. L'analyse en LC-ESI-MS/MS des extraits de bois issus des trois zones a été effectuée afin d'identifier les différents groupes de métabolites présents dans chaque zone. Une cinquantaine de métabolites a été identifié. Les groupes de métabolites les plus représentatifs sont les polyphénols et les terpènes qui sont réputés avoir des propriétés antioxydantes, antifongiques à l'origine de la durabilité naturelle du bois. Dans un deuxième temps la quantification relative de métabolites d'intérêt a été réalisée à partir d'échantillon de bois prélevés aux 4 saisons de l'année. Les résultats ont montré que le duramen était la zone la plus riche en métabolites quelque soit la saison. Cependant, la quantité de chaque métabolite varie différemment en fonction des saisons. Pour une majorité de composés quantifiés, le printemps et l'été sont les saisons au cours desquelles le bois accumulait une grande quantité de métabolites. Ces résultats confirment que le duramen est la zone la plus riche en métabolites protecteurs. Ces informations peuvent être utiles pour la sélection des lignées les plus résistantes et l'amélioration de la durabilité naturelle du bois.

Mots-clés : Bois, extraction, métabolites, aubier, duramen, zone de transition, durabilité naturelle.



Metabolites of *Pseudotsuga menziesii*: metabolomic approach and role in resistance

For the identification and access to secondary metabolites of Douglas-fir, the optimization of the extraction conditions was carried out in different solvents. The identification of compounds by LC-MS / MS was favored. LC-ESI-MS / MS analysis of the wood extracts from the three zones was carried out to identify the different groups of metabolites present in each zone. About fifty metabolites have been identified. The most representative groups of metabolites are polyphenols and terpenes, which are said to have antioxidant, antifungal properties that are at origin of the natural durability of wood. In a second step, the relative quantification of metabolites of interest was carried out using wood samples taken during the 4 seasons of the year. The results showed that duramen was the richest metabolite area in any season. However, the amount of each metabolite varies differently depending on the season. For a majority of quantified compounds, spring and summer are the seasons in which wood accumulates a large amount of metabolites. These results confirm that the duramen is the area richest in protective metabolites. This information can be useful for selecting the most resistant lines and improving the natural durability of wood.

Keywords : wood, extraction, metabolites, sapwood, duramen, transition zone, natural durability.

