



**HAL**  
open science

# Origine et prédiction de la variabilité de la durabilité naturelle chez *Dicorynia guianensis* Amsh

Claudiane Flora

► **To cite this version:**

Claudiane Flora. Origine et prédiction de la variabilité de la durabilité naturelle chez *Dicorynia guianensis* Amsh. Géochimie. Université de Guyane, 2018. Français. NNT : 2018YANE0001 . tel-02368310

**HAL Id: tel-02368310**

**<https://theses.hal.science/tel-02368310>**

Submitted on 18 Nov 2019

**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.

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Guyane

Discipline : *Chimie*

Spécialité : *Chimie et biologie des produits naturels*

---

---

Présentée et soutenue publiquement le 15 juin 2018 par :

CLAUDIANE FLORA

---

Origine et prédiction de la variabilité de la  
durabilité naturelle chez *Dicorynia*  
*guyanensis* Amsh.

---

---

**JURY**

Tatjana STEVANOVIC	PU	Rapporteur
Philippe GERARDIN	PU	Rapporteur
Joris VAN ACKER	PU	Examineur
Jacques BEAUCHÊNE	CR	Examineur
Marie-France THEVENON	HDR, CR	Directrice de Thèse
Nadine AMUSANT	CR	Co-Directrice de Thèse
Yannick ESTEVEZ	IR	Co-encadrant
Christophe DUPLAIS	HDR, CR	Co-encadrant

## Remerciements

Mon aventure au sein de l'UMR EcoFoG, précisément dans le laboratoire de chimie, a débuté au mois de janvier 2014. J'ai eu l'opportunité de réaliser au sein de ce laboratoire mon stage de M2 sous la direction de Emeline Houël de janvier 2014 à juin 2014 suivi de ma thèse de doctorat. Ce laboratoire est devenu mon second habitat, ma seconde maison et par la rédaction de ce manuscrit, je signe d'une certaine façon mon « déménagement ». La rédaction de ce manuscrit est le fruit de collaborations, de discussions très animées, de nombreuses corrections mais aussi de la patience et de la disponibilité de mes encadrants. Aussi, je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants, Marie-France Thevenon pour son soutien sans faille et sa disponibilité, Christophe Duplais pour m'avoir communiqué sa passion et sa vision de la recherche, pour sa confiance, ses précieux conseils et ses idées innovantes car ce sujet de thèse c'est aussi le tien ! Yannick Estevez « le sauveur » qui a toujours su répondre présent dans les pires moments (appareils en pannes, manipulations ratées et j'en passe). Merci de m'avoir guidé, conseillé, soutenu quand bien même que tu étais débordé par tes propres recherches à mener, et un énorme Merci pour ta générosité au sein de ce laboratoire ! Nadine Amusant, qui a accepté de m'accompagner durant ces 3 ans de thèse... Tu as été pour moi une véritable source d'inspiration, un modèle, un coach, une vraie « Fanm Djok » durant cette thèse. Ton positivisme face à toute épreuve et tes conseils me manqueront, Merci pour tout.

A tous les membres du laboratoire de chimie anciens et nouveaux venus, votre rencontre a été pour moi un véritable enrichissement et une opportunité d'échanges et d'apprentissage, Merci à tous ! Mention spéciale pour Emeline, par qui tout a commencé, Arnaud « le cuisinier », Caroline, Isabelle, Louis-Jérôme et Cyrielle, véritable amie et confidente !

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse notamment les membres du laboratoire des Sciences du bois à Kourou : Koese, pour ces magnifiques mises en œuvre de mes échantillons, Hélène Morel pour toutes ces manipulations réalisées quand je ne le pouvais, Romain Lenhebach, Eric Nicolini, Bruno Clair et Jacques Beauchêne pour ces discussions fructueuses autour de cette « Angélique » pas très angélique... Merci à Stéphane Traissac pour son expertise de statisticien et son aide précieuse sur R et, grâce à toi j'ai pu me « réconcilier » avec ce logiciel. Je tiens également à remercier Didier et Alice Stien, pour cet accueil chaleureux au Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbienne de Banyuls-sur-mer, à Jean-Luc Pirat de l'Institut de Charles Gerhardt Montpellier pour sa générosité et sa réactivité et également Grégory Genta-Jouve de l'Université de ParisDescartes, pour m'avoir initié à la métabolomique. Un très grand Merci au laboratoire

Qualisud, particulièrement à Jean-Charles Robinson qui m'a donné l'accès à la plateforme analytique du laboratoire, Karine Martiale pour sa disponibilité et ses conseils et Gaël Frédéric, ancien stagiaire de chez nous.

Je remercie la Team Mermaid de l'Institut Pasteur de la Guyane (Mermaid, Sammy et Tani), avec qui les fous rires et la bonne humeur étaient toujours au rendez-vous, Audrey Sagne pour nos discussions kourousiennes et nos repas du midi. Mes amis et Mes proches, avec lesquels j'ai surtout brillé par mon absence ces derniers temps... Votre soutien était le plus beau des cadeaux, Merci pour tous vos messages d'encouragements et vos témoignages d'affections ! De près comme de loin, vous m'avez 'supporté' durant ces 3 ans de thèse, vous m'avez vu grandir et avez contribué à mon épanouissement personnel. Enfin, Merci à cette inspiration divine, à ma famille, mes parents qui me soutiennent depuis bientôt près de 8 ans, ce manuscrit, c'est aussi le vôtre ! Je ne pourrais finir sans remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mes travaux.

## Résumé

Titre de la thèse : Origine et prédiction de la variabilité de la durabilité naturelle chez *Dicorynia guianensis* Amsh.

Résumé : L'Angélique (*Dicorynia guianensis* Amsh.) est une espèce forestière de Guyane très exploitée pour son bois mais ce dernier est connu pour présenter une durabilité naturelle variable, dont les conséquences peuvent être lourdes pour l'utilisateur. Dans le cadre de cette thèse nous avons souhaité comprendre l'origine de la durabilité naturelle du duramen de l'Angélique afin d'appréhender sa variabilité pour mieux la prédire. Ce travail pluridisciplinaire allie sciences du bois, chimie des produits naturels et microbiologie. Dans un premier temps, nous avons mis en œuvre une stratégie d'échantillonnage basée sur l'étude architecturale de l'arbre pour appréhender la variabilité de la durabilité naturelle, ce qui a été confirmé par les essais biologiques réalisés. Nous avons par la suite évalué l'influence de potentiels facteurs mesurés dans le bois sur la durabilité naturelle. À ce titre, le rôle des extractibles a été évalué par des approches de métabolomique ciblée et non ciblée, couplées à une stratégie de déréplication. La lignine et l'infradensité ont également été retenues comme facteur de durabilité naturelle de l'Angélique. Enfin, des caractéristiques propres à l'ontogénie de l'arbre ont été pris en compte et les résultats mettent en lumière l'importance du stade de développement de l'arbre ainsi que son environnement. Enfin, nous avons proposé des outils spectroscopiques (moyen et proche infrarouge) simples, rapides et fiables pour prédire la durabilité naturelle. Ces résultats sont encourageants et suggèrent leur utilisation potentielle par la filière bois pour prédire la durabilité naturelle du bois de l'Angélique.

Mots-clés : *Dicorynia guianensis* ; durabilité naturelle ; métabolomique ; outils de prédiction ; spectroscopie infrarouge ; ontogénie

Thesis title: Origin and prediction of the variability of *Dicorynia guianensis* Amsh. natural durability

Summary: Angélique (*Dicorynia guianensis* Amsh.) is a tree species in French Guiana that is heavily exploited for its wood, but it is known to have variable natural durability, which can be of severe consequences for the user. In this thesis we wanted to understand the origin of the natural durability of Angélique heartwood in order to understand its variability, to better predict it. This multidisciplinary work combines wood sciences, natural products chemistry and microbiology. First, we implemented a sampling strategy based on the architectural profile of tree individuals to understand the variability of natural durability, which was confirmed by biological assays. We then assessed the influence of potential natural durability factors that were measured in the wood samples. As such, the role of metabolites was investigated using targeted and untargeted metabolomics, coupled with a dereplication strategy. Lignin and infradensity have also been tested as factors of natural durability for Angélique heartwood. Finally, factors that are related to tree ontogeny have been taken into account and the results highlight the importance of the stage development and the environment of tree individuals. Lastly, we have proposed easy, fast and reliable spectroscopic tools (medium and near infrared) to predict the natural durability. These results are encouraging and suggest their potential use by the timber industry to predict the natural durability of Angélique heartwood.

Keywords: *Dicorynia guianensis* ; natural durability; metabolomics ; prediction tools ; infrared spectroscopy; ontogeny

## Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé.....	4
Table des matières.....	5
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux.....	8
Liste des équations.....	9
Abréviations.....	10
Introduction générale.....	12
Etat de l'art.....	15
Partie 1 : Le bois, biomatériau complexe.....	15
Partie 2 : La durabilité naturelle.....	36
Partie 3 : Présentation de <i>Dicorynia guianensis</i> , le modèle d'étude.....	49
Partie 4 : Les techniques analytiques pour l'étude métabolomique.....	55
Chapitre 1: Stratégie de l'échantillonnage.....	63
Matériel et méthodes.....	63
I. Origine et sélection des individus.....	63
II. Caractéristiques des individus de l'échantillonnage.....	65
III. Echantillons destinés aux analyses chimiques.....	70
IV. Essais de durabilité naturelle.....	71
Résultats.....	72
I. Variabilité entre les groupes architecturaux.....	73
II. Variabilité par type de tissu.....	74
III. Variabilité inter individuelle : cas du duramen externe.....	75
Chapitre 2: Origine de la durabilité naturelle.....	77
Matériel et méthodes.....	79
Partie 1 : Rôle des extractibles.....	79
A. Etude métabolomique par une approche non ciblée.....	79
I. Sélection de potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle du duramen de l'Angélique.....	79
II. Identification des potentiels biomarqueurs par stratégie de déréplication.....	80
B. Etude métabolomique par une approche ciblée.....	84
I. Quantification de potentiels biomarqueurs : cas de la tryptamine.....	84
II. Quantification de potentiels biomarqueurs : les phénols totaux.....	94
III. Rôle des extractibles dans la durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores.....	97
Partie 2 : Autres facteurs de durabilité naturelle.....	105
I. Dosages de macromolécules.....	105
II. Mesure de l'infradensité.....	107
Partie 3 : Modèle explicatif de la durabilité naturelle chez l'Angélique.....	109
I. Réduction du nombre de covariables.....	109
II. Construction du modèle explicatif de la durabilité naturelle.....	110
Résultats.....	112
Partie 1 : Rôle des extractibles.....	112
A. Etude métabolomique par une approche non ciblée.....	112
I. Sélection de potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle du duramen de l'Angélique.....	112
II. Stratégie de déréplication pour l'identification structurale de potentiels biomarqueurs.....	119
B. Etude métabolomique par une approche ciblée.....	126
I. Quantification de potentiels biomarqueurs : cas de la tryptamine.....	126
II. Quantification des composés phénoliques totaux et mesure de leurs activités antiradicalaire..	138
III. Rôle des extractibles dans la durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores.....	141
Partie 2 : Autres facteurs de durabilité naturelle du bois de l'Angélique.....	143
I. Les macromolécules du bois.....	143
II. La propriété d'infradensité.....	146
Partie 3 : Modèle linéaire explicatif de durabilité naturelle.....	149
I. Réduction du nombre de covariables.....	150
II. Construction du modèle linéaire explicatif de durabilité naturelle.....	152
Chapitre 3: Proposition d'outils spectroscopiques pour la prédiction de la durabilité naturelle.....	153
Discussion et conclusion générale.....	172
Annexes.....	185
Annexe 1: Spectres RMN du composé <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]formamide.....	185
Annexe 2: Spectres RMN du composé <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]- 1 <i>H</i> -indole-3-carboxamide.....	188
Annexe 3: Spectres RMN du composé <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetamide.....	191
Bibliographie.....	194

## Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique des différents tissus du bois.....	15
Figure 2: La structure multi-échelle du bois des résineux (à gauche) et des feuillus (à droite) (Schweingruber 1996) .....	16
Figure 3: Photographies des sections transversales du bois de <i>Bagassa guianensis</i> (à gauche ; Photo de Julie Bossu) et de l'Angélique (à droite) (Lehnebach 2015).....	18
Figure 4: Schéma du fonctionnement de l'HIS selon le postulat de Bamber (1976) adapté par Lehnebach (2015) .....	19
Figure 5: Structure de la paroi d'une cellule; A: coupe transversale de la paroi; B: schéma de la disposition des constituants de la paroi avec ML :lamelle moyenne, PCW : paroi primaire et S1,S2 et S3 : différentes couches de la paroi secondaire (Déjardin <i>et al.</i> 2010) .....	21
Figure 6: Les 3 monolignols principaux des lignines.....	22
Figure 7: Exemples de structures chimiques de quelques familles de phénols et polyphénols (Lucci <i>et al.</i> 2017).....	25
Figure 8: Structures chimiques des différents flavonoïdes (Brglez Mojzer <i>et al.</i> 2016) .....	27
Figure 9: Structure chimique du 4',5'-Dihydroxy-epiisocatalponol .....	28
Figure 10: Structure chimiques des diterpènes de l'oléorésine de copahu.....	30
Figure 11: Structure chimique de la vincristine .....	33
Figure 12: Structure chimique de l'aconitine.....	33
Figure 13: Structure chimique de l'éphédrine.....	34
Figure 14: Structure chimiques du rubrénolide (à gauche) et du rubrynlolide (à droite) isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de <i>Sextonia rubra</i> .....	42
Figure 15: Diagramme des différentes classes de durabilité naturelle mesurées pour 404 espèces tropicales après exposition à la microflore active du sol .....	46
Figure 16: coupe transversale du bois de l'Angélique .....	50
Figure 17: Anatomie du plan ligneux de l'Angélique (coupe transversale) avec pa : parenchyme axiale, pr: parenchyme rayon ligneux et v:vaisseau (Photos: Cyrielle Sophie) .....	51
Figure 18: Structure chimique du saccharose présent dans l'aubier de l'Angélique (source : <a href="http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Saccharose">http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Saccharose</a> ) .....	52
Figure 19: Structures chimiques des flavonoïdes isolés du bois de l'Angélique .....	54
Figure 20: Structure chimique des alcaloïdes isolés à noyau indoles isolés chez l'Angélique (1: Dicorynamine; 2: N-acetyl tryptamine; 3: N-oxyde harmalan; 4: Cordisinine C (Anouhe <i>et al.</i> 2015).....	55
Figure 21: Différentes composantes d'un spectromètre de masse .....	59
Figure 22: Critères architecturaux utilisés pour la description des individus de <i>D. guianensis</i> (Lehnebach <i>et al.</i> 2013) .....	64
Figure 23: Schémas et photographies des sections transversales de 4 individus échantillonnés (de gauche à droite: individus A2, A7, A1 et A9) .....	68
Figure 24: Préparation des échantillons avec (a): découpage du billon en forêt, (b) : le plateau, (c) : la délimitation des planches jumelles par position radiale et (d) : la planche de bois destinée au séchage.....	69
Figure 25: Moyenne des pertes de masse en fonction des groupes architecturaux (n=15 individus).....	74
Figure 26: Moyenne des pertes de masse des différents tissus ligneux des 15 individus.....	75
Figure 27: Photographie illustrant le matériel requis pour les extractions en alcaloïdes totaux.....	86
Figure 28: Structure moléculaire du standard 1,2,4,5-Tetrachloro-3-nitrobenzène .....	88
Figure 29: Signaux caractéristiques des protons, <sup>1</sup> H de la tryptamine dans le spectre RMN d'un extrait alcaloïdique total du duramen de l'Angélique.....	89
Figure 30: Courbe de calibration des teneurs en tryptamine commerciale vraie (par pesée) VS les teneurs en tryptamine commerciale mesurées par qRMN.....	92
Figure 31: courbe d'étalonnage de la tryptamine commerciale mesurée en HPLC-DAD .....	93
Figure 32: Courbe de calibration de l'acide gallique (absorbance à 735 nm).....	95
Figure 33: structure moléculaire du radical libre DPPH•.....	96
Figure 34: Structure moléculaire du Trolox .....	96
Figure 35: Courbe de d'étalonnage du Trolox à 515 nm.....	97
Figure 36: Schéma d'une microplaque, montrant la répartition des extraits, des témoins positifs et négatifs, utilisée pour l'évaluation de l'activité inhibitrice à l'égard du champignon lignivore; ML (milieu de culture malt liquide) ; P1 (extrait aubier total) P2 (extrait duramen total) et P3 (extrait alcaloïdique total) aux concentrations de 500 µg/mL à 15,6 µg/mL; T- (Kétoconazole) aux concentrations de 500 µg/mL à 15,6 µg/mL; T+ violet (milieu de culture avec 2% de DMSO) et T+ en bleu milieu de culture avec de l'eau). .....	101
Figure 37: Photographie illustrant l'essai de durabilité naturelle avec les éprouvettes d'essai sur milieu malt-agar en présence de la souche <i>Antrodia vaillantii</i> .....	104
Figure 38: Score plot de l'analyse de PLS-DA obtenu avec la variable catégorielle.....	113
Figure 39: Plot du VIP score du modèle de PLS-DA obtenu avec la variable catégorielle « type architectural » .....	114
Figure 40: Score plot du modèle de PLS-DA obtenu avec la variable « classe de durabilité naturelle » pour le	

duramen externe des 15 individus et les résultats de cross-validation du modèle.....	115
Figure 41: Plot du VIP score du modèle de PLS-DA obtenu avec la variable "classe de durabilité" .....	116
Figure 42: Score plot du modèle de PLS-DA obtenu avec la variable « type de tissu » pour le duramen et aubier externe des 15 individus et le plot de la cross-validation du modèle .....	117
Figure 43: Plot du VIP score pour le modèle de PLS-DA établi à partir de la variable "type du tissu" pour l'aubier et duramen externe .....	118
Figure 44: Exemple de réseaux moléculaires construits à partir de spectres MS <sup>2</sup> ; en violet : ions présents chez les individus de 3 classes de durabilité naturelle, en rose : ions présents chez les individus de classes 1 et 2 et en orange : ions présent chez les individus de classes 2 et 3 ; en gris : liaison entre les nœuds, largeur du nœud proportionnelle à la valeur du cosine score .....	120
Figure 45: Structure moléculaire du composé <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]formamide.....	122
Figure 46: Structure moléculaire du <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]- 1 <i>H</i> -indole-3-carboxamide isolé ( <b>2</b> ).....	123
Figure 47: Structure moléculaire du <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetamide isolé .....	125
Figure 48: Teneur en alcaloïdes totaux en fonction de la quantité initiale en poudre de bois (2g, 4g et 6g) et des durées d'extraction (15 min et 60 min).....	129
Figure 49: Teneurs en alcaloïdes totaux recueillis par extrait à partir de l'individu A4 en fonction des volumes en solvants organiques et aqueux.....	130
Figure 50: Spectres RMN <sup>1</sup> H des extraits alcaloïdiques totaux préparés à partir duramen externe de l'individu A4 à différents taux d'humidité.....	131
Figure 51: Spectres RMN <sup>1</sup> H des extraits alcaloïdiques totaux préparés à partir de l'individu A1 avec différentes durées de stockage à 25 °C.....	133
Figure 52: Teneur moyenne de la tryptamine mesurée pour 9 individus par qRMN .....	135
Figure 53: Teneur moyenne en tryptamine mesurée pour 9 individus par HPLC-DAD .....	136
Figure 54: Comparaison des teneurs moyennes en tryptamine mesurées par qRMN et HPLC-DAD pour les 9 individus de l'échantillonnage .....	137
Figure 55: Représentation graphique des corrélations entre les teneurs moyennes en tryptamine mesurées par qRMN (a) et l'HPLC-DAD (b) pour les moyennes des pertes de masse mesurées chez 9 individus de l'échantillonnage .....	138
Figure 56: Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux mesurées dans le duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage par la méthode de Folin Ciocalteu.....	139
Figure 57: Représentation graphique de la corrélation significative (p < 0,05) entre les teneurs moyenne en composés phénoliques totaux et l'activité antiradicalaire pour les 15 individus de l'échantillonnage.....	140
Figure 58: Représentation graphique de la corrélation entre le composés phénoliques (a) et l'activité antiradicalaire (b) avec la moyenne des pertes de masse mesurées chez les 15 individus de l'échantillonnage.....	141
Figure 59: Représentation graphique des corrélations réalisées entre teneurs mesurées en lignines (Klason et acide-soluble), en $\alpha$ -cellulose, en holocellulose et en extractibles totaux, avec les moyennes de pertes de masse pour 15 individus de l'échantillonnage .....	146
Figure 60: Représentation graphique de la corrélation entre les mesures en infradensité et la moyenne des pertes de masse .....	149
Figure 61: Matrice de corrélations pour les 13 covariables quantitatives mesurées chez 15 individus de l'échantillonnage ; H :hauteur, DBH : diamètre à hauteur de poitrine ;H.D : rapport H/D, ET :extractibles totaux, Lignine :lignine Klason, LAS :lignine acide-soluble, HL :holocellulose ; AC : $\alpha$ -cellulose, PT :polyphénols totaux, AA :activité antiradicalaire et ID : infradensité. ....	151
Figure 62:Cercle de corrélation des variables de l'ACP sur les axes PC1 et PC2 ;les couleurs des variables indiquent la part de contribution dans la variance expliquée (bleu foncé : variable la moins contributive et bleu clair : variable la plus contributive) .....	151



## Liste des tableaux

Tableau 1:Exemples d'alcaloïdes en fonction du précurseur biosynthétique et de l'hétérocycle .....	31
Tableau 2: Les différentes familles chimiques de métabolites détectées dans le bois de l'Angélique .....	53
Tableau 3: Avantage et inconvénients des différentes techniques analytiques utilisées en métabolomique (Shulaev 2006; Simmler et al. 2014).....	57
Tableau 4: Description architecturale des individus de l'échantillonnage (CP: Position de la Couronne, CA: Transparence de la Couronne et MC : Mortalité Charpentière, DBH : Diameter at Breast Height, / : donnée non acquise ; les paramètres CP, CA et MC sont définis dans la Figure 22) .....	66
Tableau 5: Description des classes de durabilité naturelle selon la norme Européenne EN 350 (2016) .....	72
Tableau 6: Résultats des pertes de masse et des classes de durabilité naturelle des duramens externes des 15 individus.....	76
Tableau 7: Récapitulatif des volumes en solvants d'extraction utilisés par rapport à la quantité de poudre de bois initiale .....	87
Tableau 8: Déplacements chimiques et couplages homonucléaires et hétéronucléaires dans le méthanol-d6 pour le <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]formamide .....	122
Tableau 9: Déplacements chimiques et couplages homonucléaires et hétéronucléaires dans le méthanol-d6 pour le <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]- 1 <i>H</i> -indole-3-carboxamide .....	123
Tableau 10 : Déplacements chimiques et couplages homonucléaires et hétéronucléaires dans le méthanol-d6 pour le <i>N</i> -[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetamide .....	125
Tableau 11: Teneur en alcaloïdes totaux après 3 extractions du duramen externe de l'individu A4 .....	131
Tableau12:Teneurs en extractibles totaux, lignine Klason, lignine acide-soluble, lignine totale (Klason et acide-soluble), l'holocellulose et $\alpha$ -cellulose pour le duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage .....	144
Tableau 13:Résultats des p-values obtenues après comparaison des groupes architecturaux en fonction des teneurs en lignine.....	145
Tableau 14: Résultats des p-values par comparaison des groupes d'individus classés par type architectural en fonction des teneurs en $\alpha$ -cellulose .....	145
Tableau 15: Mesures d'infradensité pour les 15 individus de l'échantillonnage .....	147
Tableau 16: Résultats des p-values obtenues après comparaison des groupes architecturaux en fonction des valeurs d'infradensité .....	148
Tableau 17:Résultats des p-values obtenues après comparaison des groupes d'individus par classe de durabilité en fonction des valeurs d'infradensité .....	148

## Liste des équations

Équation 1: Loi de Beer-Lambert avec $\epsilon$ : coefficient d'extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ; $l$ : longueur du trajet optique parcouru en cm ; $C$ : concentration de la solution en $mol.l^{-1}$ .....	62
Équation 2: Calcul du taux d'humidité .....	70
Équation 3: Calcul de la masse théorique anhydre du bois .....	71
Équation 4: Calcul de la perte de masse .....	71
Équation 5: Calcul de la quantité de tryptamine (en g) présente dans l'extrait en alcaloïde totaux .....	90
Équation 6: Calcul du pourcentage d'inhibition des extraits en composés phénoliques totaux ; $A$ : absorbance du contrôle négatif et $B$ : absorbance de l'extrait ou du Trolox .....	97
Équation 7: Calcul du taux d'humidité des éprouvettes d'essais .....	102
Équation 8: Calcul de la masse théorique anhydre des éprouvettes d'essais .....	102
Équation 9: Calcul de la perte de masse pour les éprouvettes d'essai .....	104
Équation 10: Calcul de l'infradensité .....	108
Équation 11: Calcul du critère de sélection AIC .....	110

## Abréviations

AA :	Activité antiradicalaire
ACP :	Analyse en Composantes Principales
AC :	$\alpha$ -cellulose
AIC :	Akaike information criterion (critère d'évaluation de la performance d'un modèle)
AMF :	Angle des microfibrilles de cellulose
CA:	Crown aperture/ouverture de la couronne (indique le pourcentage de réduction de la couronne)
CAD :	Détecteur d'aérosols chargés qui permet une détection universelle des composés chimiques
CD :	Classe de durabilité naturelle
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
COSY:	Correlation spectroscopy
CP :	Crown position / position de la couronne (renseigne sur le statut social de l'arbre)
CS :	Cosine score / score de similarité
DBH :	Diameter at breast height / diamètre à hauteur de poitrine (soit à 1m30 du sol)
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
DPPH:	Diphenyl-1-picryl hydrazyl
ESI:	Electrospray ionization / électronébulisation (source d'ionisation du spectromètre de masse)
ET:	Extractibles totaux
eV:	Electronvolt
H:	Hauteur de l'arbre
H.D:	Rapport hauteur sur le diamètre à hauteur de poitrine
HIS:	Heartwood inducing substance
HL:	Holocellulose (cellulose et hémicelluloses)
HMBC:	Heteronuclear multiple bond coherence
HPLC-DAD:	High performance liquid chromatography- diode array detector/chromatographie liquide à haute pression équipée d'un détecteur à barrette de diodes
HR:	Humidité relative
HRMS:	High resolution mass spectrometry / spectrométrie de masse haute résolution
HSQC :	Heteronuclear single quantum coherence (gHSQC: gradient HSQC)

ID :	Infradensité
IR :	Spectroscopie infrarouge, qui implique le proche infrarouge (PIR) et le moyen infrarouge (MIR)
LAS :	Lignine acide-soluble
LC-MS :	Liquid chromatography-mass spectrometry / chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse
MHz :	Mégahertz
MS :	Spectres obtenus après analyse des composés seuls ou extraits au spectromètre de masse, avec fragmentation (MS <sup>2</sup> ) ou sans fragmentation (MS)
MC :	Mortalité charpentière
PC :	Principal component/composantes principales
pH :	Potentiel d'hydrogène
PLS-DA :	Partial Least Squares/Projection to Latent Structures – Discriminant Analysis (Analyse de classification multivariée supervisée)
PT :	Composés phénoliques totaux
QC :	Quality control (échantillon de contrôle)
qRMN :	Résonnance magnétique nucléaire quantitative
RPD :	Ratio of performance to deviation (Rapport entre l'écart type des mesures de références sur l'erreur standard d'étalonnage)
SPE :	Solid phase extraction/extraction en phase solide
TCNB :	1,2,4,5 Tetrachloro-3 nitrobenzène
TOCSY :	Total correlation spectroscopy
UPLC :	Ultra performant liquid chromatography / chromatographie liquide à très haute pression
UV/VIS :	Ultraviolet/Visible
VIP :	Variable Importance in Projection (permet de hiérarchiser les variables)

## Introduction générale

Le bois est un biomatériau renouvelable, recyclable et biodégradable. Il est aujourd'hui un matériau de choix face à des matériaux concurrents, tel que le béton, le métal ou le plastique et le choisir relève d'une démarche éco-responsable, en faveur du développement durable (Wegner *et al.* 2010; Wimmers 2017). Ce biomatériau possède de nombreuses qualités qui reposent tant sur son esthétique que sur ses propriétés technologiques. Outre son aspect, ses propriétés sont les suivantes : sa densité (qui en fait un matériau léger par rapport à d'autres), sa résistance mécanique, ses propriétés acoustiques et thermiques et sa durabilité naturelle (Bossu 2015). La notion de qualité du bois ne peut être dissociée de son usage car les propriétés technologiques du bois doivent être en adéquation avec l'emploi de ce biomatériau. À ce titre, environ un tiers des essences forestières de Guyane française sont durables à très durables, ce qui constitue un atout majeur pour une mise en œuvre du bois sans avoir recours à des traitements de préservation (Beauchêne 2012). Ainsi, les essences forestières de Guyane présentent des avantages économiques, environnementaux et écologiques indéniables.

La filière forêt et bois en Guyane constitue le troisième secteur économique, après le spatial et l'activité aurifère. Elle est supportée par 215 entreprises (dont 22 PME) et emploie près de 830 salariés pour un chiffre d'affaire annuel de 76 millions d'euros. Plus de 50 % de la filière repose sur le marché local du bâtiment, avec 120 entreprises dédiées à la construction bois : ossature bois, charpente et menuiserie extérieure (Bonjour 2015). Ce marché local absorbe 80% du volume de sciage des grumes lequel varie entre 25 000 et 30 000 m<sup>3</sup> pour un volume de récolte annuelle de 65 000 m<sup>3</sup> (Bossu 2015). La filière forêt-bois bien que déficitaire et restreinte, s'adapte bien aux besoins de la population locale. Depuis plusieurs décennies, la Guyane connaît une forte pression démographique, avec une croissance annuelle de + 2,6 % enregistrée pour l'année 2015. Selon les prédictions de l'INSEE, la population guyanaise pourrait atteindre 427 000 habitants d'ici 2030. Face à cette forte croissance, le besoin de matériaux bois est crucial, justifié par des besoins de logements et d'infrastructures croissants (INSEE 2018). La production de bois pourrait s'intensifier dans les prochaines années, afin de couvrir la demande en bois pour la construction et l'habitat. Cette conjoncture serait favorable à la création d'emplois et au développement de formations dans les métiers du bois, dans un contexte où le chômage est important (23 % de chômeurs dont 44 % chez les jeunes de moins de 24 ans).

En Guyane, 3 essences forestières sont considérées comme les essences commerciales majeures car elles représentent près de 74 % du volume de grume exploité. Parmi ces 3 essences, l'Angélique (*Dicorynia guianensis*) est de loin l'essence la plus exploitée et sa notoriété repose

sur ses bonnes propriétés technologiques (naturellement durable, dense) et de son abondance en forêt. Le bois de l'Angélique est classé comme bois durable (EN 350 2016) néanmoins de nombreux travaux (Amusant *et al.* 2004; Bonjour 1996; Déon 1980) ont mis en évidence une variabilité de sa durabilité naturelle à l'égard de deux types de pourritures : les pourritures cubiques (ex. *Postia placenta*) auquel il est moins résistant et les pourritures blanches (ex. *Coriolus versicolor*). Cette variabilité peut s'observer à l'échelle inter et intra individu. L'aubier est toujours considéré comme non durable tandis que le duramen est classé comme moyennement durable à très durable, ce qui peut engendrer des préjudices pour l'utilisateur. La durabilité naturelle est acquise au cours de la duraminisation, processus physiologique observé chez l'arbre adulte. Elle serait due en majeure partie à la présence d'extractibles, appelés aussi métabolites secondaires, qui imprègnent les parois, lumens et espaces interstitiels des vaisseaux, fibres et cellules de parenchyme. Les métabolites sont généralement synthétisés au cours de la duraminisation dans la zone de transition située entre l'aubier et le duramen puis sont stockés dans le duramen (Taylor *et al.* 2002). Ils peuvent constituer de véritables biomarqueurs de la durabilité naturelle. En plus des extractibles, la durabilité naturelle repose parfois sur d'autres facteurs tels que le type et/ou la teneur en lignine et la densité (Oliveira *et al.* 2010; Wong *et al.* 1983).

En prévision d'une augmentation du volume de bois exploité de cette essence, mais aussi dans un contexte d'une utilisation rationnelle de la ressource, il importe de s'assurer de l'adéquation de ses propriétés avec son emploi afin de garantir une durée de service optimale de l'ouvrage envisagé. Pour cela, à travers une approche pluridisciplinaire alliant les sciences du bois, la chimie des produits naturels et la microbiologie, ce travail de thèse a pour objectif de (i) de comprendre l'origine de la durabilité naturelle chez l'Angélique afin de mieux appréhender sa variabilité et de (ii) proposer des outils de prédiction de cette propriété. Son importance économique à l'échelle locale et la variabilité de sa durabilité naturelle font de l'Angélique un modèle d'étude pertinent pour cette thèse.

L'étude menée au cours de cette thèse se décline en 3 chapitres. Le premier chapitre 'Stratégie de l'échantillonnage' permet de valider la stratégie mise en œuvre pour sélectionner les individus sur la base de la description architecturale de leur couronne, traduisant leurs traits d'histoire de vie (Rutishauser *et al.* 2011). Nous avons supposé que par cette approche, il sera possible de disposer d'un échantillonnage contrasté au regard de la durabilité naturelle et donc adapté à notre étude. La morphologie d'un arbre est le résultat de sa stratégie de croissance et de son développement au cours du temps, ainsi que l'impact des conditions environnementales auxquelles il a été soumis. Par le biais de la description architecturale de leur couronne, qui reflète leur fonctionnement physiologique, 16 arbres ont été sélectionnés puis classés en 3

catégories : arbres de plantation (3), arbres matures (10) et arbres sénescents (3). Sur la base de cette étude, nous postulons que la durabilité naturelle est liée à un type architectural et qu'une variation de la structure de l'arbre induit une variabilité de la propriété du bois. La caractérisation de la durabilité naturelle de l'échantillonnage a été évaluée sur la base d'essais biologiques. Ces essais permettent de tester la résistance à la dégradation lors de l'exposition du bois à la microflore active du sol. Les résultats obtenus dans ce premier chapitre permettront de valider la pertinence de notre approche pour la sélection d'un échantillonnage contrasté en terme de durabilité naturelle.

Le second chapitre de thèse intitulé 'Origine de la durabilité naturelle' repose sur l'hypothèse que l'origine de la durabilité naturelle du bois de l'Angélique est multifactorielle. Nous avons concentré nos recherches autour de facteurs liés à la chimie, à la physique ou encore à l'architecture des individus par le choix de facteurs architecturaux autres que ceux utilisés pour constituer l'échantillonnage (cf chapitre1). Une grande partie de ce chapitre est consacrée aux extractibles : une approche non ciblée et une ciblée ont toutes deux été utilisées pour comprendre le rôle des extractibles dans la durabilité naturelle. L'approche non ciblée se base sur la sélection de potentiels biomarqueurs à l'aide d'une analyse multivariée et de leurs identifications par stratégie de déréplication. Au contraire, l'approche ciblée consiste à quantifier les biomarqueurs potentiels préalablement identifiés puis d'évaluer leurs activités biologiques afin de mieux comprendre leur rôle. Une seconde partie s'intéresse au rôle de macromolécules, la lignine principalement et de la densité du bois par la mesure de l'infradensité. Afin de discuter de la contribution de chacun de ces facteurs choisis, nous avons recherché une corrélation entre ces derniers et les pertes de masse moyennes obtenues suite à la mise en place des essais biologiques. En fonction des résultats de corrélations, un modèle explicatif de la durabilité naturelle observée chez l'Angélique sera proposé.

Enfin, le chapitre 3 consiste à proposer des outils spectroscopiques pour la prédiction de la durabilité naturelle du bois de l'Angélique. Ces outils spectroscopiques, simples, rapides, et peu coûteux sont idéal pour garantir à l'utilisateur un usage du biomatériau adapté à ses propriétés technologiques. Ce chapitre proposera d'évaluer le potentiel prédictif de la spectroscopie infrarouge (IR) à savoir le moyen infrarouge (MIR) et le proche infrarouge (NIR). Pour cela, une recherche de corrélations est effectuée entre les données spectrales (spectres NIR, MIR et MIR/NIR combinés) des échantillons de bois et les pertes de masse moyennes. Il est à noter que l'ensemble du contenu de ce chapitre 3 est en anglais car nous l'avons rédigé à des fins de publications. Cet article est de ce fait prêt à soumission.

## Etat de l'art

### Partie 1 : Le bois, biomatériau complexe

Le bois, appelé aussi xylème secondaire, est une organisation de tissus cellulaires lignifiés qui sont formés à partir du cambium vasculaire, assise génératrice libéro-ligneuse située sous le l'écorce (Figure 1). Le cambium se divise pour former le liber vers l'extérieur et les nouvelles cellules du bois vers l'intérieur. A l'échelle macroscopique, il est possible de distinguer plusieurs tissus lignifiés composant le bois, à savoir l'aubier de couleur claire et le duramen parfois plus foncé selon les essences. L'aubier assure la conduction de la sève brute des racines vers les feuilles, le soutien mécanique et le contrôle de la posture et enfin le stockage du matériel de réserve. Le duramen est issu de la transformation de l'aubier physiologiquement actif qui possède des cellules de parenchymes vivantes. Défini comme étant le bois non fonctionnel, dont les cellules de parenchyme sont mortes et dépourvues de substances de réserve, il est le lieu de stockage de métabolites qui assurent le rôle de défense passive du bois. De plus, il confère également à l'arbre un soutien mécanique. Une zone intermédiaire située entre l'aubier et le duramen est parfois visible chez certaines essences (Déjardin *et al.* 2010; Plomion *et al.* 2001).

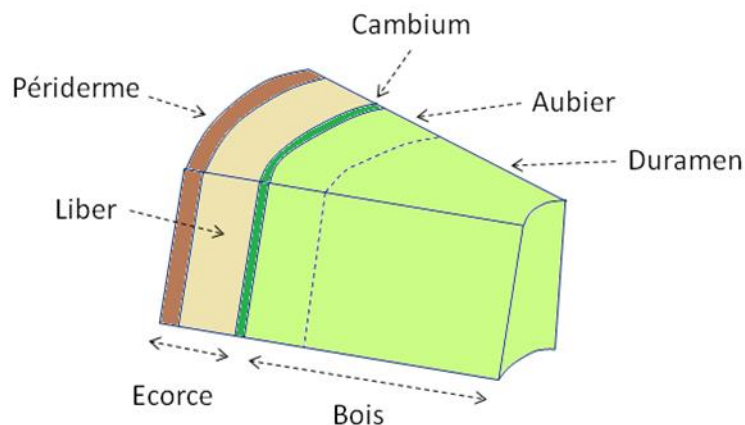


Figure 1: Représentation schématique des différents tissus du bois

Le bois des feuillus est plus évolué que celui des résineux car il présente un type cellulaire pour chaque fonction. Les vaisseaux et fibres, orientés longitudinalement dans le bois, assurent respectivement la conduction et le soutien. Les cellules de parenchymes rayons et axiaux (respectivement dans le plan radial et longitudinal du bois) sont les lieux de stockage des substances de réserve ou de défense selon les tissus (Figure 2). Chez les résineux, le bois est



composé à 90 % de trachéides orientées longitudinalement qui assurent à la fois les fonctions de conduction et de soutien mécanique (Hon and Shiraishi 2000). La diversité de la structure cellulaire associée à une disposition et une forme particulière des cellules dans le bois illustrent bien le caractère hétérogène et anisotrope : les propriétés du bois varient en fonction de la direction considérée (radiale, tangentielle ou longitudinale). Ce constat se vérifie bien chez les feuillus qui comportent plusieurs types cellulaires (Plomion *et al.* 2001).

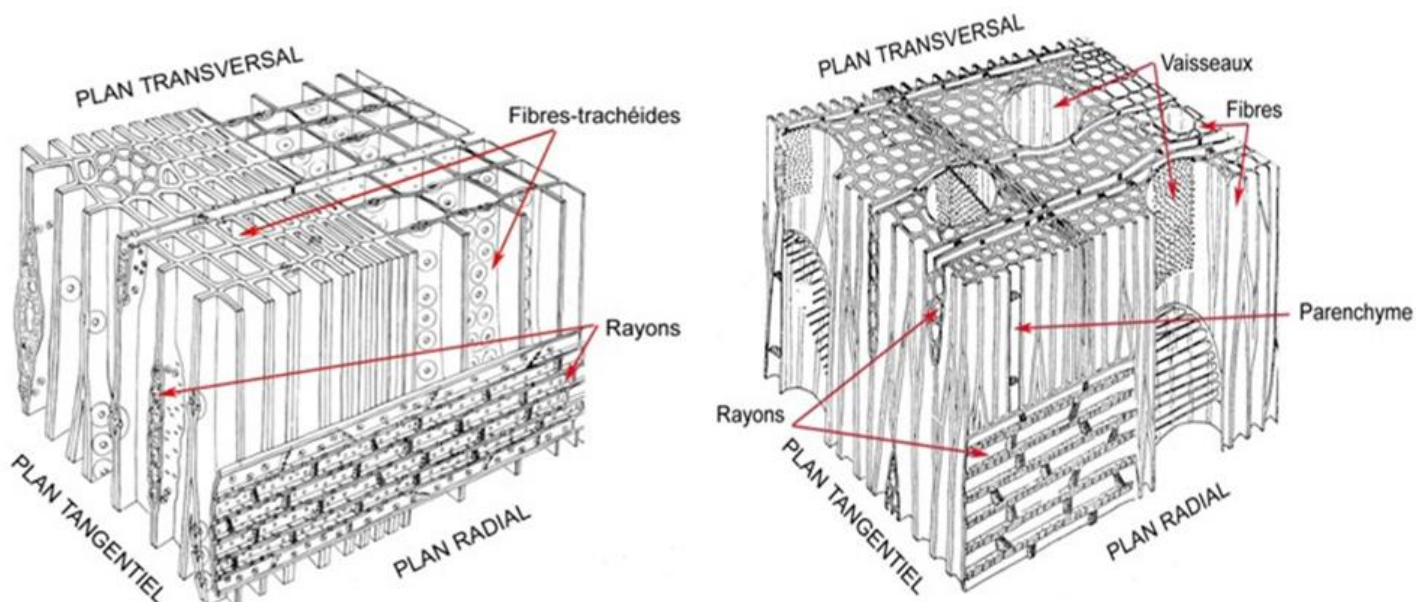


Figure 2: La structure multi-échelle du bois des résineux (à gauche) et des feuillus (à droite) (Schweingruber 1996)

La formation du bois appelée xylogénèse chez les ligneux est un processus développemental qui se déroule en plusieurs étapes sous contrôle génétique. Il implique la division, la croissance et la différenciation des cellules du cambium vasculaire suivies par les phases de lignification des cellules. Dans l'aubier, la xylogénèse se traduit par la mort programmée de toutes les cellules du bois excepté les cellules de parenchyme. Ces dernières continuent d'assurer le stockage du matériel de réserve et sont sollicitées en cas d'agressions de l'arbre par des agents biotiques (Spicer 2005). Les cellules situées dans l'aubier interne permettront la formation du duramen, au cours du processus de duraminisation. (Déjardin *et al.* 2010 ; Plomion *et al.* 2001 ; Taylor *et al.* 2002; Ye and Zhong 2015). Ce processus physiologique s'accompagne de plusieurs changements au niveau de l'anatomie des cellules du duramen, avec une perte de la fonction de conduction suite à la formation de thyllés rendant le bois moins imprégnable. D'autres conséquences directes sont plus visibles au niveau chimique, avec la biosynthèse de

métabolites secondaires (appelés aussi extractibles chez le bois), à partir des substances de réserve suite à l'activation de voies métaboliques. Cette biosynthèse se déroule dans les tissus les plus âgés de l'aubier, proche de la zone de transition ainsi que dans la zone de transition (Taylor *et al.* 2002). Les extractibles stockés dans le duramen nouvellement formé, seront progressivement sujets à un vieillissement par des réactions secondaires (oxydation, déglycosylation, hydroxylation, etc) (Dellus *et al.* 1997 ; Mosedale *et al.* 1996).

Alors que le duramen était considéré comme un tissu 'physiologiquement mort' (IAWA 1964) n'étant pas impliqué dans la biosynthèse d'extractibles, Celedon *et al.* (2016) ont mis en évidence que le duramen de l'espèce tropicale *Santalum album*, était à la fois un lieu de stockage mais aussi de biosynthèse des extractibles. Ils ont découvert que l'intégralité de la voie de biosynthèse des extractibles caractéristiques de l'huile essentielle du bois de santal était présente dans les cellules du duramen, associée à une signature unique du transcriptome de ces extractibles (Celedon and Bohlmann 2017; Celedon *et al.* 2016).

La singularité de ces résultats implique l'existence d'un autre modèle de biosynthèse des extractibles au cours de la duraminisation, en plus des deux autres existants. En effet, Kampe and Magel (2013) ont décrit 2 modèles de duraminisation non exhaustifs qui sont le Type I ou *Robinia*-type et le Type II ou *Juglans*-type. La description de ces deux modèles est basée surtout sur leur profil biochimique, par l'étude du protéome principalement. Dans le Type I, l'accumulation des extractibles (des composés phénoliques) chez le Robinier débute au niveau de la zone de transition, aucun des précurseurs n'ayant été détecté dans les couches les plus externes de l'aubier. En revanche, chez le *Juglans*-type, l'accumulation des précurseurs débute dans les couches les plus externes de l'aubier. Ainsi, les extractibles du duramen sont formés à partir des précurseurs, au niveau de la zone de transition par réaction primaire (synthèse de novo) et réactions secondaires. Le modèle de duraminisation de Type III ou *Santalum*-type, décrit par Celedon and Bohlmann (2017) suggère que quelques cellules du duramen seraient encore actives, et qu'elles sont le siège d'une synthèse *de novo* des extractibles *in situ*. L'établissement du *Santalum*-type modèle repose sur la transcriptomique avec l'utilisation de la technique du séquençage de l'ensemble des ARN messagers qui se veut sensible et rapide. Cette technologie a aussi permis de mettre en évidence un modèle de duraminisation qui dépendrait plutôt de la nature de l'extractible chez l'espèce *Pinus sylvestris* (Lim *et al.* 2016). Le duramen de ce dernier est composé de stilbènes et d'acides résiniques, appartenant à des familles chimiques différentes. Une analyse des transcrits codant pour les enzymes impliqués dans leur biosynthèse a été réalisée à partir des tissus prélevés dans l'aubier et la zone de transition de *P. sylvestris*. Les résultats révèlent que les stilbènes sont synthétisés *in situ* dans la zone de transition rappelant un *Robinia*-type alors que les acides résiniques semblent être

produits dans l'aubier avant d'être transférés directement dans le duramen, suggérant un *Juglans*-type. Avec les nouvelles avancées technologiques, d'autres modèles de duraminisation pourraient être découverts, notamment chez les espèces tropicales qui sont jusqu'à présent très peu étudiées à ce jour. De même, le déroulement de ce processus reste parfois flou pour les espèces tropicales et tempérées : comment est-il initié au sein de l'arbre et à quel moment ?

Le peu d'auteurs ayant travaillé sur le sujet (Yang 1990; Ziegler 1968) ont suggéré que la duraminisation serait un processus de nature passive, résultant de la mort des cellules de parenchyme : il serait dépendant de l'âge de ces cellules. Mais cette première hypothèse a été discréditée par le fait que la limite du duramen ne suivait pas toujours la limite d'un cerne, le front de duraminisation pouvant traverser des cernes d'âges différents sur une même section transversale d'une rondelle de bois (Figure 3) (Büsgen *et al.* 1930).



Figure 3: Photographies des sections transversales du bois de *Bagassa guianensis* (à gauche ; Photo de Julie Bossu) et de l'Angélique (à droite) (Lehnebach 2015)

Selon Bamber (1976), la duraminisation serait plutôt un processus actif. Initié dans les cellules de parenchyme de l'aubier externe, elle serait régulée par l'HIS (Heartwood Inducing Substance) fonctionnant comme une hormone. Cette HIS serait tout d'abord produite au niveau des feuilles. Par la suite, elle serait transportée longitudinalement par le phloème afin d'atteindre le cambium d'où elle se déplacerait de manière centripète le long des cellules de parenchyme, en atteignant les cellules de parenchymes adjacentes aux vaisseaux en même temps (Figure 4). Pour induire la formation du duramen, l'HIS doit atteindre une valeur seuil dans les cellules. Bamber (1976) prend l'exemple du développement des thylles, excroissances des cellules des rayons qui entravent les ponctuations des vaisseaux pour illustrer son postulat. Au niveau des cellules du bois, la proportion en thylles augmente considérablement de l'aubier externe au duramen. Il a été observé que leur développement était simultané dans la direction

longitudinale alors qu'il n'était que séquentiel sur le plan radial.

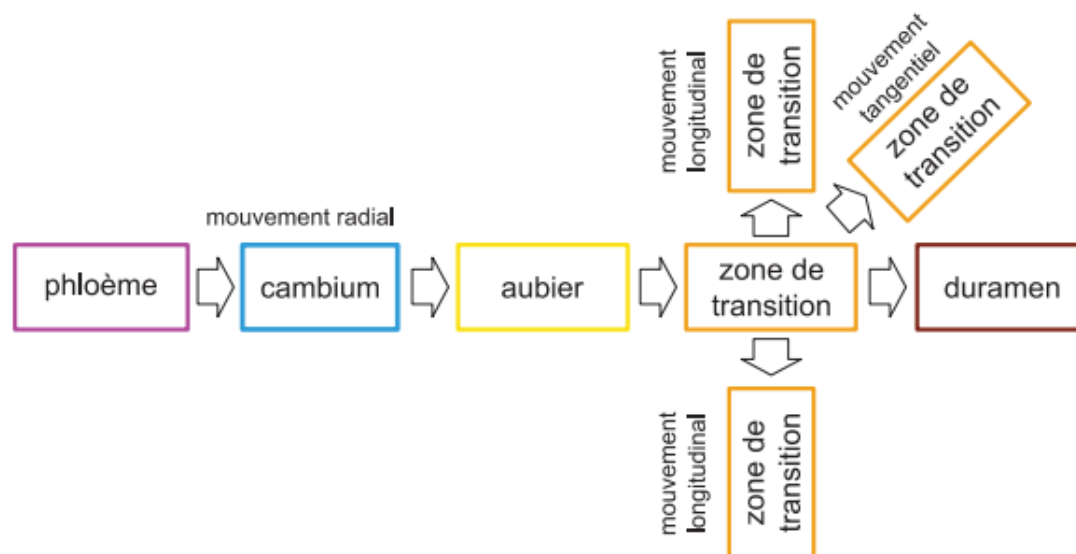


Figure 4: Schéma du fonctionnement de l'HIS selon le postulat de Bamber (1976) adapté par Lehnebach (2015)

L'hypothèse de la nature active du processus de duraminisation est encore aujourd'hui partagée par plusieurs auteurs (Kampe and Magel 2013; Spicer 2005). La nature active du processus implique qu'il est induit mais aussi régulé par des facteurs génétiques (Spicer 2005). Les quelques études portant sur l'expression des gènes chez des espèces tempérées telles que le Robinier (*Robinia pseudoacacia*) ou le Noyer (*Juglans nigra*) indiquent clairement l'existence d'une régulation génétique et hormonale du processus. Une régulation ainsi qu'une abondance plus importante de gènes codants notamment pour la synthèse d'extractibles a été détectée dans la zone de transition (Huang *et al.* 2010 ; Yang *et al.* 2004). De plus, il semble que le déclenchement de la duraminisation serait dépendant de la saison chez les espèces tempérées, notamment chez le Robinier. Elle débiterait à la fin de l'été, se poursuivrait durant l'automne et s'arrêterait avec la saison dormante. L'activité des enzymes impliquées dans la synthèse d'extractibles est beaucoup plus importante en automne dans la zone de transition (Magel *et al.* 1991) et le patron d'expression de gènes en automne est différent de celui des gènes exprimés en été, ce qui traduit une saisonnalité du processus (Yang *et al.* 2004). En revanche, chez l'*Acacia auriculiformis*, espèce tropicale, aucun patron saisonnier de l'activité des enzymes impliquées dans la duraminisation n'a été observé. La formation du duramen se ferait tout au long de l'année (Baqui and Shah 1986). De manière générale, peu d'informations sont disponibles sur le déroulement de la duraminisation pour les espèces tropicales.

La duraminisation assure plusieurs rôles au sein de l'arbre. Tout d'abord, elle contribue à la pérennité de ce dernier par le biais de mécanisme de défense. La synthèse d'extractibles au cours de la duraminisation serait potentiellement une stratégie de défense qualifiée de 'passive' mise en place par l'arbre pour maintenir l'intégrité de son duramen. En effet, le duramen, constitué uniquement de cellules mortes, est dépourvu de matériel de réserve et est imprégné de molécules protectrices lui conférant une protection contre les agressions biotiques (Taylor *et al.* 2002). *A contrario*, en présence de stress biotique, l'aubier présentant encore des cellules vivantes, met en place un système de compartimentation cellulaire afin de limiter la propagation du pathogène à d'autres tissus sains (Morris *et al.* 2016; Shigo 1984). L'aubier active les voies de biosynthèses des phytoalexines (composé phénoliques) qui inhibent l'action du pathogène. De même, des thylls et gommés obstruent les vaisseaux ou trachéides pour s'opposer à sa propagation. L'ensemble de ces événements conduit à la mort des cellules infectées (Spicer 2005). Le bois qui a réagi à ce stress devient décoloré, avec une perméabilité réduite, un dépôt important en métabolites de défense et est dépourvu en sucres non structuraux. En ce sens, le système de défense mis en place par l'aubier et le processus de duraminisation sont très similaires, ce qui concorde avec l'idée du rôle de défense passive de la duraminisation chez l'arbre (Spicer 2005).

La pérennité de l'arbre dépend autant des mécanismes de défense mis en œuvre (qu'ils soient actifs ou passifs) que des conditions de croissance pour qu'il puisse avoir accès à la lumière, à l'eau et aux éléments minéraux essentiels à son développement. Les stratégies de croissance mises en place par les espèces pionnières et tolérantes illustrent bien ce propos (Bossu 2015). Les pionnières, espèces colonisatrices de pleines lumières ont généralement une durée de vie plus courte que les espèces tolérantes. Il a été constaté que les pionnières présentent de fort taux de croissance mais produisent généralement un duramen qui se caractérise par de faibles propriétés technologiques notamment une faible rigidité, durabilité naturelle et densité (Bossu 2015; Lehnebach 2015). Par opposition, les espèces tolérantes à l'ombre possèdent un développement plus lent et régulier à l'origine d'un bois plus dense, rigide et durable et résistant mieux à la forte compétition. De ce fait, leur duramen se caractérise par de bonnes propriétés technologiques. Certaines espèces qualifiées de « paradoxales » allient à la fois croissance rapide et bonnes qualités technologiques de leurs duramens : c'est le cas de la bagasse (*Bagassa guianensis*) et du cèdre sam (*Cordia alliodora*) (Bossu 2015).

Pour certains auteurs tels que Bamber (1976), la duraminisation aura pour autre fonction de réguler la quantité d'aubier afin de le conserver à un niveau physiologique optimal (Bamber 1976 ; Taylor *et al.* 2002). Plus précisément, la formation du duramen permettrait d'optimiser les volumes en aubier en lien avec les besoins de l'arbre (Taylor *et al.* 2002) et de limiter ainsi

l'effet 'puits' de l'aubier. Cette hypothèse laisse suggérer que le stockage des glucides est énergétiquement plus coûteux que la synthèse de métabolites. Jusqu'à présent, aucun travail de recherche n'a pu être effectué sur l'énergie requise pour la biosynthèse des extractibles dans le bois. Ces extractibles synthétisés parfois en très grandes quantités dans le bois imprègnent une matrice lignocellulosique constituée de macromolécules.

D'un point de vue biochimique, le bois se compose majoritairement de cellulose (en moyenne de 40 à 50 %), d'hémicelluloses (25 à 35 %) et de lignine, dont les proportions sont plus importantes chez les résineux (23 à 33 %) que les feuillus (16 à 25 %) (Hon and Shiraishi 2000). Ces 3 biopolymères structurent la paroi cellulaire du bois qui comprend une lamelle moyenne, une paroi primaire et une paroi secondaire. La paroi secondaire, plus épaisse, s'organise en 3 couches appelées S1, S2 et S3 qui sont caractérisées par des épaisseurs, une composition chimique et un angle de microfibrilles de cellulose (AMF) spécifique (Figure 5) (Déjardin *et al.* 2010).

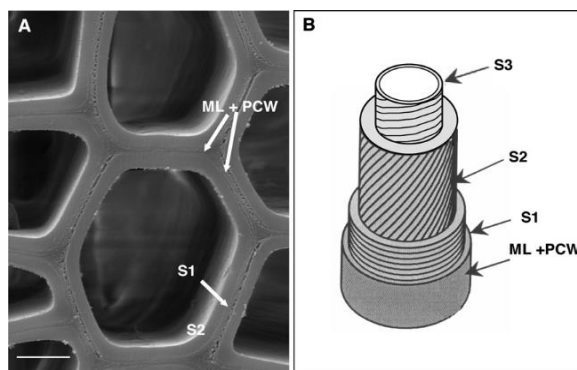


Figure 5: Structure de la paroi d'une cellule; A: coupe transversale de la paroi; B: schéma de la disposition des constituants de la paroi avec ML :lamelle moyenne, PCW : paroi primaire et S1,S2 et S3 : différentes couches de la paroi secondaire (Déjardin *et al.* 2010)

La cellulose est le principal constituant chimique du bois et le polymère le plus abondant dans la nature. Cet homopolymère linéaire est composé de 7000 à 15000 unités de glucoses liées entre elles par une liaison glycosidiques  $\beta$  1-4. L'association de 6 chaînes de cellulose est à l'origine de la microfibrille de cellulose et un ensemble de microfibrilles constitue une fibre de cellulose. La formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires (entre molécules d'une même chaîne) et intermoléculaires (entre molécules de cellulose) est donc importante pour assurer la rigidité de la chaîne de cellulose. Une partie des microfibrilles peut être composée de régions hautement ordonnées (cristalline) et de régions moins ordonnées (amorphe). À la différence de la cellulose, les hémicelluloses sont des hétéropolymères constitués de plusieurs hexoses (glucose, galactose, mannose), de pentoses (xylose, arabinose) et d'acides uroniques. Elles possèdent un degré de polymérisation beaucoup plus faible (moins de 200 unités osidiques) que la cellulose avec une structure amorphe. Généralement, les hémicelluloses des résineux

possèdent des galactoglucomannanes acétylés et des arabinoglucuronoxylanes tandis que chez les feuillus, elles sont riches en xylane et contiennent un peu de glucomannane. Les hémicelluloses permettent une cohésion entre les microfibrilles de cellulose et renforce l'intégrité de la paroi cellulaire. La cellulose et les hémicelluloses forment tous deux l'holocellulose du bois (Hon and Shiraishi 2000; Stevanovic 2016; Stevanovic and Perrin 2009).

La lignine est un polymère amorphe de nature phénolique, qui assure aussi la rigidité et l'épaississement de la paroi cellulaire. D'une grande diversité structurale, elle constitue un réseau moléculaire tridimensionnel difficile à déterminer. Elle est issue de la polymérisation oxydative de 3 monolignols, l'alcool p-coumarylique (H), l'alcool coniférylique (G) et l'alcool sinapylique (S) qui diffèrent par leur degré de substitution du noyau aromatique (Figure 6). Après polymérisation, ces 3 alcools sont à l'origine de 3 types de lignines différentes, respectivement p-hydroxyphényles, guaiacyles et syringyles. Chez les feuillus, la lignine est surtout constituée d'unités guaiacyles (G) et syringyles (S) alors que l'unité guaiacyle est majoritaire chez les résineux. La lignine établit des liaisons de type éther, ester ou glycosidique avec la cellulose et les hémicelluloses (Bruneton 2016; Hon and Shiraishi 2000; Stevanovic and Perrin 2009).

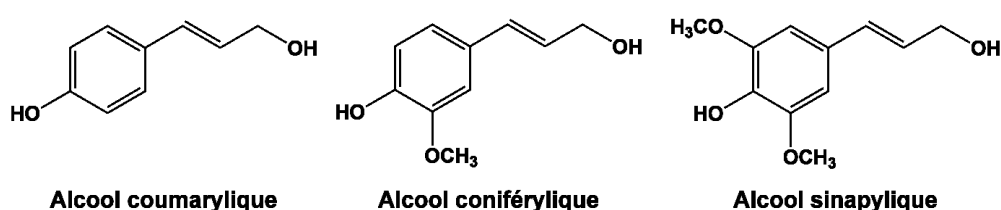


Figure 6: Les 3 monolignols principaux des lignines

Des substances inorganiques sont aussi présentes dans le bois, dans des proportions qui varient entre 0,1 et 0,5 % chez les bois tempérés contre 3 à 4% chez le bois des régions tropicales (Hon and Shiraishi 2000). Les substances sont absorbées par l'arbre au niveau de son système racinaire, puis elles sont transportées dans les divers tissus. Elles constituent les cendres du bois c'est-à-dire les résidus restant après combustion (Stevanovic and Perrin 2009). Les principaux minéraux identifiés sont le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le sodium (Na), le fer (Fe) ou encore la silice (Si). D'autres substances détectées sont aussi présentes à l'état de traces (Hon and Shiraishi 2000). Certains éléments sont essentiels au développement de l'arbre tandis que d'autres ne le sont pas. Ce constat a été effectué chez le Sapin (*Abies grandis*) pour

lequel le Ca, K ou Na sont essentiels à sa croissance (Stevanovic and Perrin 2009).

Enfin, plusieurs familles de métabolites secondaires sont également présentes dans l'arbre, dans le bois mais aussi au niveau des feuilles, des racines, de l'écorce et des nœuds. Composés de faibles poids moléculaires (par opposition aux macromolécules du bois), ils sont davantage connus sous le nom d'extractibles du fait qu'ils peuvent être aisément extraits par le choix de solvants adaptés (organiques, aqueux, etc) (Bruneton 2016; Stevanovic and Perrin 2009). Ils sont particulièrement localisés dans le lumen et paroi des cellules ou dans des cellules spécialisées tels que les canaux résinifères chez les résineux ainsi que dans les espaces interstitiels. Ces métabolites, essentiels à l'adaptation et à la survie de l'arbre, assurent le rôle de défense en constituant une barrière chimique ou physique pour faire face aux agents de dégradation du bois. Certains composés issus du métabolisme secondaire, notamment la lignine, sont impliqués dans la structure cellulaire du bois et de ce fait, ne sont pas considérés comme des extractibles (Bruneton 2016).

A l'échelle interspécifique, les variations de la composition en extractibles, d'un point de vue quantitatif et qualitatif, s'expliquent plus aisément. La forêt amazonienne de Guyane regroupe près de 1600 espèces ligneuses différentes contre 130 en France métropolitaine, ce qui atteste de la forte biodiversité génétique des espèces tropicales (Bonjour 2015). Les bois tropicaux sont connus pour leur fortes teneurs en extractibles plus importantes que celles des bois des régions tempérées (Hon and Shiraishi 2000). En effet, les espèces tropicales *Eperua falcata* ou *Vouacapou americana* qui présentent respectivement un rendement en extrait totaux de 27,9 % et 26,9 % peuvent être citées en exemple (CIRAD-CTFT 1993). Les espèces ligneuses se caractérisent parfois par leur propre signature chimique. Les tropolones sont présentes spécifiquement dans la sous-famille des Cupressoïdées. Ainsi, les métabolites constituent de véritables marqueurs chimiotaxonomiques (Haluk and Roussel 2000). Un autre exemple peut être cité avec la rubrynolide, lactone constituée d'une liaison triple en position terminale, qui n'est retrouvée que dans le bois de *Sextonia rubra* (Lauraceae). Ce composé est propre à cette espèce et constitue un marqueur chimiotaxonomique (Rodrigues 2010).

À l'échelle intraspécifique, la composition chimique en extractibles du bois est dépendante de nombreux facteurs liés à la génétique, aux paramètres intrinsèques de l'arbre ainsi qu'aux paramètres environnementaux (conditions géographiques ou encore les traitements sylvicoles). Au sein d'une même espèce, il est possible d'observer des différences au niveau des teneurs en un ou plusieurs métabolites secondaires. Chez le Teck (*Tectona grandis*), les teneurs de certains extractibles dont la tectoquinone et l'isodesoxylapachol varient en fonction de l'âge de l'arbre, avec des teneurs qui augmentent dans le duramen avec l'âge de l'arbre (Moya *et al.* 2014). De



même, les teneurs en extractibles varient en fonction des paramètres édaphiques : chez cette même espèce, les teneurs sont plus importantes pour les individus présents sur un sol ferrugineux drainé que sur un sol tropical hydromorphe (Kokutse *et al.* 2010). A l'échelle intra individu, les variations de la composition chimique sont surtout liées à l'âge du bois. Des différences au niveau des teneurs en extractibles ont été observées le long du profil radial chez le Robinier, entre le bois juvénile et le bois mature avec des teneurs en polyphénols totaux plus faibles dans le bois juvénile que le bois mature (Latorraca *et al.* 2011).

Parmi les extractibles du bois, 3 familles sont bien représentées chez les arbres. Les **composés phénoliques**, spécifiques des végétaux ainsi que des microorganismes constituent une très grande famille de métabolites secondaires. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau aromatique mais surtout par leur origine biosynthétique. La voie de biosynthèse la plus courante est la voie de l'acide shikimique. Elle permet la synthèse des métabolites à partir des oses, qui conduit aux amino-acides aromatiques puis, par désamination, aux acides cinnamiques et leurs nombreux dérivés. Une seconde voie fait intervenir l'acétate, qui conduit aux polyacétates à l'origine de composés souvent polycycliques (Bruneton 2016; Stevanovic and Perrin 2009). Les sous familles des composés phénoliques issues de ces voies de biosynthèses sont très variées (**Figure 7**), quelques sous-familles seront détaillées ci-après.

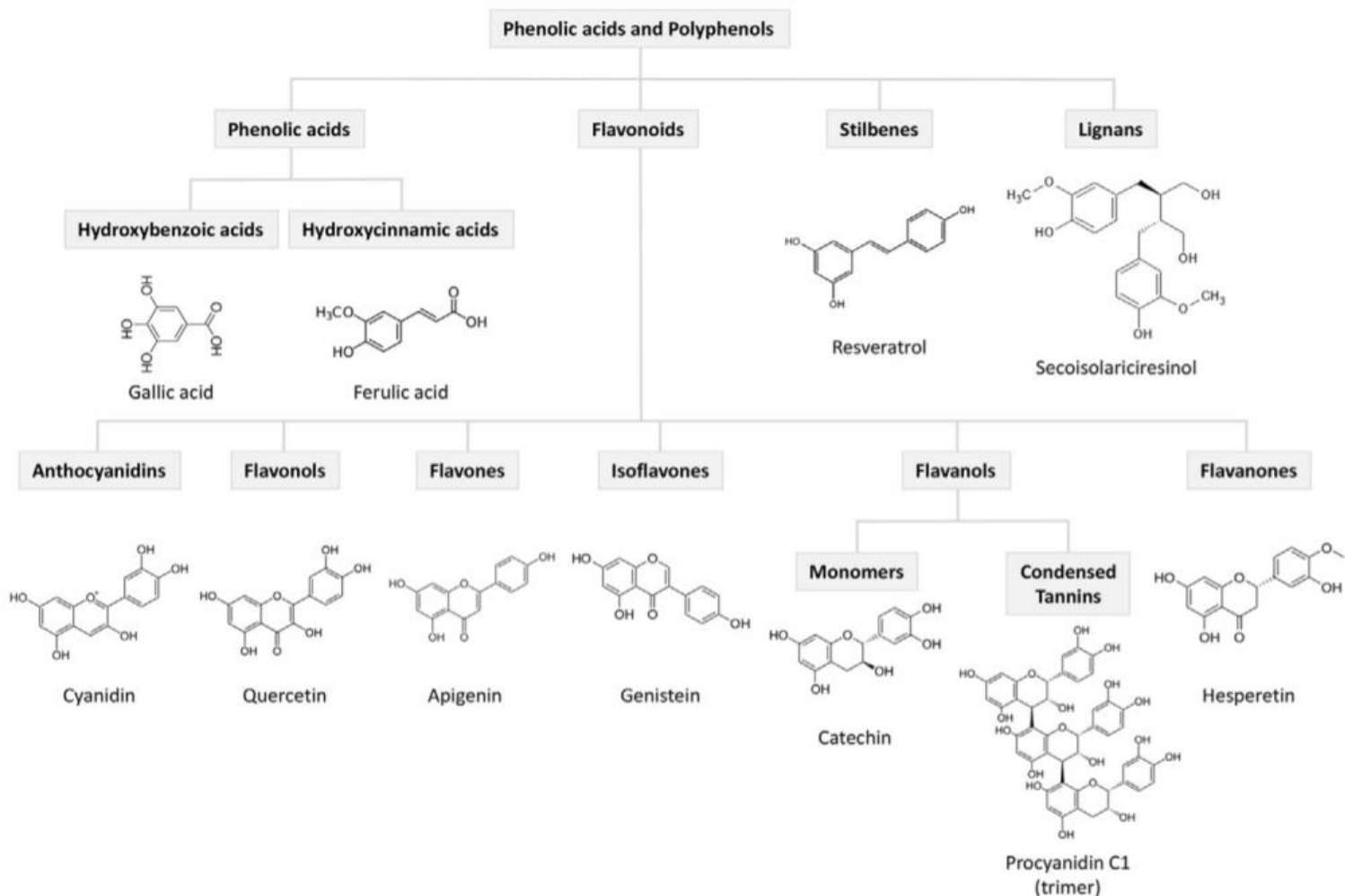


Figure 7: Exemples de structures chimiques de quelques familles de phénols et polyphénols (Lucci *et al.* 2017)

Les *phénols simples* ( $C_6$ ) et les *acides-phénols* dérivés de l'acide benzoïque ( $C_6-C_1$ ) et de l'acide cinnamique ( $C_6-C_3$ ) font partie de cette famille. Les phénols simples sont moins fréquents dans la nature mais quelques métabolites, comme l'hydroquinone se retrouve dans plusieurs familles (Lamiaceae, Rosaceae, etc). Au contraire, les acides-phénols présents sous forme libre mais aussi combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside sont plus commun. Les propriétés biologiques des phénols et acides-phénols restent encore peu connues ce qui restreint leurs utilisations. Les dérivés salicylés par exemple, possèdent des propriétés anti inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques. Parmi ces dérivés, l'acide phénol le plus connu est l'acide salicylique (isolé de l'écorce du saule) qui a été utilisé pour synthétiser l'acide acétylsalicylique. Ce dernier est commercialisé sous le nom de 'aspirine' (Bruneton 2016).

Les *stilbènes* ( $C_6-C_2-C_6$ ) sont des métabolites caractérisés par la présence de deux noyaux benzéniques qui sont séparés par un pont éthane ou éthène. De configuration Z ou E, ils peuvent être libres ou associés à un hétéroside. Ces composés sont majoritairement présents chez les résineux. Ils possèdent des activités antimicrobiennes et antifongiques, mais seraient aussi antiradicalaire et chélateurs de métaux. La pinosylvine, stilbène isolé du duramen de l'espèce *Pinus sylvestris* peut potentiellement être utilisée comme produit de préservation du bois à l'égard de champignons lignivores (Lu *et al.* 2015). Le stilbène le plus connu est le resvératrol (Figure 7), isolé à partir de certains fruits comme le raisin. Ce composé est très utilisé en cosmétologie ainsi que dans la production de certains compléments alimentaires du fait de ses propriétés antioxydantes et anti inflammatoires (Bruneton 2016; Stevanovic and Perrin 2009).

La sous famille des *flavonoïdes* ( $C_6-C_3-C_6$ ) est une des plus importantes des composés phénoliques, de par leurs nombres mais aussi leurs activités biologiques variées (Figure 8). Cette sous-famille possède une homogénéité structurale, généralement constituée de deux noyaux aromatiques A et B associés à un hétérocycle C oxygéné. La diversité des flavonoïdes est maximale chez les feuillus, en particulier dans le phylum des Magnoliophyta. Cette diversité repose sur différents degrés d'oxydation et de polymérisation du noyau A. Ainsi, la sous famille des flavonoïdes peut être divisée en anthocyanines, flavanes, flavanones, isoflavones et chalcones. Ils sont de bons antioxydants, généralement présents en très grande quantité dans les fruits et légumes et possèdent de nombreuses activités biologiques, notamment antimicrobiennes, antiinflammatoires insecticides ou encore antifongiques. Ils confèrent aussi au tissu végétal une coloration caractéristique (Panche *et al.* 2016).

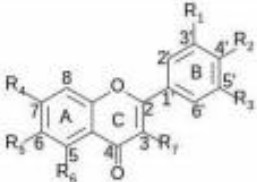
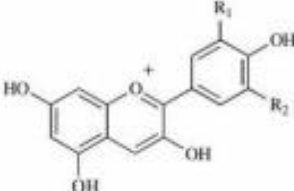
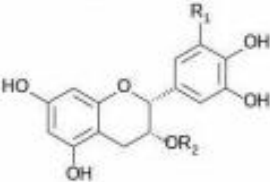
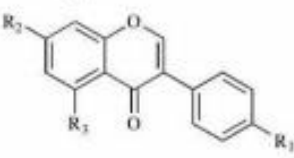
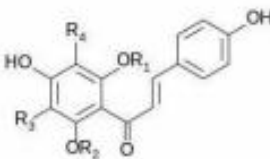
Class	Structure	Representatives
<b>Flavonoids</b>		
Flavonols Flavones Flavanones		Quercetin Apigenin Naringenin
Anthocyanidins		Delphinidin Pelargonidin
Catechins		Catechin Epicatechin Epigallocatechin Epigallocatechin-3-O-gallate
Isoflavones		Daidzein Genistein
Chalcones		Isoliquiritigenin Xanthohumol

Figure 8: Structures chimiques des différents flavonoïdes (Brglez Mojzer *et al.* 2016)

Les *tanins* se définissent comme étant des « produits naturels phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses » (Bruneton 2016). En effet, la plupart des tanins sont astringents car ils ont la capacité de se complexer de manière réversible ou irréversible avec des macromolécules telles que des protéines. Ils possèdent aussi d'autres propriétés biologiques notamment une activité antioxydante et une activité d'inhibition enzymatique. Les tanins sont scindés en deux groupes en fonction de leur structure mais aussi de leur origine biosynthétique : tanins hydrolysables et les tanins condensés (proanthocyanidols). Les tanins hydrolysables sont des esters constitués d'un sucre, généralement le glucose et d'un nombre variable d'acides phénols, soit l'acide gallique (tanins galliques) ou alors l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés (tanin ellagiques). Les tanins condensés sont des polymères flavaniques, qui se caractérisent par des unités flavana-3-ols liées entre elles par des liaisons de type carbone-carbone. Ils ont été détectés chez de nombreux

végétaux et constituent les composés phénoliques les plus répandus (Bruneton, 2016). Certaines plantes sont connues pour être riches en tanins : c'est le cas des bois de *Quercus.sp*, qui sont par ailleurs très utilisés dans les secteurs du vin. Leurs bois servent à la fabrication de fûts pour le vieillissement du vin et permettent ainsi la création de nouveaux arômes dans le vin (Zhang *et al.* 2015).

Les *quinones* sont des composés oxygénés issus de l'oxydation de phénols. Elles ont une distribution restreinte à certaines familles (Ebenaceae, Fabaceae, Juglandaceae, etc). En fonction de la structure de leur squelette, elles sont classées en plusieurs catégories de quinones telles que les benzoquinones, les naphthoquinones ou encore les anthraquinones (Bruneton, 2016). Des quinones ont été retrouvées dans le bois de certaines espèces tropicales, notamment chez le Teck. Parmi ces quinones, le 4',5'-Dihydroxy-epiisocatalponol (Figure 9) possède une activité antifongique, c'est-à-dire qu'elle est capable d'inhiber la croissance du champignon lignivore *Trametes versicolor* en condition *in vitro* (Niamké *et al.* 2012). Dans le bois de *Diospyros virginiana*, la 7-methyljuglone et ses dérivés isolés sont également doués d'une activité termiticide (Carter *et al.* 1978).

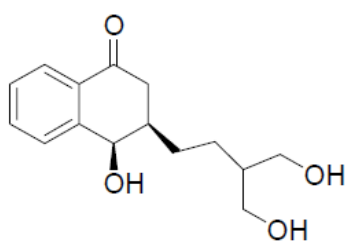


Figure 9: Structure chimique du 4',5'-Dihydroxy-epiisocatalponol

Malgré leurs activités biologiques reconnues, les applications des quinones restent tout de même limitées. Certaines plantes contenant des naphthoquinones sont utilisées en cosmétologie pour la coloration des ongles, la teinture de cheveux ou la réalisation de tatouage temporaire tel que le Henné. D'autres plantes chez lesquelles des anthraquinones sont présentes, ont des applications plutôt thérapeutiques et sont traditionnellement utilisées pour des affections cutanées (folioles du *Senna alata*), ou en tant que laxatif (feuilles du *Cassia angustifolia*) (Bruneton 2016).

Les **terpènes et terpénoïdes** forment aussi une grande famille de métabolites secondaires chez les végétaux. Ces composés sont constitués par la condensation d'un nombre variable d'unité isoprénique de 5 atomes de carbones, squelette de base à l'origine de monoterpène (C<sub>10</sub>),

sesquiterpène ( $C_{15}$ ), diterpène ( $C_{20}$ ), triterpène ( $C_{30}$ ), tétraterpène ( $> C_{40}$ ) polyterpènes. À la différence du terpène qui est un hydrocarbure simple, le terpénoïde possède un groupe fonctionnel tel qu'un alcool, un acide carboxylique, une cétone, etc. Il existe deux voies de biosynthèses des unités isopréniques chez les végétaux : la voie du mévalonate qui conduit à la synthèse des sesqui- et triterpènes et la voie du phosphate de méthylérythritol, qui permet la synthèse de mono- et diterpènes (Bruneton 2016; Kabera 2014).

Les *huiles essentielles* sont des mélanges complexes majoritairement de terpènes et terpénoïdes les plus volatils (mono- et sesquiterpènes) et aussi quelques composés aromatiques issus du phénylpropane ( $C_6-C_3$ , voie de l'acide shikimique) tels que la vanilline ou l'eugénol. Elles sont facilement extraites par entraînement à la vapeur (hydrodistillation, etc). Ces huiles essentielles, par la présence de ces composés, possèdent de nombreuses propriétés biologiques, ce qui explique les applications dans divers domaines. Par exemple, l'huile essentielle du bois de rose (*Aniba rosaeodora*) contient du linalol et cette huile est très prisée pour ses propriétés olfactives en parfumerie ainsi qu'en cosmétique (Almeida *et al.* 2013). D'autres utilisations peuvent être attribuées aux huiles essentielles, notamment en aromathérapie car elles présentent des propriétés pharmacologiques. Par exemple l'huile essentielle de Tea tree (feuilles de *Melaleuca alternifolia*), dont le composé majoritaire est le terpinèn-4-ol, possède des propriétés antimicrobiennes, insecticides et antiinflammatoires et est utilisée pour traiter l'herpès, les morsures d'insectes ou les pellicules (Ali *et al.* 2015).

Les terpènes et terpénoïdes sont aussi des constituants des *oléorésines* végétales, retrouvées chez les Anacardiaceae, les Burseraceae, les Dipterocarpaceae ou les Fabaceae. Les oléorésines sont constituées d'huiles essentielles et de résines, sécrétées par des canaux résinifères dans le bois. Par exemple, l'oléorésine du *Copaifera sp.* connue sous le nom de 'copahu' est employée en cosmétologie ainsi qu'en pharmacie pour ses propriétés antibactérienne, antiinflammatoire ou contre les taches pigmentaires. Ces activités biologiques seraient dues à la présence de diterpènes dans l'oléorésine de copahu (Figure 10) (Vargas *et al.* 2015).

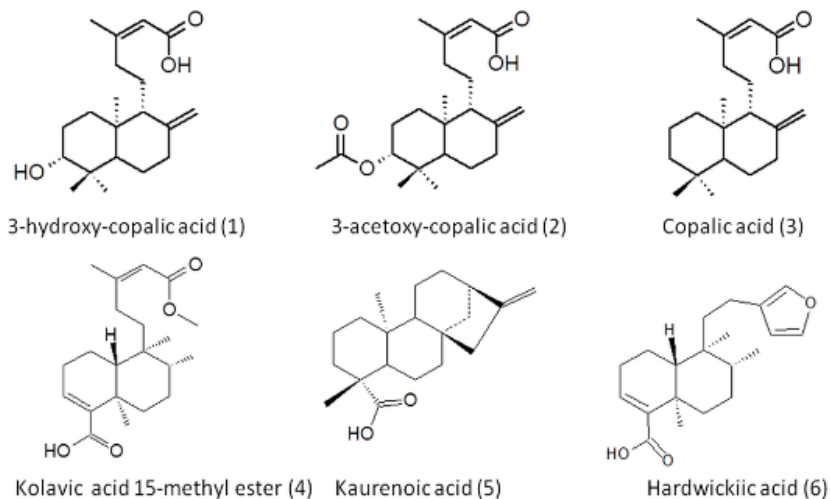


Figure 10: Structure chimiques des diterpènes de l'oléorésine de copahu

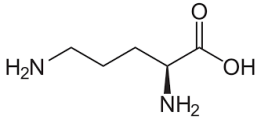
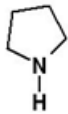
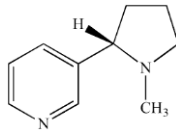
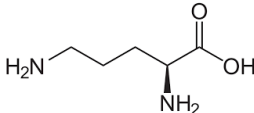
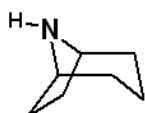
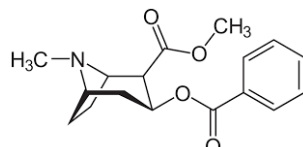
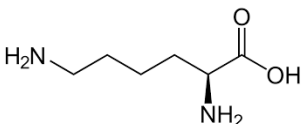
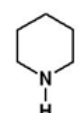
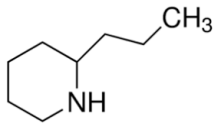
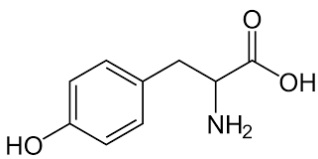
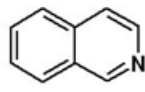
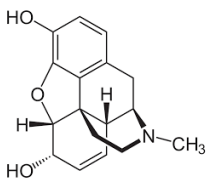
La myrrhe de l'arbre à encens (*Commiphora myrrha*) possède des activités antimicrobiennes et antiparasitaires. Cette myrrhe est une *gomme-résine* composée de résine (25 à 40 %) qui comprend des triterpènes et quelques sesquiterpènes à l'origine des activités biologiques, de gomme (30 à 60%) et de composés volatils qui lui confèrent une odeur caractéristique (Bruneton 2016; Mohamed *et al.* 2014). Enfin, des polyterpènes sont retrouvés dans le *latex*, contenu dans les cellules laticifères de certaines familles telles que les Euphorbiaceae, les Apocynaceae, les Moraceae et Sapotaceae (Konno 2011). Le latex est traditionnellement utilisé pour soigner certaines pathologies, comme le latex de l'espèce *Euphorbia peplus* pour le traitement de lésions cutanées (Ernst *et al.* 2015). Le latex récolté chez l'espèce *Hevea brasiliensis* sert à produire le caoutchouc (Chapuset *et al.* 2016).

Enfin, la sous-famille des **alcaloïdes** est la dernière famille de métabolites secondaires qui sera abordée dans cette partie. Les alcaloïdes sont des substances azotées et basiques qui ont une distribution restreinte chez les végétaux car ils ne sont retrouvés que chez quelques familles (Lauraceae, Solanaceae, Rutaceae, Fabaceae, etc). Ils possèdent des activités pharmacologiques significatives, parfois à de très faibles teneurs et ces activités sont très variées, dû notamment à la diversité structurale de ces composés. Très utilisés en pharmacie, certains alcaloïdes sont d'ailleurs actuellement employés comme principe actif dans des spécialités pharmaceutiques (Amirkia and Heinrich 2014). Cette famille chimique a toujours suscité une attention particulière au regard de la complexité des structures et de leurs potentialités en pharmacologie. De nombreux chimistes organiciens ont eu recours à la synthèse organique de certains alcaloïdes, en s'inspirant de leurs structures chimiques telles qu'elles sont présentes à l'état naturel. Depuis les années 1960 jusqu'à aujourd'hui, de nombreux alcaloïdes ont pu être

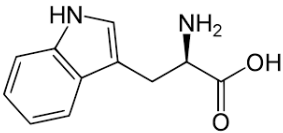
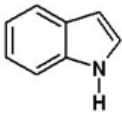
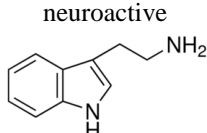
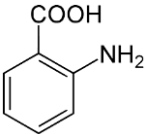
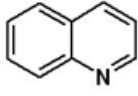
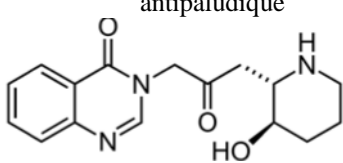
synthétisés (Liu *et al.* 2016). La difficulté de les purifier dans un extrait complexe et les faibles teneurs du métabolite dans la plante ont motivé leur synthèse organique. Par la synthèse, il est alors possible d'avoir accès au métabolite ainsi qu'à ses analogues, et parfois, d'obtenir des composés qui présentent des activités biologiques supérieures au produit naturel d'origine.

Les alcaloïdes sont généralement subdivisés en 3 groupes, en fonction de leur origine biosynthétique et de leur structure chimique. Les *alcaloïdes vrais* sont synthétisés à partir d'acides aminés et sont généralement stockés à l'état de sel dans les vacuoles. Ils sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs atomes d'azote qui sont inclus dans un système hétérocycle. Plusieurs hétérocycles azotés, issus de différents acides aminés ont été identifiés (pyrrole, indole, pyridine, isoquinoline ou encore quinoléine). Quelques exemples de structures hétérocycliques azotées en fonction de leur précurseur biologique sont donnés dans le **Tableau 1** ci-dessous (Bruneton 2016; Kabera 2014).

**Tableau 1: Exemples d'alcaloïdes en fonction du précurseur biosynthétique et de l'hétérocycle**

Précurseur biosynthétique	Système hétérocyclique	Exemple d'alcaloïde
Ornithine 	Pyrrolidine 	Nicotine (feuilles de <i>Nicotiana tabacum</i> ), propriétés psychotropes et anxiolytiques 
Ornithine 	Tropane 	Cocaïne (feuilles d' <i>Erythroxylum coca</i> ), propriétés anesthésiques et stimulantes 
Lysine 	Pipéridine 	Conine ( <i>Conium maculatum</i> , toutes les parties de la plante) poison neurotoxique 
Tyrosine 	Isoquinoléine 	Morphine ( <i>Papaver somniferum</i> ), propriétés analgésiques et antitussives 



Tryptophane	Indole	Tryptamine (duramen de <i>Dicorynia guianensis</i> ), neuroactive
		
Acide anthranilique	Quinololéine	Fébrifugine ( <i>Dichroa febrifuga</i> ), propriété antipaludique
		

Parmi les *alcaloïdes vrais*, le groupe des alcaloïdes issus du métabolisme du tryptophane a été beaucoup étudié, notamment parce qu'il renferme des groupes d'alcaloïdes ayant une diversité structurale et aussi pour l'intérêt pharmacologique des composés, comme les tryptamines ou les carbolines à propriétés hallucinogènes. Les propriétés hallucinogènes de ces composés reposent surtout sur le noyau indole car ces composés ressemblent fortement à des neuromédiateurs, tels que la sérotonine ou l'adrénaline (Bruneton 2016). Ils sont retrouvés chez certaines espèces appartenant aux Agaricaceae, Fabaceae mais aussi les Myristicaceae localisées en Amérique du Sud. Dans l'écorce des espèces du genre *Virola* par exemple, de nombreux dérivés de la tryptamine sont présents : *N,N*-diméthyltryptamine, et son dérivé 5 méthoxylé ainsi que des traces de carbolines. Ces composés sont aussi présents dans une liane d'Amérique du sud appelée *Banisteriopsis caapi*, qui rentre dans la préparation d'un breuvage hallucinogène (l'ayahuasca). Les alcaloïdes indoloterpéniques sont les plus nombreux parmi les dérivés du tryptophane, dont la biosynthèse se fait à partir de la tryptamine et de la stryctosidine. Leurs répartitions est restreinte à certaines familles notamment les Apocynaceae avec l'espèce *Catharanthus roseus* dont les métabolites isolés des feuilles sont des antitumoraux notamment la vinblastine et la vincristine (Figure 11) (Bruneton 2016).

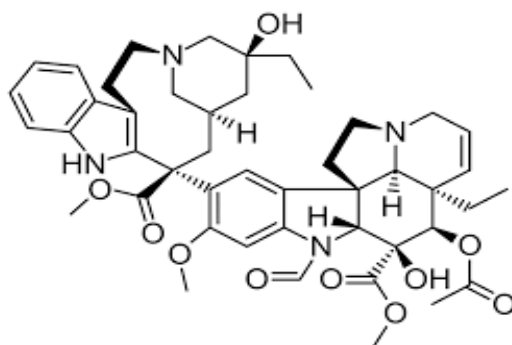


Figure 11: Structure chimique de la vincristine

Les *pseudo-alcaloïdes* présentent quasiment les mêmes caractéristiques que les alcaloïdes vrais néanmoins ils ne sont pas issus d'acides aminés. Dans la majorité des cas, il s'agit d'alcaloïdes terpéniques, dont les précurseurs sont des terpènes, issus de la voie de biosynthèse du mévalonate. L'amination du métabolite se fait tardivement au cours de la synthèse. Les plantes qui renferment les alcaloïdes terpéniques sont peu nombreuses (Melanthiaceae, Solanaceae, Ranunculaceae) et les propriétés pharmacologiques de ces métabolites sont très limitées. Néanmoins, une plante attire l'attention dans cette famille à savoir l'*Aconitum napellus* car le principal alcaloïde (aconitine ; Figure 12) retrouvé dans la racine est très toxique (Bruneton 2016).

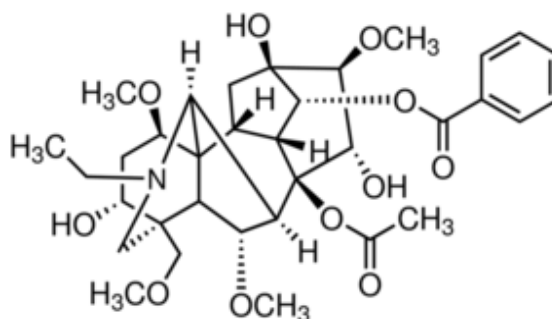


Figure 12: Structure chimique de l'aconitine

Enfin, les *proto-alcaloïdes* sont généralement des amines simples, dont l'atome d'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Les phénéthylamines illustrent bien cette famille qui est présente chez de nombreux végétaux. Ces métabolites possèdent des activités pharmacologiques bien marquées qui sont voisines des catécholamines (adrénaline, noradrénaline), leurs analogues structuraux. La famille Ephedraceae renferme en majorité l'éphédrine (Figure 13) dans ses parties aériennes, qui constitue près de 40 à 90 % des teneurs en alcaloïdes totaux (Bruneton 2016).

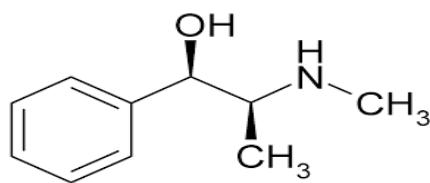


Figure 13: Structure chimique de l'éphédrine

La présence des extractibles au sein du duramen influence fortement les propriétés de durabilité naturelle, olfactives, physico-mécaniques ou encore acoustiques du bois (Stevanovic and Perrin 2009). Les extractibles, synthétisés au cours de la duraminisation, contribuent à la bonne résistance biologique du bois à l'égard des organismes xylophages sans avoir recours à des traitements de préservation ou des méthodes de protections. Plusieurs auteurs ont montré qu'un bois initialement durable devient plus sensible à l'égard de champignons lignivores ou de termites après extractions avec des solvants organiques et/ou aqueux (Kirker *et al.* 2013 ; Oliveira *et al.* 2010). De même, certains travaux ont révélé qu'il était possible d'apporter une durabilité conférée en imprégnant le bois d'espèces peu durables avec des extraits issus du bois d'espèces durables. Les extractibles constituent dans ce cas, des substances actives qui peuvent entrer dans la formulation de produits de préservation du bois (Brocco *et al.* 2017 ; Rodrigues *et al.* 2012). L'accumulation des extractibles dans le duramen serait aussi à l'origine d'un bois coloré chez de nombreuses espèces tropicales et tempérées. Chez *Pterocarpus santalinus*, la couleur rouge du bois est attribuée à la présence de santalines A et B, des flavonoïdes. Par ailleurs, un duramen différencié représente près de 90 % de la valeur commerciale de la grume, ce qui montre l'importance des extractibles dans la valorisation de ce biomatériau. Toutes les essences ne forment pas de duramen coloré (qui ne se différencie pas de l'aubier) : dans ce cas, le duramen est considéré comme étant un « faux duramen ». Nous pouvons citer l'exemple du Peuplier (*Populus. sp*) dont le duramen est non coloré et non durable (Déjardin *et al.* 2010).

Les extractibles ont aussi un impact sur la propriété de retrait (déformabilité du bois au séchage) au niveau du duramen. Chez la Bagasse (*Bagassa guianensis*), les fortes teneurs ainsi que la nature des extractibles sont corrélées à un faible retrait durant le séchage (Bossu *et al.* 2016). Au cours du séchage, l'eau libre présente dans le lumen s'évapore, sans provoquer de modifications des dimensions de la paroi cellulaire. Ce retrait serait limité dans le cas de la Bagasse par les extractibles de nature lipophiles qui 'piègeraient' l'eau, en formant une barrière hydrophobe (Bossu *et al.* 2016).

De même, les propriétés acoustiques d'un bois peuvent être influencée par les extractibles. La qualité acoustique d'un instrument de musique en bois repose, en partie sur la propriété d'amortissement (décroissance temporelle des vibrations), qui reflète la durée et la puissance d'un son (Ballu 2004). Par exemple, un trop faible amortissement des ondes sonores n'est pas souhaité pour un violon, à l'origine d'un son trop 'criard'. Chez les espèces tropicales qui possèdent de fortes teneurs en extractibles, le coefficient d'amortissement est beaucoup plus faible que chez les résineux ou chez les bois contenant peu d'extractibles. Néanmoins, la nature des extractibles influence aussi l'amortissement pour le bois chez certaines espèces, dont un faible amortissement est associé à de faibles teneurs en extractibles (Brémaud 2006).

## Partie 2 : La durabilité naturelle

L'utilisation d'une essence en tant que bois d'œuvre implique selon les usages, une évaluation de la propriété de durabilité naturelle de son bois à l'égard des agents xylophages tels que les **champignons lignivores**, les **insectes** et les **térébrants marins**. De façon générale, l'évaluation de la durabilité naturelle repose sur des essais conduits en champs ou en laboratoire qui consistent à exposer le matériau bois aux agents de dégradation durant une période d'exposition donnée selon des spécifications normatives (EN 350 2016). Alors que les essais en champ permettent de restituer les conditions d'emplois auxquelles peuvent être soumis le bois dans son environnement, les essais en laboratoire présentent l'avantage d'être plus reproductibles, bien définis et de plus courtes durées (Brischke *et al.* 2017). Il est ainsi possible de classer le bois en fonction de sa résistance biologique en fonction de l'agent xylophage impliqué (EN 350 2016). Cette norme précise également que la propriété de durabilité naturelle ne concerne que le duramen des arbres. Riche en matériel de réserve, l'aubier est généralement considéré comme non durable vis-à-vis des agents de biodégradation bien qu'il existe certaines espèces (*Bocoo prouacensis* ; Amusant *et al.* 2014) présentant un aubier aussi résistant que le duramen. De même, s'assurer de la bonne utilisation d'un bois nécessite la prise en compte des risques biologiques en lien avec des conditions d'exposition du bois, décrits par les classes d'emploi (EN 335 2013).

En effet, le bois, malgré ses bonnes propriétés technologiques, reste un biomatériau constitué de matières organiques (cellulose, hémicelluloses, lignine, etc). Il constitue avant tout une source trophique pour les agents de dégradation surtout en région tropicale humide où le risque biologique est beaucoup plus élevé qu'en région tempérée. Les conditions de température et d'humidité sont favorables au développement des agents biotiques à l'origine de préjudices économiques importants. Les champignons lignivores et insectes xylophages dégradent le bois d'œuvre et portent ainsi atteintes à ses propriétés esthétiques, physico-mécaniques de manière irréversible. Les térébrants marins provoquent, quant à eux, des dégradations en milieu tropical marin plus importantes qu'en milieu tempéré.

Les *champignons lignivores* détériorent la matière lignocellulosique du bois et les transforment en substances nutritives facilement assimilables en présence d'eau essentiellement. Les champignons ont des besoins en eau considérables afin de diffuser les enzymes extracellulaires et les produits de dégradation. En effet, l'attaque par le champignon est possible pour des taux d'humidité du bois supérieurs à 20% (valeurs optimum, 35-40%), mais la valeur limite va surtout dépendre de l'espèce (Anagnost and Smith 1997). Les champignons ont également besoin d'oxygène et d'une température adéquate (entre 18°C et 35°C). Ils sont des acteurs

majeurs dans la décomposition de la matière organique et jouent ainsi un rôle dans le cycle du carbone (Fouquet 2009). Les conditions de dégradation varient en fonction du champignon lignivore considéré et de l'essence. Les champignons de pourritures blanches ou fibreuses (phylum des basidiomycètes et ascomycètes) sont les seuls microorganismes capables de décomposer la totalité des macromolécules du bois car ils sécrètent des enzymes lignolytiques, principalement des laccases et peroxydases mais aussi des enzymes cellulolytiques (Janusz *et al.* 2013). Le bois dégradé a un aspect décoloré, de couleur blanchâtre et un aspect fibreux dû à la présence résiduelle de la cellulose (Fouquet 2009). La plupart des espèces de champignons de pourriture blanche dégradent simultanément la lignine et la cellulose par simple diffusion des enzymes à travers la couche S3 de la paroi cellulaire. Les champignons *Trametes versicolor* ou *Fomes fomentarius* en sont des exemples. D'autres champignons, qualifiés de pourriture blanche préférentielle, dégradent d'abord la lignine puis la cellulose et les hémicelluloses : les hyphes peuvent se développer dans le lumen des cellules et décomposer la lignine des cellules adjacentes ou pénétrer la paroi cellulaire et initier la délignification de la lamelle moyenne. Ils s'attaquent principalement aux feuillus mais interviennent plus rarement chez les résineux, peut-être à cause de la robustesse de la couche S3 des trachéides des résineux. *Pycnoporus sanguineus*, *Ceriporiopus subvermispora* sont des champignons représentatifs de ce type de dégradation (Fouquet 2009; Schwarze 2007).

Par opposition, les champignons de pourritures cubiques ou brunes (phylum des Basidiomycota) s'attaquent préférentiellement à la cellulose et aux hémicelluloses par l'action d'hydrolases. La lignine est partiellement dépolymérisée par un système non enzymatique, qui fait intervenir la réaction de Fenton à l'origine d'un stress oxydatif. Par la dégradation partielle de la lignine, les hydrolases peuvent diffuser à travers la couche S3 de la paroi cellulaire et initier la dégradation de la couche S2, riche en cellulose (Janusz *et al.* 2013). Mais la dégradation de la lignine peut aussi se faire par le biais d'enzymes telles que les laccases, produites par le champignon *Coniophora puteana* (Lee *et al.* 2004). Le bois dégradé présente d'abord de larges fissures qui forment de petits cubes plus ou moins réguliers avant d'être réduit à l'état de poudre. La lignine restante confère au bois une couleur brune et une structure friable. Ces champignons sont majoritairement associés aux résineux, bien que des dégradations peuvent aussi survenir chez les feuillus (Fouquet 2009; Schwarze 2007).

Enfin, les champignons de pourriture molle (phylum des Ascomycota et des Deuteromycota) se développent sur des bois exposés à une humidité plus élevée que les pourritures cubiques et pourritures blanches (Blanchette *et al.* 2004). Comme le champignon de pourriture cubique, il dégrade préférentiellement la cellulose et l'hémicellulose et décompose lentement la lignine, de manière incomplète (Janusz *et al.* 2013). En fonction de son mode de dégradation, la

pourriture molle est classée comme une pourriture de Type 1 et de Type 2. Les pourritures de Type 1 telles que les *Armillaria sp.* provoquent des cavités cylindriques dans les microfibrilles de cellulose, au niveau de la couche S2 de la paroi secondaire des cellules. Pour cela, les hyphes du champignon pénètrent la couche S2 après avoir traversé la couche S3, à partir du lumen des cellules. Par la suite, ils poussent dans la même orientation que les microfibrilles. Avec les pourritures de Type 2 notamment les ascomycètes Xylariaceae, suite à l'hydrolyse de la cellulose, des entailles assez discrètes se forment au niveau de la paroi secondaire, en laissant la lamelle moyenne intacte. Dans ce cas, les hyphes du champignon poussent dans le lumen des cellules. Le terme 'pourriture' fait référence à la texture spongieuse de la surface du bois. Les feuillus sont généralement plus attaqués que les résineux (Schwarze 2007).

Le bois mis en œuvre peut aussi être dégradé par des *insectes*, principalement les insectes à larves xylophages et les termites. Les termites provoquent des dégâts bien plus importants dans les bois d'œuvres en région tropicales. Ils sont d'ailleurs plus nombreux dans ces régions (Fouquet 2009). Les termites sont des insectes sociaux qui vivent en colonie, avec une population pouvant comporter quelques centaines à plusieurs millions d'individus. Ils craignent la lumière et se développent très bien dans un climat chaud (température moyenne entre 25 et 30°C) et humide (de 65% à 100 % d'humidité relative). Les termites se nourrissent essentiellement de cellulose, mais aussi d'hémicelluloses et d'amidon, généralement issu du bois pouvant être potentiellement dégradé par les champignons (Fouquet 2009). La digestion de la cellulose par le termite peut se faire à l'aide d'organismes inférieurs qui vivent en symbiose dans ses intestins, tel que les protozoaires flagellés et des bactéries ou alors sans association symbiotique. La lignine, peu digérée par les termites, est retrouvée dans les excréments qui servent à la construction des nids. Les principales espèces de termites nuisibles pour le bois d'œuvre appartiennent à 4 familles :

- La famille des Mastotermitidae renferme les termites les plus primitifs, caractérisés par des colonies contenant une centaine d'individus. Les bois morts ou pourris constituent à la fois leur habitat mais aussi leur alimentation.
- La famille des Kalotermitidae, autrement connus sous le nom de termites de bois sec nécessite de faibles teneurs en eau pour leur survie. Par exemple, les *Cryptotermes* s'installent dans les bois mis en œuvre et ils génèrent d'importants dégâts dans les constructions.
- Les Rhinotermitidae renferment la majorité d'espèces de termites souterrains. Les nids peuvent être construits directement dans le sol humide (cas des *Reticulitermes*), ou dans les constructions (sous le plancher ou encore sous les toits) à l'abri de la lumière.
- Les Termitidae sont des termites supérieurs qui construisent de véritables termitières à

partir de cellulose et de débris végétaux. Les nids sont localisés dans les branches des arbres ou dans les parties aériennes de certaines constructions telles que les charpentes. Ils construisent parfois des nids secondaires, avec des galeries visibles.

Ensuite, les insectes à larves xylophages sont aussi responsables de dégradation dans le bois. Ils provoquent d'ailleurs les plus gros dégâts sur les bois tropicaux (Fouquet 2009). Ces insectes se retrouvent majoritairement dans le groupe des coléoptères (famille des Cerambycidae, genre des *Lyctus* ou des espèces de *Bostryches* pour les plus courants) et présentent des schémas de vie similaire. À titre d'exemple, les femelles du genre *Lyctus*, pondent leurs œufs dans les pores du bois de certaines essences tropicales. Pendant tout le cycle larvaire qui dure de 6 à 7 mois, les larves creusent des galeries dans le sens du fil du bois pour se nourrir d'amidon (Fouquet 2009).

En plus des insectes xylophages et des termites, les *térébrants marin*, en particulier les tarets (famille des Terenidae) peuvent également être à l'origine de dégâts rapides et considérables pour les bateaux et les installations portuaires en bois. Ce sont de petits mollusques allongés pouvant mesurer près de 50 cm de long. Les tarets, se nourrissant de cellulose du bois, creusent des galeries dans le bois de plusieurs mètres de long et de 1cm de diamètre, à l'aide de leurs deux petites valves qui forment la coquille. La digestion de la cellulose est possible par une symbiose avec des bactéries. Ils vivent dans les eaux salées ou saumâtres mais peuvent aussi survivre hors de l'eau quelques jours. Les mers des régions tropicales sont très favorables au développement de ces mollusques expliquant les dégâts plus importants dans ces régions qu'en milieu marin tempéré. Les attaques peuvent se faire autant en zone immergée qu'en zone dite de marnage (à hauteur de marée) (Fouquet 2009).

Les bois de nombreuses espèces tropicales présentent une bonne durabilité naturelle à l'égard d'un ou de plusieurs de ces agents de dégradations présentés ci-dessus. Le bois est un biomatériau complexe et hétérogène de par sa formation, sa structuration et sa composition chimique. Cette complexité est fortement liée à la biodiversité des essences (surtout dans les régions tropicales) et s'accompagne d'une chimiodiversité du fait d'une diversité de stratégies de défenses au sein de l'arbre. Par conséquent, l'origine de la durabilité naturelle chez ces espèces durables est susceptible d'être multifactorielle et de reposer sur des facteurs de nature chimique, qui reposent majoritairement sur les extractibles, mais aussi sur la lignine et les composés minéraux. D'autres facteurs physico-mécaniques, notamment la densité ont aussi été mis en avant.



La présence des extractibles dans le bois est considéré comme le facteur majeur de durabilité naturelle. En effet, l'arbre met en place dans son duramen plusieurs stratégies de défense passives liées à la composition chimique des extractibles, à savoir les aspects quantitatifs (teneur en extractibles) et/ou qualitatifs (type d'extractible associé à une activité biologique). Des fortes teneurs en extractibles sont souvent observées chez des espèces durables contre les organismes xylophages, comme chez le *Vouacapoua americana*. Cette essence tropicale, très durable à l'égard des champignons lignivores, produit une quantité importante en extractibles, avec un taux d'extractibles de 21,3% (CIRAD-CTFT 1993). Ce taux est supérieur à celui de *Carapa densifolia*, espèce peu durable et présentant des teneurs en extractibles inférieures à 5%. Mais il n'est pas anodin d'observer chez certaines essences durables comme le *Bocoa prouacensis* de très faibles teneur en extractibles témoignant de l'importance de l'activité biologique de ces derniers (Amusant *et al.* 2014).

En effet, les extractibles, possédant une activité biologique, protègent le bois selon plusieurs modes d'actions et lui confèrent ainsi une défense passive. L'activité biologique de ces derniers est fortement dépendante des familles chimiques impliquées. La nature des activités biologiques des extractibles diffèrent en fonction de la structure chimique du/des composé(s) et de leurs interactions avec d'autres composés à l'origine d'une action antagoniste ou synergiste (Schultz and Nicholas 2002; Taylor *et al.* 2002 ; Valette *et al.* 2017). Tout d'abord, les composés peuvent avoir une spécificité d'action et agir directement sur l'organisme xylophage. Chez les champignons lignivores, les extractibles sont capables d'inhiber leur croissance ou induire sa mort par le biais de plusieurs mécanismes. L'effet chaotropique, détecté en présence de composés phénoliques tels que la vaniline, est la première cause d'inhibition de croissance et du métabolisme chez le champignon. Il est à l'origine d'une destruction de la structure spatiale des protéines, des acides nucléiques (Cray *et al.* 2015). L'activité antifongique des extractibles peut aussi consister à altérer la paroi cellulaire du champignon, composée de polysaccharides et de protéines. La  $\beta$ -thujaplicine, tréponoïde retrouvé dans le bois de l'espèce *Calocedrus macrolepis* modifie la perméabilité de la paroi cellulaire, conduisant à sa rupture, avec une fuite du contenu cytoplasmique (Yen *et al.* 2008). La mort du champignon peut être aussi induite par une dérégulation de l'homéostasie des ions, rendant la cellule moins viable. Le carvacrol, monoterpène majoritaire du *Cupressus nootkatensis* est connu pour perturber l'homéostasie des ions calciums et des ions hydrogènes, à l'origine d'un éclatement de la cellule (Valette *et al.* 2017). De façon indirecte, certains extractibles comme la  $\beta$ -thujaplicine, présente chez les Cupressacées (Yen *et al.* 2008) inhibent la capacité de dégradation du champignon lignivore car ils sont des chélateurs de métaux, ces derniers étant essentiels à l'activité des laccases et peroxydases. Les extractibles sont aussi

capables de piéger les radicaux libres (radical peroxyde, ion hypochlorite, etc) nécessaires au processus enzymatique ou oxydatif de dégradation du bois. Cette activité antiradicalaire a surtout été détectée chez les composés phénoliques (Valette *et al.* 2017).

De même, les extractibles peuvent exercer leurs activités spécifiquement sur les insectes xylophages tel qu'une activité insecticide. Les naphtoquinones, présentes dans le bois de *Diospyros virginiana* (7-methyljuglone ; (Nascimento *et al.* 2013)) sont termicides de même que l'azadirachtine isolée du bois d'*Azadirachta indica*, qui est un triterpénoïde aux propriétés antimitotiques à l'origine d'une inhibition de la synthèse de la chitine des termites (Billker *et al.* 2002 ; Salehzadeh *et al.* 2003). Constituant majeur du squelette externe des termites, l'absence de chitine les rends vulnérables et ils en meurent à terme. Il est aussi possible d'éradiquer les termites en ciblant les microorganismes symbiotiques (les archées, les protistes et les bactéries) retrouvés dans leurs flores intestinales qui sont nécessaires pour la digestion des polysaccharides du bois. Certains extractibles, ingérés par les termites exercent des effets négatifs sur ces microorganismes entraînant une perte parfois complète de l'association symbiotique. Soumis à une diète, ils peuvent en mourir. Hassan *et al.* (2017) ont observé chez *Reticulitermes flavipes* une corrélation entre le taux de mortalité et la diminution du nombre de protozoaires en présence d'un extrait de *Cedrus deodara*.

Les extractibles sont parfois à l'origine d'un effet répulsif ou anti appétant à l'encontre d'insectes xylophages. L'extrait (éthanol/toluène) issu du bois de Shesham (*Dalbergia sissoo*) est à la fois répulsif et anti appétant contre l'espèce de termites *R. flavipes*. Cet extrait se compose majoritairement par le resvératrol appartenant à la famille des stilbènes qui est un puissant antioxydant (Hassan *et al.* 2016).

Par ailleurs, certaines espèces ligneuses présentent des molécules ayant des propriétés à la fois antifongique et insecticide : c'est le cas de l'espèce *Sextonia rubra* dont l'extrait à l'acétate d'éthyle est composé majoritairement de la rubrénolide et de la rubrynlolide (Figure 14). Ces deux composés pourtant très similaires présentent des activités biologiques différentes : le rubrénolide possédant une double liaison est fongicide tandis que le rubrynlolide possédant une triple liaison est termicide (Rodrigues *et al.* 2011). Les quinones du bois du Teck, en particulier les naphtoquinones et les anthraquinones, sont respectivement responsables d'une activité antifongique (Niamké *et al.* 2012) et termicide (Ismayati *et al.* 2016).

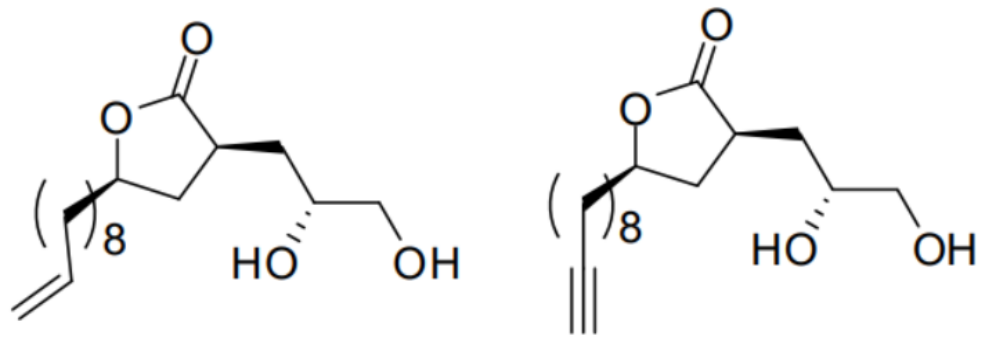


Figure 14: Structure chimiques du rubrenolide (à gauche) et du rubrynlide (à droite) isoés de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *Sextonia rubra*

La lignine est un second facteur majeur qui influence la durabilité naturelle. En effet, elle agit comme une barrière physique et chimique, en protégeant la cellulose et l'hémicellulose d'une trop rapide dégradation par les agents biotiques en plus d'apporter une rigidité à la paroi cellulaire. Par opposition aux polysaccharides structuraux, elle est peu digestible et appétente. De plus, avec son caractère hydrophobe, elle induit une imperméabilité de la cellule. (Van Geffen *et al.* 2010; Schwarze 2007). L'implication de la lignine dans la durabilité naturelle est clairement mise en évidence chez le Peuplier, dont le bois est connu pour être non durable. Le gène de biosynthèse du monolignol syringyle (S) a été surexprimé chez des populations de peupliers transgéniques avec comme résultante un bois plus durable à l'égard des champignons de pourritures cubiques et blanches qu'initialement (Skyba *et al.* 2013). La composition de la lignine (type et teneur) n'est pas la même chez les résineux et les feuillus, d'autant plus que les feuillus sont sujets à une plus grande chimiodiversité. Cette variabilité à l'échelle interspécifique induit des différences de sensibilités des bois à l'encontre des agents biotiques de dégradation. Les résineux possèdent généralement de fortes teneurs en lignine composée à 90% de monomères guaiacycle (G), leur bois est particulièrement résistant aux champignons lignivores. En effet, ce type de lignine est plus compact, difficilement oxydable et entrave ainsi le développement du champignon (Kahl *et al.* 2017). Le bois des feuillus, dont les teneurs en lignine sont généralement moins importantes par comparaison aux résineux, est composé des monomères S et G avec des proportions de monomères G qui varient entre 0 et 33 %. Le monomère S est quant à lui beaucoup plus sensible à la dégradation par les champignons lignivores (Kahl *et al.* 2017). La teneur en lignine chez certaines espèces ligneuses est corrélée à la résistance biologique : *Sideroxylon swageri* dont le bois est très durable fait partie des

espèces qui possèdent l'un des plus forts taux en lignine (31,4 %) parmi les espèces ligneuses. Cette relation se confirme à l'échelle interspécifique (Mounguengui *et al.* 2016) ou intraspécifique chez des espèces telles que *Eucalyptus globulus* (Poke *et al.* 2006). Néanmoins, la composition de la lignine seule ne permet pas toujours d'expliquer la durabilité naturelle notamment chez certains bois tropicaux durables. Le bois de l'espèce *Hopea plagata*, connu pour être très durable présente de faibles teneurs en lignines S/G, ceci confirmant notamment le rôle des extractibles (Rana *et al.* 2009).

La présence de certains minéraux dans le bois constitue aussi un facteur de durabilité naturelle. La silice confère au bois une résistance biologique accrue face aux térébrants marins notamment les tarets. C'est le cas de *Dicorynia guianensis* (Kukachka 1964) qui est très utilisé en Guyane pour la fabrication de pirogues. Des fortes teneurs en silice sont aussi présentes dans le bois de Teck, résistant à l'égard des térébrants marins (Tripathi *et al.* 2016). D'autres études mettent en avant l'influence de l'azote, nutriment essentiel pour le développement des champignons lignivores (Weedon *et al.* 2009). Dans le bois, les sources en azote proviennent des protéines qui sont liées à la lignine (Dyckmans *et al.* 2002). Chez les feuillus par exemple, d'importantes concentrations en azote associées à un faible rapport C/N ont tendance à favoriser la dégradation par les agents biotiques. Ce rapport reflète l'aptitude d'un bois à être dégradé : une valeur de ce rapport comprise entre 300 et 1000 indique une faible influence de l'azote sur la dégradation du bois par le champignon (van Geffen *et al.* 2010).

L'anatomie du bois constitue également un facteur de résistance biologique à l'égard de certains agents de dégradations : à l'échelle du tissu cellulaire, plusieurs paramètres anatomiques ont été identifiés comme étant potentiellement importants. Tout d'abord, la proportion et la taille des pores auront à la fois une influence sur la perméabilité du bois et sur le taux de dégradation (van Geffen *et al.* 2010). Des pores de grandes tailles sont propices à un taux de dégradation plus important car ils favorisent la propagation du champignon dans le bois. De même, le développement de larves xylophages, est également facilité par des pores larges, les femelles du *Lyctus* pondent facilement leurs œufs lorsque la taille des pores est supérieure à 120 µm (Fouquet 2009). *A contrario*, les pores obstrués par les thylles formées au cours de la duraminisation entraînent un ralentissement de la propagation des agents biotiques (Taylor *et al.* 2002). De même, les cellules de parenchymes présentent une importante résistance à certains agents de dégradations. Dans son étude, Schwarze *et al.* (2003) ont observé que toutes les cellules de parenchymes, en position tangentielle par rapport aux fibres du bois, étaient plus

résistantes aux champignons de pourriture cubique. Il a également montré que chez le Robinier, de fortes proportions en cellules de parenchyme (35-40%) étaient corrélées à de faibles pertes de masse (5 -10%) après exposition à deux souches de champignons de pourriture cubique, *Fomitopsis pinicola* et *Laetiporus sulphureus*. Au contraire, le bois de l'essence *Betula pendula* possède les plus faibles proportions en cellules de parenchyme (5 à 10 %) associées à des pertes de masse beaucoup plus importantes (27% pour *F. pinicola* et 21 % pour *L. sulphureus*). Cette résistance semble être liée à la morphologie de la paroi cellulaire, qui pourrait limiter la diffusion des enzymes produites par les champignons (Schwarze 2007; Schwarze *et al.* 2003). La résistance peut également être liée à une faible quantité de matériel de réserve dans les cellules, associée à de faibles teneurs en azote (Cornwell *et al.* 2009; Dix and Webster 1995; Zabel and Morrell 1992).

Néanmoins, les travaux de certains auteurs, notamment ceux de Van Geffen *et al.* (2010), qui ont travaillé à partir d'un échantillonnage de 15 espèces boliviennes, ne permettent pas de corréler la durabilité naturelle avec la taille des pores des vaisseaux ainsi que la proportion en cellules de parenchyme.

Enfin, la densité du bois est également considérée comme un facteur de durabilité naturelle. Elle se définit comme étant le rapport de la masse sur le volume du bois et peut être mesurée à un état d'humidité du bois donné (généralement à 12%). Cette propriété est étroitement liée à l'anatomie du bois car elle intègre tous les éléments cellulaires constitutifs du bois notamment le vide, déterminant majeur dans la masse du bois. Chez les feuillus, par comparaison aux résineux elle reste très variable. En effet, le tissu cellulaire du bois des feuillus est beaucoup plus complexe que chez les résineux, avec des différences au niveau des types cellulaires, de la proportion en cellule, de l'épaisseur ou de la taille des pores (Leal *et al.* 2011). La densité rend compte de nombreuses fonctions : de support mécanique, de transport et de stockage des tissus du bois mais aussi de la croissance ou de la survie d'un arbre (Van Geffen *et al.* 2010). Chave *et al.* 2009 ont constaté qu'un bois de forte densité résisterait mieux à la dégradation par un agent biotique qu'un bois de faible densité, ce qui montre le rôle de la densité dans la durabilité naturelle. Cette observation se vérifie aisément à l'échelle interspécifique avec Hérault *et al.* (2010) sur un échantillonnage de 26 espèces néotropicales ou encore Chambers *et al.* (2000) sur un plus large échantillonnage (155 espèces) qui ont montré que les taux de dégradation du bois était inversement corrélé à la densité. Chez ces espèces à forte densité, la petite taille des pores et le temps nécessaire pour atteindre les conditions favorables à la dégradation en terme d'humidité influence la cinétique de dégradation (Amusant *et al.* 2014). De même, les insectes

s'attaquent préférentiellement à des bois de plus faibles densités comme le *Ceiba pentandra* ou le *Cryptomeria japonica*, (Cornwell *et al.* 2009; EN 350 2016). Cette relation entre durabilité naturelle et densité peut aussi s'observer à l'échelle intraspécifique : une corrélation a été observée entre la densité et la durabilité naturelle chez *Eucalyptus delegatensis* ( $r^2$  compris entre 0,57 et 076) après exposition à des champignons de pourritures blanches (*Coriolus versicolor*, *Formes lividus* et *Trametes lilacino-gilva*) (Wong *et al.* 1983). Le même constat a été fait chez le Chêne (*Quercus sp.*) : les individus plus denses sont aussi les moins sensibles aux champignons lignivores. De faibles pertes de masse ont été obtenues (1,6 %) après exposition au champignon *Hypoxylon fragiforme* pour l'individu le plus dense alors que ces pertes de masse s'élèvent à 41,9 % pour l'individu le moins dense (Humar *et al.* 2008). Néanmoins toutes les études ne s'accordent pas toutes sur cette conclusion (Brischke *et al.* 2006; van Geffen *et al.* 2010; Kahl *et al.* 2017). Cette contestation repose surtout sur le constat que les résineux, dont la densité est plus faible par comparaison aux feuillus, se dégradent moins vite que ces derniers. Ce constat serait lié à un biais dans la mesure de la durabilité naturelle, car la dégradation est rapportée à la masse sèche du bois et non pas au volume de bois qui intègre à la fois la matière ligneuse et l'air.

La durabilité naturelle, qui se veut complexe, est sujette à une variabilité car elle repose sur plusieurs facteurs. Cette variabilité s'illustre bien à l'échelle interspécifique notamment chez les espèces tropicales. La durabilité naturelle de 404 espèces ligneuses de Guyane a été évaluée à l'égard de la microflore active du sol pour une durée d'exposition de 6 mois (Beauchêne 2012). Les résultats (Figure 15) révèlent que près de 1/3 des espèces (soit 29 %) sont considérées comme durables à très durables, contre 37 % moyennement durable et 34 % sont peu durables à non durables. L'espèce *Pouteria guianensis* est la plus durable, avec des pertes de masse de 0,1 % alors que *Strychnos melinoniana* est celle qui enregistre la plus forte perte de masse d'une valeur de 57 %. Cette variabilité se comprend aisément à l'échelle interspécifique, les espèces se caractérisant par une signature chimique, une densité et un plan ligneux qui leurs sont propres.

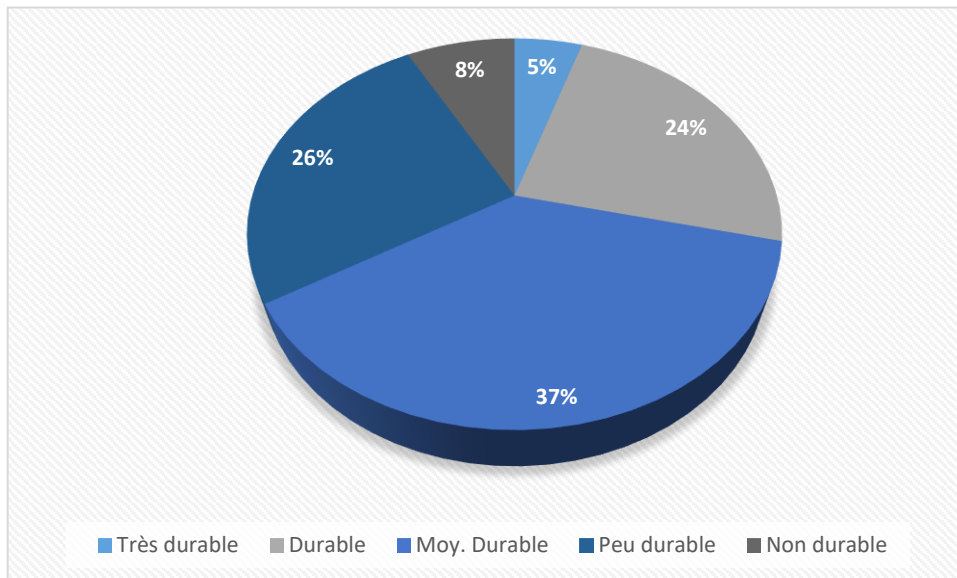


Figure 15: Diagramme des différentes classes de durabilité naturelle mesurées pour 404 espèces tropicales après exposition à la microflore active du sol

Une variabilité est aussi observée à l'échelle intraspécifique, en inter individus. Plusieurs espèces ligneuses dont les bois sont durables à peu durables peuvent être citées en exemple : *Quercus sp.* ou *Larix sp.* (Brischke *et al.* 2017 ; Curnel *et al.* 2008). La variabilité serait due à des paramètres intrinsèques à l'arbre, tels que son patrimoine génétique. Quelques études ont montré l'héritabilité de la résistance aux champignons lignivores notamment chez l'Eucalyptus (valeurs d'héritabilité de 0,52 et 0,58 ; Bush *et al.* 2011) et chez le Mélèze (valeur d'héritabilité de 0,39 ;(Venäläinen *et al.* 2001). L'âge de l'arbre est une autre source de variation : la durabilité naturelle des jeunes arbres est généralement plus faible que celle des arbres matures. Après exposition du duramen du Teck aux champignons lignivores, les pertes de masse les plus importantes ont été mesurées chez les arbres de 5 ans (20,8 %), contre 13,0 % pour les arbres âgés de 21 ans et 9,0 % pour ceux de 55 ans (Bhat and Florence 2003). D'autres paramètres impliqués sont davantage liés aux conditions de croissance de l'arbre tels que l'environnement (sol, climat) ou les traitements sylvicoles (arbre de plantation ou arbre de forêt naturelle). La durabilité naturelle du Teck varie aussi selon les paramètres édaphiques du sol ou de la pluviométrie (Kokutse *et al.* 2010). De même, les bois des Teck de plantation sont connus pour être moins durables que ceux issus de forêts naturelles (Moya *et al.* 2014). Cette différence repose sur des teneurs en extractibles plus faibles dans le bois des arbres de plantation (Moya *et al.* 2014).

Il existe une variabilité intra arbre, avec une durabilité naturelle qui augmente entre l'aubier et le duramen. Cette variabilité est également observée entre le duramen externe et le duramen interne, avec une durabilité qui diminue de façon générale du duramen externe, le plus

récemment formé, vers le duramen interne. La variation observée serait liée à l'âge du bois. Après exposition du bois du Mélèze au champignon *Coniophora puteana*, les pertes de masse obtenues dans le duramen interne (23,6 %) sont significativement plus importantes que celles du duramen externe (17,6 %) classant ces deux tissus comme moyennement durable et peu durables respectivement (Curnel *et al.* 2008). La plus faible résistance du duramen interne s'explique par teneurs en extractibles plus faibles et par le fait du « vieillissement du bois ». Par opposition aux molécules natives dans le duramen externe, les extractibles du duramen interne seraient sujets à des réactions secondaires (oxydations, déglycosylation polymérisation...) (Klumpers *et al.* 1994 ; Mosedale *et al.* 1996). Ces réactions pourraient induire une perte de l'activité biologique des extractibles (Schultz and Nicholas 2000). La présence de sucres résiduels dans le duramen interne de certains bois, source trophique pour les agents xylophages, serait également une source de variabilité de la durabilité naturelle. Le duramen interne du Teck qui en contient est de ce fait moins durable que le duramen externe (Niamké 2010).

Mais l'existence d'une variabilité de la durabilité naturelle du bois peut s'avérer problématique dans le domaine de la construction, avec pour conséquence une inadéquation entre la durabilité réelle du matériau et la classe d'emploi dans laquelle il est mis en œuvre. De plus, à plus large échelle, il n'est pas envisageable de conduire des essais biologiques classiques, destructifs, chronophages et coûteux, sur toutes les grumes si un tri est effectué avant usage. Aussi, la proposition de nouvelles méthodes de prédiction de la durabilité naturelle qui se veulent rapides et fiables, s'impose. La prédiction de la durabilité naturelle nécessite de confronter les pertes de masse obtenues au cours des essais biologiques avec les résultats de mesures de certains facteurs de durabilité naturelle, généralement les extractibles, la lignine ou encore la densité du bois. Parmi les méthodes prédictives existantes, la spectroscopie proche infrarouge (SPIR) est la plus sollicitée pour prédire la durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores du bois : elle a été appliquée notamment pour le Teck (Niamké *et al.* 2014) ou le Mélèze (*Larix sp.*) (Gierlinger *et al.* 2003 ; Sykacek *et al.* 2006). Elle permet l'obtention de spectres infrarouges qui donnent accès à la signature physico-chimique du bois et de manière indirecte, qui rendent compte des propriétés du bois : durabilité naturelle (Oikkonen *et al.* 2008), de densité du bois (Nuopponen *et al.* 2006) et retrait (Kokutse *et al.* 2010).

Il existe d'autres méthodes prédictives qui se basent sur la quantification des extractibles (HPLC –DAD ; (Harju and Venäläinen 2011)) ou de biomarqueurs spécifiques de durabilité naturelle, comme le 2-(Hydroxyméthyl)anthraquinone qui est présent dans le bois du Teck. Ces biomarqueurs de durabilité naturelle ont été dosés en HPLC-DAD puis les teneurs ont été corrélés aux pertes de masse mesurées après exposition à des champignons lignivores (Niamké *et al.* 2014). Enfin, la colorimétrie, qui consiste à caractériser la couleur du bois à l'aide d'un



colorimètre a montré des résultats encourageants en tant qu'outil de prédiction de la durabilité naturelle. La couleur du bois est souvent due à la présence d'extractibles, notamment des polyphénols. Une corrélation a été réalisée entre l'angle de teinte et les pertes de masse après exposition aux champignons lignivores chez les espèces *Eperua grandiflora* (Amusant *et al.* 2008) et *Dicorynia guianensis* (Amusant *et al.* 2004).

### Partie 3 : Présentation de *Dicorynia guianensis*, le modèle d'étude

L'importance économique et écologique de l'Angélique, son abondance en Guyane et l'existence d'une variabilité de sa durabilité naturelle font de cette essence un candidat d'étude pertinent pour (1) une étude plus approfondie de l'origine de la variabilité de la durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores et (2) la proposition de méthodes de prédictions de cette propriété. En effet, l'Angélique fait partie des essences les plus utilisées en Guyane en tant que bois d'œuvre, avec 180 000 m<sup>3</sup> entre les années 2010 et 2014, contre 38 000 m<sup>3</sup> pour le Gonfolo rose (*Qualea spp.*) et 20 000 m<sup>3</sup> pour le Grignon franc (*Sextonia rubra*). Elle représente 57 % du volume de bois récolté en forêt. Son principal débouché sur le marché local est à destination de la construction : charpente, menuiserie du bâtiment et profilés (bardage, parquet...), parquet, pirogue et ouvrages portuaires. Elle est aussi exportée sous forme de sciage, environ 5000 m<sup>3</sup>, vers les Antilles. Le volume d'exploitation forestière de l'Angélique en Guyane a constamment progressé ces dernières années, sur la période de 1995-2000, le pourcentage annuel de l'exploitation de cette espèce par rapport au volume de récolte total, était de 35% tandis que sur 2011-2014, il a atteint 55%. L'ouverture du massif Régina-Saint Georges dans les années 2000 a aussi permis cette nette progression (ONF 2015).

La forêt guyanaise, bien que relevant de la propriété de l'Etat français, elle n'en reste pas moins écologiquement amazonienne. De ce point de vue, l'Angélique est classée à la 341<sup>ème</sup> place en tant qu'espèce la plus abondante en Amazonie (Steege *et al.* 2013). Elle est qualifiée d'hyperdominante en termes de productivité et de la biomasse de la matière ligneuse en Amazonie. En effet, elle se positionne à la 9<sup>ème</sup> place en tant qu'espèce qui participe le plus au stockage de la biomasse des forêts et à la 16<sup>ème</sup> place par rapport à la productivité ligneuse (Fauset *et al.* 2015).

Une description générale de l'arbre de l'Angélique a été réalisée dans cette partie. L'Angélique (*Dicorynia guianensis* Amsh., Fabaceae, Caesalpinioideae) est une espèce forestière endémique du plateau des Guyanes (Guyane et Surinam ; Koeppen 1967) qui appartient à la famille des Légumineuses. C'est un très grand arbre, assez bien structuré, pouvant atteindre jusqu'à 50 m de hauteur et 120 cm de diamètre. Son écorce externe est peu épaisse, de couleur brun rouge clair à brun foncé et présente de nombreuses lenticelles. Elle possède un statut d'hémi-tolérante à la lumière, avec la capacité de se régénérer en trouée et sous couvert mais possède aussi une forte capacité de croissance en milieu ouvert. Cette caractéristique vis-à-vis de la lumière est à l'origine d'une plasticité de l'espèce, qui se traduit par une grande diversité de stratégie de croissance (Lehnebach 2015). L'arbre est ainsi capable de modifier les propriétés de son bois

pour adapter sa croissance aux conditions environnementales à tout moment. L'Angélique se retrouve principalement sur les sols à drainage profond et évite les zones hydromorphes, avec une distribution marquée pour les plateaux, les montagnes et les collines peu élevées (Bonjour 1996 ; ONF 2015). Elle développe des endomycorhizes au niveau de ses racines pour permettre l'absorption du phosphore.

Le bois de l'Angélique possède des caractéristiques qui peuvent être appréhendées à l'échelle macroscopique, anatomique, physico-chimique et enfin chimique. D'un point de vue macroscopique, les différents tissus ligneux du bois de l'Angélique sont bien distincts (Figure 16), avec un aubier clair de largeur variable (entre 2 et 10 cm) traduisant une variabilité de la dynamique de formation du duramen (Lehnebach 2015), de couleur plus foncé. D'autres tissus sont aussi visibles dans le bois de certains Angélique, notamment une zone de transition mais aussi un aubier coloré qui constitue l'aubier le plus interne.



Figure 16: coupe transversale du bois de l'Angélique

L'anatomie du bois de l'Angélique se caractérise par des vaisseaux peu nombreux (1 à 2 par  $\text{mm}^2$ ), assez gros de taille (225 à 300 micron). Les cellules de parenchyme sont associées aux pores en manchons, anastomosées dans le plan tangentiel sous forme de lignes onduleuses plus ou moins continues. Plus précisément, les cellules de parenchyme des rayons ligneux sont étagées, constituées par 2 à 3 séries de cellules de 6 à 9  $\mu\text{m}$  (Figure 17) (Bonjour 1996; ONF 2015).

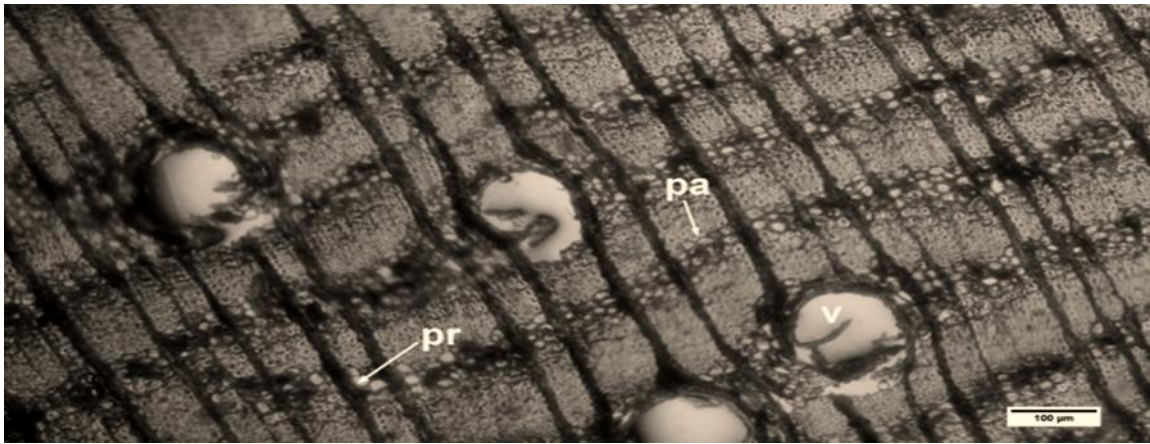


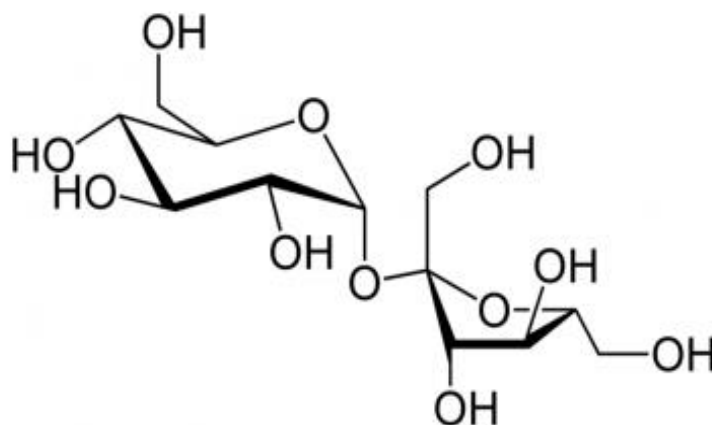
Figure 17: Anatomie du plan ligneux de l'Angélique (coupe transversale) avec pa : parenchyme axiale, pr: parenchyme rayon ligneux et v:vaisseau (Photos: Cyrielle Sophie)

D'un point de vue physico-chimiques, le bois de l'Angélique est considéré comme étant mi-lourd, avec une densité moyenne qui se situe entre 720 et 790 kg/m<sup>3</sup> à 12 % d'humidité (EN 350 2016). Le coefficient de retrait volumique de son bois est de 0,55%, le retrait tangentiel est de 8,2% et le retrait radial de 5,1%. Mis en service, son bois est moyennement stable (Bonjour 1996; ONF 2015).

Dans le bois de l'Angélique, seul le duramen est considéré comme durable, ce qui n'est pas le cas de l'aubier. Le duramen est classé comme étant durable (EN 350 2016) à l'égard des champignons lignivores bien que cette propriété soit variable. Cette variabilité a été mise en évidence par plusieurs auteurs (Amusant *et al.* 2004; Bonjour 1996; Déon 1980). Leurs travaux ont révélé une variabilité de la durabilité naturelle à l'échelle intra et inter individuelle à l'égard des champignons de pourriture cubique. En ce qui concerne les insectes, le bois est durable à l'égard des coléoptères. Il est aussi durable à l'égard des térébrants marins. Cependant, la durabilité à l'égard des termites est considérée comme moyennement durable. Le duramen de cette essence étant classé comme non imprégnable (ONF 2015), il n'est pas possible de lui apporter une durabilité conférée par l'imprégnation de produit de préservation.

Enfin, le bois de *D. guianensis* est recommandé pour un emploi hors contact du sol, à l'extérieur mais, si possible, dans un contexte d'humidification temporaire et non permanente (ONF 2015).

Des études du profil chimique du bois de l'Angélique ont été réalisées pour les métabolites primaires, dans un premier temps. L'étude de la distribution et du devenir de ces métabolites permettra une meilleure compréhension du déroulement du processus de duraminisation au sein du bois. En effet, les réserves énergétiques généralement présentes dans l'aubier (sucres non structuraux, lipides) sont mobilisées pour la synthèse de métabolites secondaires au cours de ce processus. Actuellement, il existe très peu de données sur les sucres non structuraux du bois de l'Angélique, principale source d'énergie de l'arbre. Les résultats recueillis par (Chan 2016) ont révélé la présence de saccharose (disaccharide comprenant deux hexoses, glucose et fructose, **Figure 18**) uniquement dans l'extrait d'aubier. Cet extrait a été préparé à partir d'un mélange ternaire de solvant composé de 50 % d'acétate d'éthyle et de 50 % d'une solution à base de méthanol/eau (80 :20). Après hydrolyse, en condition acide et aussi basique de l'extrait d'aubier, du glucose et du fructose ont été détectés, ce qui est en accord avec la présence de saccharose dans l'aubier. Le saccharose, présent dans l'aubier, est donc mobilisé au cours de la duraminisation en tant que source de carbone et d'énergie, ce qui explique son absence dans le duramen. Le saccharose a aussi été observé dans le bois d'autres espèces, telles que le Teck avec de fortes teneurs dans l'aubier de ce dernier qui diminuent ensuite drastiquement dans le duramen où il n'est présent que sous forme de traces (Niamké 2010). L'absence de sucres non structuraux dans le duramen contribue, d'une certaine façon, à la durabilité naturelle du bois de l'Angélique à l'égard des organismes xylophages.



**Figure 18: Structure chimique du saccharose présent dans l'aubier de l'Angélique (source : <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Saccharose>)**

Aussi, le profil chimique des métabolites secondaires du bois de l'Angélique a été établi par (Anouhé 2017) par le biais d'un criblage phytochimique du duramen. Les résultats de ce criblage (**Tableau 2**) révèlent la présence de 3 familles chimiques de métabolites secondaires dans le duramen de l'Angélique : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes et

terpénoïdes. Les composés phénoliques semblent relativement plus nombreux que les deux autres familles présentes.

**Tableau 2: Les différentes familles chimiques de métabolites détectées dans le bois de l'Angélique**

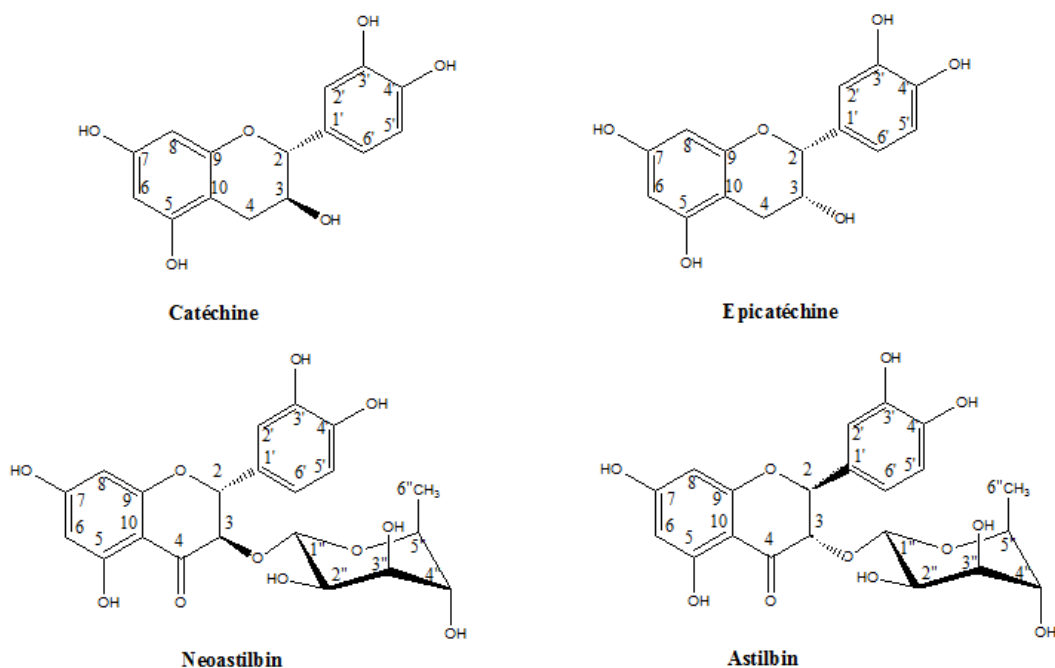
Familles chimiques	Quantité relative en métabolites*
Polyphénols	+++
Flavonoïdes	+++
Tanins	+++
Stéroïls et terpènes	++
Saponines	-
Alcaloïdes	++

\*La quantité relative en métabolites est déterminée en fonction de l'intensité de la coloration qui se veut proportionnelle à la quantité relative en métabolites : +++ coloration très intense ; ++ coloration moyennement intense ; - pas de coloration.

Anouhé (2017) a également recherché des activités biologiques des extractibles présents dans le duramen de l'Angélique. À cet effet, des extraits bruts ont été préparés à partir de 3 solvants dont l'éthanol, le méthanol et l'eau à 100°C. Les résultats indiquent qu'une activité antiradicalaire *in vitro* a été détectée pour tous les extraits. Par la suite, les extraits méthanoliques, qui présentent les plus fortes teneurs en extractibles, ont été divisés en 6 fractions. Après mesure de l'activité antiradicalaire de ces 6 fractions, une activité a été détectée uniquement pour la fraction 2 (composée de flavonoïdes) et la fraction 3 (constituée d'alcaloïdes). Le potentiel antiradicalaire de ces 2 fractions est d'ailleurs plus élevé que celui de l'extrait méthanolique brut. De plus, une mesure de l'activité antifongique a été réalisée pour ces 6 fractions à partir de deux souches de pourritures blanches, *Pycnoporus sanguineus* et *Trametes versicolor*. Seule la fraction 3, constituée d'alcaloïdes, présente une activité antifongique à l'encontre de ces deux souches.

Afin d'identifier les composés responsables de cette activité, les fractions 2 et 3 ont été fractionnées : 8 structures, dont 4 flavonoïdes (Figure 19) et 4 alcaloïdes à noyau indole ont pu être isolées du duramen de l'Angélique (Anouhé 2017). La présence de la catéchine et de l'épicatéchine (flavanols) a été détectée dans le bois de nombreuses espèces appartenant aux Légumineuses, notamment l'*Acacia sp.*, et *Eperua falcata* (Royer *et al.* 2010). Ces deux composés sont surtout connus pour leurs activités antiradicalaires, car capables de piéger certaines espèces réactives telles que les radicaux hydroxyles. La catéchine et l'épicatéchine possèdent un faible pouvoir chélateur pour les métaux, cofacteurs de nombreuses réactions

enzymatiques (Kashima 1999). De même, l'astilbine et la néostilbine (flavanonols sous forme d'hétérosides) ont également été isolés du duramen de l'espèce *Eperua falcata* (Royer *et al.* 2010). Ils sont aussi antioxydants, antimicrobiens et seraient responsables du goût sucré de certains vins (Cretin 2016). Mais aucun de ces flavonoïdes ne possède une activité antifongique à l'égard des champignons lignivores (Rodrigues *et al.* 2010; Royer *et al.* 2010).



**Figure 19: Structures chimiques des flavonoïdes isolés du bois de l'Angélique**

Les alcaloïdes à noyaux indoles isolés du duramen de l'Angélique sont présentés en **Figure 20**. Une attention particulière est portée sur ces alcaloïdes dans le cadre de nombreux travaux de recherches mené car ils présentent de larges spectres d'activités biologiques, notamment leurs activités antifongiques et antiradicalaires (Marinho *et al.* 2016). La tryptamine serait leur précurseur biosynthétique. Dès 1980, Déon a indiqué que la tryptamine était présente dans le duramen de l'Angélique dans des teneurs de 0,05 % et qu'elle constituait l'alcaloïde majoritaire dans le duramen. Il a aussi détecté une activité antifongique à de fortes concentrations. Après analyse par imagerie TOF-SIMS de la distribution de la tryptamine, il semblerait qu'elle soit présente dans le lumen des cellules de parenchyme situées dans la zone de transition, où elle serait produite. La tryptamine est ensuite diffusée et détectée dans toutes les parois des cellules du duramen. Elle n'est présente qu'à l'état de trace dans l'aubier (Vanbellingen *et al.* 2016). D'autres alcaloïdes minoritaires ont pu aussi être détectés par Anouhé *et al.* (2015) pour la première fois dans le duramen de l'Angélique.

Ces alcaloïdes peuvent être regroupés en fonction de leurs noyaux, en indole simple (N-acetyl

tryptamine), en  $\beta$ -carboline (N-oxyde harmalan, cordisinine C) et en spiroindol (dicorynamine) (Figure 20). Parmi ces 4 alcaloïdes, la dicorynamine ainsi que le N-oxyde harmalan ont été isolés pour la première fois en tant que produits naturels. La dicorynamine est un analogue structural du Cipargamin (NITD609, KAE609) antipaludique synthétique de Novartis en phase d'essai clinique (Leong *et al.* 2014). Les composés qui possèdent un groupement nitronne, tel que le N-oxyde harmalan, présentent généralement une grande capacité de piégeage des espèces réactives oxygénées (Oleynik *et al.* 2007) et seraient aussi responsable d'une activité neuroprotectrice (Sun *et al.* 2012). Le N-acetyl tryptamine a été isolée du champignon du sol *Exophiala pisciphila* (Wang *et al.* 2011) mais aussi de la plante médicinale *Prosopis nigra* (Moro *et al.* 1975). Ce composé possède des propriétés antioxydantes (Estevão *et al.* 2010) et antifongiques notamment à l'égard de champignons filamenteux (Ben *et al.* 2009). De même, la cordisinine a été aussi été retrouvée chez le champignon *Cordyceps sinensis*, ce dernier étant très utilisé en médecine chinoise pour ses nombreuses propriétés pharmacologiques (Yang *et al.* 2011). Cet alcaloïde serait potentiellement antiparasitaire. En effet, il fait partie de la famille des spiroindole, connue pour inhiber le développement du *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*, tous deux responsables du paludisme (White *et al.* 2014).

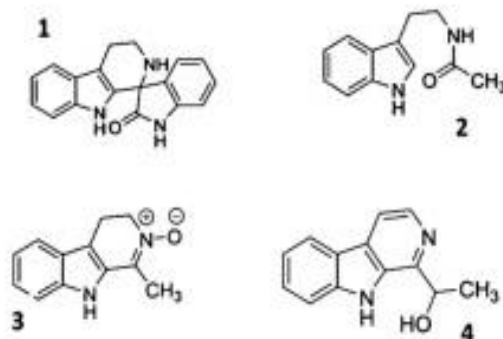


Figure 20: Structure chimique des alcaloïdes isolés à noyau indoles isolés chez l'Angélique (1: Dicorynamine; 2: N-acetyl tryptamine; 3: N-oxyde harmalan; 4: Cordisinine C (Anouhe *et al.* 2015))

#### Partie 4 : Les techniques analytiques pour l'étude métabolomique

L'origine de la durabilité naturelle reposerait en majeure partie sur les extractibles du bois pour de nombreuses espèces tropicales et tempérées d'où l'importance de les étudier dans le cas de notre modèle biologique. Le bois d'un arbre comprend de nombreux métabolites, notamment des extractibles stockés surtout dans le duramen et peut être sujet à une étude de son



métabolome (ensemble des métabolites d'un système biologique à un instant 't'). Par l'étude métabolomique à partir du bois de plusieurs arbres, il sera possible de comprendre le rôle des extractibles spécifiquement dans la durabilité naturelle. Cette étude, assez moderne, connaît une forte expansion depuis 1999 avec notamment les premiers travaux de Nicholson *et al.* (1999). Elle permet de mesurer une réponse métabolique par l'identification, la caractérisation et la quantification des métabolites d'un échantillon donné. Elle se décline en deux approches, en fonction de l'objet de l'étude :

- L'*approche ciblée* employée pour quantifier de manière précise à l'aide de standard certains métabolites ou certaines familles de métabolites dans le bois. Par exemple, dans le cas de nos travaux, les alcaloïdes totaux ainsi que les composés phénoliques totaux ont été quantifiés.
- L'*approche non ciblée* pour étudier l'ensemble des métabolites présents dans le bois qui peuvent aussi être listés et quantifiés de manière relative. Par cette approche, il est possible de comparer les empreintes métaboliques de deux individus par exemple.

Les applications de la métabolomique sont très larges et variées : en chimie des produits naturels pour la découverte de nouveaux composés bioactifs (Wu *et al.* 2011), dans le domaine de l'agroalimentaire pour contrôler la sécurité, la qualité et la traçabilité alimentaire (Castro-Puyana *et al.* 2017), en biologie végétale, pour évaluer la réponse à un stress environnemental ou comparer des phénotypes (Gomez-Casati *et al.* 2013). La métabolomique est surtout appliquée dans le domaine de la santé humaine où elle permet la prévention et le diagnostic de maladies par l'identification de biomarqueurs spécifiques (Gomez-Casati *et al.* 2013). Elle peut être aussi utilisée pour classer les échantillons à l'échelle interspécifique (Liu *et al.* 2016) ou taxonomique (Martucci *et al.* 2014). Néanmoins, dans les sciences du bois, l'étude métabolomique est moins répandue. Quelques exemples peuvent être relevés, notamment avec les espèces ligneuses *Populus trichocarpa* (Guerra *et al.* 2016) et *Symphonia globufera* (Cottet *et al.* 2014) pour lesquelles une étude métabolomique a été réalisée selon une approche non ciblée.

L'étude métabolomique comprend plusieurs grandes étapes, avec la préparation des extraits de bois, l'acquisition des données à l'aide de techniques analytiques adéquates et l'analyse de ces données par le biais d'outils statistiques. L'instrumentation classique repose sur des techniques spectroscopiques (Résonance Magnétique Nucléaire, Spectromètre de Masse et Infrarouge) et chromatographiques (High Performance Liquid Chromatography) parfois couplées au spectromètre de masse (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer). En effet, l'instrumentation sélectionnée doit permettre de couvrir l'analyse de l'ensemble de la diversité

de métabolites présents chez l'Angélique. Avec le couplage de techniques analytiques, il est possible d'apporter une dimension supplémentaire à l'analyse et d'améliorer les chances d'identification des métabolites. Les avantages et les inconvénients des techniques chromatographiques et spectroscopiques sont renseignés dans le **Tableau 3**. Toutes ces techniques peuvent être utilisées, si possible en couplage en fonction de l'objectif de l'étude.

**Tableau 3: Avantage et inconvénients des différentes techniques analytiques utilisées en métabolomique (Shulaev 2006; Simmler *et al.* 2014)**

Méthode analytique	Avantages	Inconvénients
Résonance Magnétique Nucléaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Préparation minimale des échantillons</li> <li>• Analyse non destructive</li> <li>• Identification et quantification simultanée</li> <li>• Détection quasi-universelle</li> <li>• Méthode très reproductible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible sensibilité</li> <li>• Chevauchements des signaux rendant l'interprétation difficile</li> <li>• Coût élevé de l'appareillage</li> </ul>
Spectrométrie de masse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse rapide et non destructive</li> <li>• Haute résolution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bases de données limitantes</li> </ul>
Spectroscopie infrarouge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse rapide</li> <li>• Peu ou pas de préparation de l'échantillon</li> <li>• Empreinte complète de la composition chimique de l'échantillon</li> <li>• Faible coût de l'appareillage</li> <li>• Reproductibilité de l'analyse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identification d'un métabolite quasi-impossible</li> <li>• Nécessité de séchage pour certains échantillons</li> <li>• Redondance des signaux</li> </ul>
Chromatographies liquides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisations de très petits volumes d'échantillons</li> <li>• Meilleure séparations de métabolites</li> <li>• Quantification à l'aide d'un standard interne/ externe et courbe de calibration</li> <li>• Sensibilité importante (par exemple, de l'ordre du nM-pM pour le SM et du <math>\mu</math>M pour le DAD)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Préparation de l'échantillon nécessaire (pesées, dilutions et filtration)</li> <li>• Détection basée sur les propriétés physicochimiques des métabolites</li> <li>• Reproductibilité dans des conditions parfaitement définies</li> </ul>

Pour mener à bien l'étude métabolomique, plusieurs techniques analytiques ont été utilisées au cours de cette thèse. La technique de *spectroscopie résonance magnétique nucléaire* (RMN) trouve de nombreuses applications dans le domaine pharmaceutique, où elle permet, par exemple de contrôler le degré de pureté d'une spécialité (Simmler *et al.* 2014). Dans le domaine des sciences du bois, la RMN est utilisée généralement à l'état solide en chimie des biopolymères pour étudier leur structure ou leur biosynthèse (Foston 2014; Santoni *et al.* 2015)

ou pour les quantifier (Capanema *et al.* 2005). En chimie des extractibles, la RMN à l'état liquide a été utilisée pour la quantification des stilbènes chez l'espèce ligneuse *Pinus nigra* (Ioannidis *et al.* 2016). D'autres exemples ont été relevés en anatomie du bois, notamment pour l'étude de la distribution de l'eau dans la microstructure du bois (Almeida *et al.* 2007) ou alors son état (libre, liée ou sous forme de vapeur) en dessous du point de saturation des fibres (Passarini *et al.* 2014). Cette technique repose sur la propriété de certains noyaux atomiques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{17}\text{O}$ , etc.) qui possèdent un spin nucléaire non nul c'est-à-dire un champ magnétique nucléaire induit par le mouvement d'une particule chargée (électron ou proton). Lorsque ces noyaux sont soumis à un champ magnétique, ils absorbent l'énergie du champ à l'origine du changement d'état énergétique. L'énergie absorbée par les noyaux sera ensuite relâchée par un processus de relaxation, sous la forme d'un mouvement de précession ou de rotation à l'origine d'une fréquence. Un détecteur collecte ensuite l'ensemble des données afin de permettre leur conversion par transformée de Fourier sous forme de spectres (Breitmaier 1993). Plusieurs expérimentations en 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , etc.) et en 2D (CORRELATION SPECTROSCOPY, Heteronuclear Single Quantum Correlation, Heteronuclear Multiple Bond Correlation) sont possibles, en sollicitant les différents noyaux atomiques (Breitmaier 1993). La RMN quantitative du proton  $^1\text{H}$  a aussi été très utilisée dans le cas de cette thèse, pour la quantification de la tryptamine présente dans les extraits alcaloïdiques, à l'aide d'un étalon. Sur un spectre du proton  $^1\text{H}$ , les atomes sont représentés par des pics dont les déplacements chimiques (en unité de fréquence) renvoient à un environnement chimique précis de l'atome. Chaque pic est caractérisé par la valeur de son déplacement chimique, la multiplicité du signal (nombre d'atomes ayant des environnements différents) et l'intensité du signal (nombre d'atomes équivalents). Pour l'analyse quantitative, le choix de l'étalon est crucial car les signaux de ce dernier ne doivent pas interférer avec ceux du composé à quantifier (Pauli *et al.* 2005).

La *spectrométrie de masse* est une technique de détection et d'identification des métabolites d'intérêts sous forme d'ions par la mesure de leur masse moléculaire ou celle de leurs fragments. Datant des années 1980, elle est encore aujourd'hui très utilisée en biologie structurale et moléculaire, notamment pour l'étude des protéines, des lipides, etc. Dans les sciences du bois, les applications sont beaucoup moins fréquentes. Farrell *et al.* (2015) par exemple, ont appliqué cette méthodologie au bois du Chêne pour étudier les métabolites responsables de l'arôme du vin. Cette technique se base sur la séparation des ions en fonction de leur rapport de masse sur leur nombre de charges, communément appelé rapport  $m/z$ . Un spectromètre de masse se compose de 3 principaux éléments constitutifs, avec la **source d'ionisation** des métabolites, l'**analyseur de masse** qui permet la séparation des ions précédemment formés et le **détecteur** (Figure 21 ; (Cotton 2015).

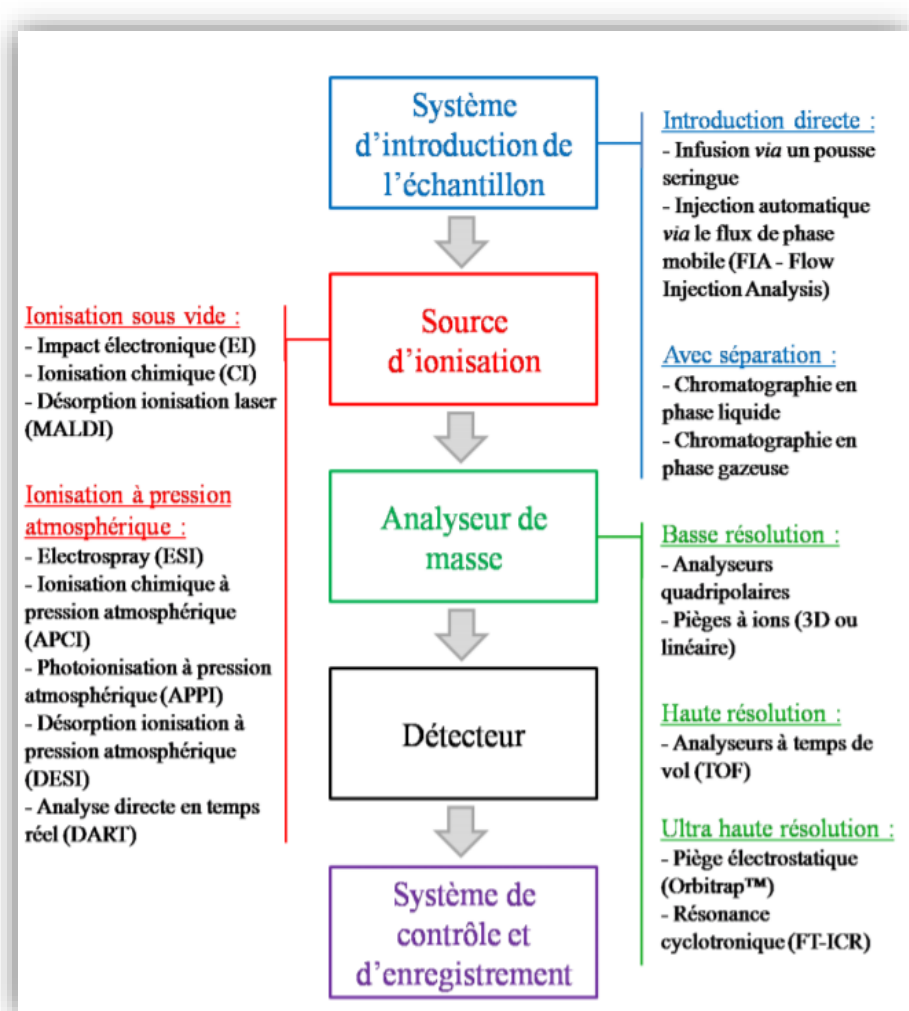


Figure 21: Différentes composantes d'un spectromètre de masse

Le détecteur enregistre le signal qui correspond aux flux d'ions moléculaires ou aux fragments, signal proportionnel à la quantité en ions formés. Le signal perçu par le détecteur est converti en mode centroïde ce qui permet de remplacer les pics par un trait qui est le centre de gravité

du pic de l'ion et de calculer ensuite le rapport  $m/z$  de l'ion. Sur chaque chromatogramme figure l'intensité du courant ionique total (Total Ion Current, TIC) en fonction du temps de rétention de l'ion. Pour un même temps de rétention, la présence d'un ou de plusieurs ions peut être détectée et ces ions peuvent présenter différents rapports  $m/z$ . L'ion est donc caractérisé par son temps de rétention, l'intensité de son signal et la valeur du rapport  $m/z$ .

Ce spectromètre permet aussi la fragmentation des ions grâce à ces deux cellules de collision. L'ion précurseur sélectionné avec le premier analyseur est fragmenté et les fragments obtenus sont analysés pour permettre l'obtention d'un spectre MS/MS ( $MS^2$ ). Sur ce spectre figure toutes les informations structurales de l'ion précurseur, par comparaison au spectre MS qui ne renseigne que sur la masse de l'ion moléculaire. Les spectres  $MS^2$  acquis sont utilisés pour la construction de réseaux moléculaires, outil très adapté pour la détection d'analogues structuraux dans un mélange complexe. Le principe de la construction d'un réseau repose sur la similarité chimique de métabolites qui partagent des patrons de fragmentations caractéristiques et donc, qui auront une forte similarité spectrale. Ces composés seront considérés comme étant issus de la fragmentation de constituants chimiques apparentés et ainsi, ils seront regroupés par familles chimiques pour former un 'réseau moléculaire' (Yang *et al.* 2013). En pratique, les spectres  $MS^2$  sont comparés deux à deux après un alignement spectral, et un indice de corrélation (cosine score, CS) est attribué en fonction du degré de similarité spectrale. Les réseaux moléculaires constituent une alternative à la stratégie de déréplication actuelle, qui consiste à identifier des métabolites connus mais permet surtout d'identifier des métabolites inconnus qui peuvent être reliés aux familles chimiques déjà identifiées. Les bases de données spectrales regroupant les spectres  $MS^2$  sont nécessaires pour permettre une identification rapide des métabolites dans des mélanges complexes.

La *spectroscopie infrarouge* (IR) est une autre technique spectroscopique, qui peut aussi être utilisée dans le cas d'une étude métabolomique bien que son emploi est plus restreint dans ce domaine. D'ailleurs la spectroscopie infrarouge a été employée par Conrad and Bonello (2016) pour comparer les profils de bois résistants aux maladies. L'utilisation de la spectroscopie infrarouge remonte aux années 1940, avec la commercialisation des premiers spectromètres. Encore aujourd'hui, elle est très utilisée dans les secteurs de l'agroalimentaire, pharmaceutiques, la papeterie ou encore dans les sciences du bois car elle se veut rapide, non destructive et de faible coût. Dans les sciences du bois, elle permet la prédiction des propriétés du bois : composition chimique (Niamké *et al.* 2014), densité (Nuopponen *et al.* 2006), durabilité naturelle (Gierlinger *et al.* 2003). Elle permet aussi d'assurer la classification d'échantillons (Tsuchikawa and Kobori 2015). L'Angélique étant une espèce dont la résistance biologique aux champignons lignivore est variable, la spectroscopie infrarouge a été employée

uniquement comme technique de prédiction dans cette thèse.

Le principe de la spectroscopie infrarouge repose sur la vibration des liaisons des groupements fonctionnels d'une molécule. L'absorption des radiations infrarouges par la molécule provoque un changement de niveau vibrationnel des électrons, qui passent d'un état fondamental à un état excité, créant ainsi un signal qui peut être mesuré. Les vibrations diffèrent en fonction de la région du spectre électromagnétique, à savoir le proche infrarouge (PIR) ( $13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ), le moyen infrarouge (MIR) ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ) et le lointain infrarouge ( $< 400 \text{ cm}^{-1}$ ) (Stuart 2004). Le moyen et proche infrarouge, les régions spectrales les plus utilisées, permettent d'établir le profil chimique d'un extrait ou d'un métabolite isolé. Avec le moyen infrarouge, les mesures des vibrations des liaisons fondamentales (vibrations d'élongations et vibrations de déformations) informent sur les groupements chimiques qui composent l'extrait ou le métabolite. Les bandes spectrales, qui correspondent aux vibrations des groupements C-H, N-H et O-H principalement, permettent l'élucidation structurale d'un métabolite (Stuart 2004). Le proche infrarouge sollicite les vibrations harmoniques qui concernent aussi les liaisons chimiques des groupements C-H, N-H et O-H. Les bandes spectrales en proche infrarouge sont souvent larges, chevauchantes et de faibles intensités et ces spectres sont très utilisés pour des analyses quantitatives, contrairement aux spectres obtenus avec le moyen infrarouge (Schwanninger *et al.* 2011).

De nombreuses *techniques chromatographiques liquides non couplées (HPLC et UPLC) et couplées (LC-MS)* ont été utilisées au cours de cette thèse. En effet, la chromatographie liquide à polarité de phase inversée est, aujourd'hui, un outil analytique incontournable dans l'analyse de métabolites isolés ou en mélanges complexes dans un échantillon. Elle est utilisée pour l'identification, la quantification mais aussi la purification de métabolites essentiellement (Korfmacher 2005; Xiao *et al.* 2012). La chromatographie liquide, surtout couplée au spectromètre de masse, peut être applicable à de très nombreux domaines : agroalimentaire, biochimie, pharmaceutique, environnement, chimie des produits naturels, etc (Niessen 1999).

Le principe de la chromatographie liquide à polarité inversée repose sur la partition des métabolites entre la phase stationnaire apolaire de la colonne chromatographique, composée le plus souvent de chaînes alcanes (C18) sur un gel de silice et une phase mobile (eau, méthanol ou acétonitrile). La séparation des métabolites au sein de la colonne est encouragée par la circulation sous haute pression de la phase mobile avec parfois le recours à un four à colonne, pour optimiser au mieux leur séparation (Lindsay 1992). Des systèmes de chromatographiques liquide de dernière génération ont été développés afin de permettre des analyses plus rapides et plus performantes. Parmi ces systèmes, l'UPLC (Ultra Performant Liquid Chromatography) est

celui qui permet des analyses à très hautes pression (jusqu'à 1000 bars) avec l'utilisation de colonne plus courtes et de faible granulométries (inférieure à 2 µm) (Swartz 2005). La chromatographie liquide classiquement utilisée est associée à un détecteur à barrette de diodes (DAD) qui est un détecteur spectrophotométrique basé sur la propriété d'absorbance des métabolites analysés dans le domaine de l'UV/Visible. Il est alors possible de détecter l'absorbance en simultanée des longueurs d'onde composants les faisceaux lumineux par les composés d'intérêts et d'acquérir leur spectre d'absorption (Lindsay 1992). Basé sur le principe d'absorption des métabolites dans le domaine de l'UV/Visible, la quantification d'un ou plusieurs métabolites est réalisable avec l'utilisation de la loi de Beer-Lambert (Équation 1) :

$$Absorbance = \varepsilon * l * C$$

Équation 1: Loi de Beer-Lambert avec  $\varepsilon$  : coefficient d'extinction molaire en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  ;  $l$  : longueur du trajet optique parcouru en cm ;  $C$  : concentration de la solution en  $mol.l^{-1}$ .

La proportionnalité entre la concentration du soluté et l'intensité de l'absorbance est vérifiée, permettant ainsi de déterminer la quantité d'un composé connu à l'aide d'un étalon interne ou externe (courbe d'étalonnage). Certains métabolites n'absorbent pas dans l'UV ce qui ne permet pas leur détection et leur quantification par le détecteur DAD. Le détecteur d'aérosols chargés (CAD<sup>TM</sup>) propose une détection universelle des composés, indépendamment de leur structure chimique. Cette technologie est compatible avec le système de chromatographie liquide. Le principe de détection repose sur l'ionisation positive des métabolites par nébulisation en présence d'azote (Górecki *et al.* 2006).

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a également été utilisé dans le cas de cette thèse. Le système utilisé est constitué par une UPLC (Ultra Performant Liquid Chromatography) couplée à spectromètre de masse haute résolution SYNAPT G2 HGMS. Le couplage a été étudié à partir des années 1974 mais sa commercialisation a pu être réalisée à partir de 1990. Ce type de couplage est très demandé aujourd'hui (Arpino 2009). Les métabolites sont d'abord séparés en UPLC avant d'être introduit dans le spectromètre. Le SYNAPT G2 HGMS est un spectromètre caractérisé par une source d'ionisation douce, l'électronébulisation ou electrospray ionisation (ESI) qui assure l'ionisation des métabolites à pression atmosphérique sans fragmentation de l'ion moléculaire. Elle consiste à disperser l'échantillon liquide sous forme de gouttelettes qui sont chargées électriquement. Le détecteur de ce spectromètre est un quadripôle associé à un second analyseur TOF (Time of Flight). Cette association en tandem de spectromètres (Q-TOF) procure une haute résolution et précision de l'analyse des ions formés, supérieure à une configuration de type triple quadripôle.

## Chapitre 1: Stratégie de l'échantillonnage

Le chapitre 1 a pour objectif de mettre en évidence la pertinence de la stratégie de l'échantillonnage. Cette stratégie se base sur la sélection d'individus en fonction de critères architecturaux contrastés afin de disposer d'un échantillonnage représentatif de la variabilité de la durabilité naturelle à l'échelle inter individu. En effet, les critères architecturaux traduisent des dynamiques de croissances propres à chaque individu de l'échantillonnage et par la description architecturale, il est possible de retracer son histoire mais aussi de comprendre sa stratégie de croissance (Roggy *et al.* 2005). Les stratégies de croissance sont décisives pour les individus, car elles doivent assurer la survie, le développement et le maintien de l'individu au sein d'une population. En forêt tropicale, les espèces sont généralement classées en deux groupes écologiques extrêmes, les héliophiles à croissance rapide avec une durée de vie relativement courte et les sciaphiles, espèces d'ombres au développement lent et une durée de vie supérieure aux héliophiles. Ces diversités de stratégies de croissances laissent supposer une diversité de mécanismes de défenses pour leur survie, qu'ils soient chimiques ou anatomiques. Par conséquent, il peut être supposé que la sélection d'individus avec des dynamiques de croissances contrastées peut permettre d'appréhender de manière indirecte une variabilité des mécanismes de défenses et donc, la durabilité naturelle.

Ce chapitre décrit la sélection, l'échantillonnage et la préparation des échantillons qui seront utilisés pour les expérimentations. Les essais de durabilité naturelle, mis en œuvre dans ce chapitre, ont servi à évaluer la variabilité entre individus par la mesure des pertes de masse.

### Matériel et méthodes

#### I. Origine et sélection des individus

Les billons de bois ont été prélevés chez 16 individus de *Dicorynia guianensis* Amsh. entre 2011 et 2016 dans la station expérimentale Paracou (5°18'N, 52°23' W; Sinnamary, Guyane). L'échantillonnage a été construit à partir de l'hypothèse qui stipule que des individus ayant des dynamiques de croissances contrastées sont susceptibles de présenter une variabilité de la durabilité naturelle à l'échelle inter individu. Ainsi, la sélection des individus repose sur plusieurs critères architecturaux contrastés qui renvoient à l'évaluation de la couronne des individus (Figure 22). La position de la couronne (Crown Position, CP) (Dawkins 1958) renseigne sur le statut social de l'individu et le taux d'ensoleillement qu'il perçoit. La transparence de la couronne (Crown Aperture, CA) indique le pourcentage de réduction de la couronne : moins il n'y a d'espace occupé par les feuilles et plus la taille de la couronne est



réduite. Associé à la transparence de la couronne, le critère de Mortalité Charpentière (MC), permettra de distinguer les individus sénescents des individus sujets à une forte dynamique de croissance ou de ceux ayant subi un fort stress au cours de leur développement. En effet, un arbre sénéscent se caractérise par une réduction de la couronne et d'un nombre important de charpentières mortes.

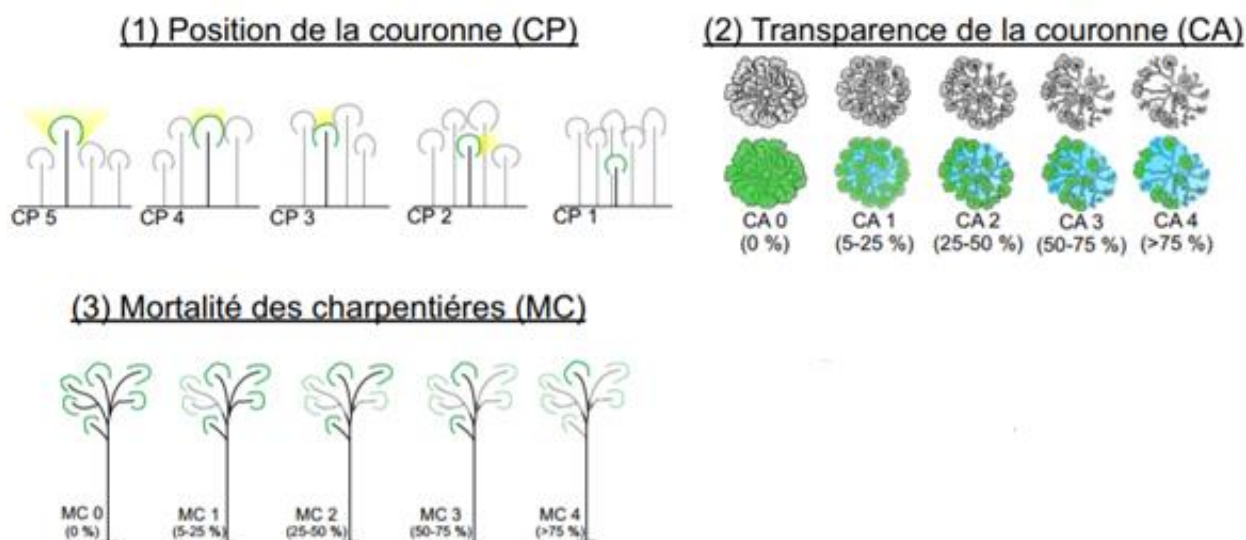


Figure 22: Critères architecturaux utilisés pour la description des individus de *D. guianensis* (Lehnebach *et al.* 2013)

À partir de la description architecturale, sur la base de l'évaluation de la couronne, les 16 individus ont été classés en 3 catégories (Tableau 4) :

- Les arbres normaux (10) représentatifs de l'espèce ligneuse qui sont des arbres adultes ne portant pas de traumatismes particuliers et présentant une couronne intacte. L'accès à la lumière est variable pour ces individus.
- Les arbres de plantations (3), poussant en pleine lumière qui sont caractérisés par une couronne très bien développée et intacte.
- Les arbres sénescents (3) qui présentent un degré important de fragmentation de leur couronne.

Les individus normaux et sénescents sont issus des forêts naturelles, il n'est donc pas possible de déterminer l'âge de ces individus. Au contraire, les arbres de plantations ont été prélevés dans une plantation âgée de 30 ans.

## II. Caractéristiques des individus de l'échantillonnage

### 1. Données biométriques

Des critères structuraux tels que la hauteur (H), le diamètre à hauteur de poitrine (Diameter at Breast Height, DBH) à 1m30 et le rapport H/DBH, qui permet de renseigner sur l'élancement de l'individu ont également été mesurés pour les 16 individus de l'échantillonnage (**Tableau 4**).

De plus, la proportion de duramen a été mesurée à partir d'une rondelle de bois prélevée à hauteur de poitrine pour tous les individus de l'échantillonnage (**Tableau 4**). À partir d'une photographie de la coupe transversale des individus, la mesure de la proportion du duramen et de l'aubier a été réalisée sur le logiciel ImageJ.

Tableau 4: Description architecturale des individus de l'échantillonnage (CP: Position de la Couronne, CA: Transparence de la Couronne et MC : Mortalité Charpentière, DBH : Diameter at Breast Height, / : donnée non acquise ; les paramètres CP, CA et MC sont définis dans la Figure 22)

Individu	Type architectural	Observations	CP	CA	MC	Hauteur (m)	DBH (cm)	Ratio H/DBH	Aubier %	Duramen %
A0	Normal	Houppier plat et bien développé ; faible dynamique de croissance car dominé par un <i>Goupia glabra</i> Aubl.	CP2	0	0	27	30,9	68,0	81,7	13,9
A1	Normal	Houppier réduit en hauteur et en largeur	CP2-3	/	3	35,5	30,5	116,4	56,9	43,1
A2	Plantation	Très gros houppier, présence de fruits	CP4	/	0	26,3	34,7	75,8	97,5	2,4
A3	Sénescent	Houppier constitué de rejets après étêtage naturel	CP3-4	/	/	18	31,2	57,7	7,6	55,0
A4	Normal	Individu dominant, houppier bien développé	/	/	/	25,5	29,9	85,3	/	/
A5	Normal	Individu dominant, présence de fruits et d'un nid de termites sur une des charpentières	CP3	0	2	28,8	36	80,0	10,2	72,6

A6	Normal	Jeune individu	CP4	0	0	25,2	31,8	79,2	28,8	70,3
A7	Plantation	Nombreuses branches non élaguées	CP4	2	0	22,6	35,6	63,5	49,2	44,4
A8	Plantation	Nœuds visibles sur le tronc	CP4	2	0	24,3	32,1	75,7	67,9	30,0
A9	Sénescent	Important stress biotique, perte d'une partie du houppier	CP4	3	0	33	62,1	53,1	5,4	73,6
HP3	Sénescent	Grandes proportions de charpentières mortes	CP4	2	3	35,5	57,9	61,3	22,4	70,5
Cim 01	Normal	Individu dominant, houppier compacte et peu réitéré	CP4	1	0	32	43	74,4	50,6	44,8
Cim 02	Normal	Individu dominant et bien portant	CP4	1	0	33,5	50,3	66,6	48,9	42,5
Cim 09	Normal	Individu un peu enliané, en phase d'installation	CP4	1	0	25,5	26,1	97,7	54,7	34,8
Cim 11	Normal	Gros individu, faible mortalité dans la partie basse du houppier	CP4	3	2	38,5	62,1	62,0	47,7	45,9
Cim 13	Normal	Jeune individu très dynamique	CP4	2	3	34,2	34,1	100,3	64,8	26,6

## 2. Les différents types de tissus ligneux

Chaque individu de l'échantillonnage présente un aubier et un duramen bien différenciés : la couleur de l'aubier (crème) n'était pas toujours homogène le long du profil radial, surtout chez les individus présentant un gros diamètre pour lesquels un aubier coloré (rosé) a aussi été observé. Le même constat a été relevé pour le duramen (marron), avec parfois des duramens proches de la moelle plus clairs que le duramen en périphérie (Figure 23). C'est le cas des individus A1, A3, HP3, A9, Cim 01, Cim 11 et Cim 13, qui présentaient des diamètres compris entre 34,1cm et 62,1 cm. Pour l'autre moitié de l'échantillonnage, la couleur de l'aubier et du duramen étaient homogènes (diamètres de 29,9 cm à 50,3 cm) (Figure 23). Ces observations sont similaires avec l'échantillonnage de Lehnebach (2015). Enfin, une zone de transition (jaune claire) plus ou moins large est parfois observée. Cette zone est le siège de la duraminisation.

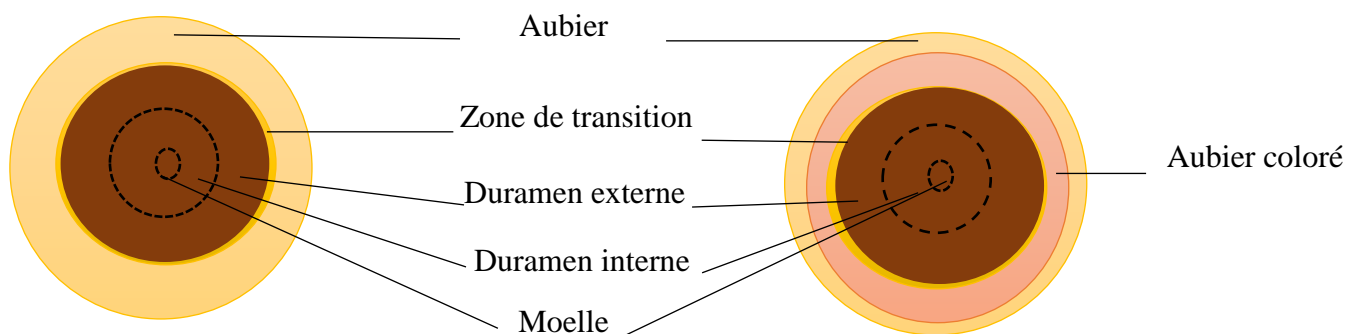


Figure 23: Schémas et photographies des sections transversales de 4 individus échantillonnés (de gauche à droite: individus A2, A7, A1 et A9)

## 3. Préparation et conditionnement des planches de bois

À partir du billon de bois qui mesure 50 cm de longueur, (Figure 24) au DBH, un plateau transversal a été découpé (Figure 24) et des plateaux (Figure 24) ont été prélevés entre l'aubier

et le duramen en veillant à distinguer : aubier externe, aubier coloré, aubier interne, zone de transition, duramen externe et duramen interne. Le duramen externe prélevé correspond au duramen nouvellement formé et le duramen interne correspond à la zone la plus proche de la moelle. Le nombre de prélèvement par arbre dépend de l'individu et du nombre de zones identifiées dans le bois à l'origine d'une hétérogénéité de l'échantillonnage. Chaque plateau a été de nouveau subdivisé en 2 planches jumelles (Figure 24) pour les essais de durabilité naturelle et de chimie. Les planches ont été conditionnées dans une salle climatisée (20° C et 65 % d'humidité relative HR) jusqu'à stabilisation (environ un mois).



Figure 24: Préparation des échantillons avec (a): découpage du billon en forêt, (b) : le plateau , (c) : la délimitation des planches jumelles par position radiale et (d) : la planche de bois destinée au séchage

### III. Echantillons destinés aux analyses chimiques

#### 1. Préparation de la poudre de bois

Après stabilisation, les planches destinées aux analyses chimiques ont été broyées (granulométrie de 200  $\mu\text{m}$ ) à l'aide de l'appareil Retsch ZM 200.

#### 2. Cas particulier de l'individu A4

L'individu A4, considéré comme normal, a servi uniquement au développement de méthodes d'extractions des métabolites ainsi qu'à l'isolement et à la caractérisation de composés alcaloïdiques. Pour cela, le duramen (externe et interne) a été broyé à une granulométrie de 500  $\mu\text{m}$  à l'aide de l'appareil Retsch ZM 200. Les données architecturales ne sont pas disponibles pour cet individu. De même, aucun essai de durabilité naturelle n'a été effectué.

#### 3. Mesure du taux d'humidité des échantillons sous forme de poudre

Afin de déterminer les teneurs en extractibles dans le bois, des mesures du taux d'humidité des échantillons ont été systématiquement effectuées sur les mêmes poudres destinées aux différents types d'extraction (extraction en alcaloïdes totaux, tryptamine et polyphénols totaux). Cette mesure permettra de calculer la masse théorique anhydre des poudres destinées aux essais. En effet, il n'est pas envisageable de mettre ces dernières directement à l'étuve au risque de provoquer des dégradations des métabolites d'intérêt. Pour calculer la teneur en eau des échantillons, une masse d'environ 500 mg a été pesée puis placée à l'étuve pendant 48 h (Mettler type UNB 400) à 103°C. Après passage à l'étuve, l'échantillon est pesé de nouveau afin d'obtenir la masse anhydre de la poudre de bois. Le bois étant un matériau hygroscopique, l'échantillon est systématiquement stocké dans un dessiccateur en sortie de l'étuve jusqu'à refroidissement, avant l'étape de la pesée à l'état anhydre. Ces taux d'humidité sont déterminés par le calcul suivant (Équation 2):

$$H = \frac{(M_H - M_0) \cdot 100}{M_0}$$

#### Équation 2: Calcul du taux d'humidité

Avec  $H$  : taux d'humidité de la poudre de bois (%),  $M_H$  : masse humide de la poudre de bois (g) et  $M_0$  : masse de poudre anhydre après 48 h à l'étuve à 103°C (g)

Une fois le taux d'humidité déterminé, il est possible d'accéder à la masse théorique anhydre de la poudre destinée à l'extraction (Équation 3):

$$M_{théorique} = M_H - (M_H * \frac{H}{100})$$

### Équation 3: Calcul de la masse théorique anhydre du bois

Avec  $M_{théorique}$  : masse théorique anhydre de la poudre de bois

## IV. Essais de durabilité naturelle

### 1. Préparations des éprouvettes

La planche jumelle destinée aux essais biologiques a été découpées longitudinalement en baguettes pour l'obtention d'éprouvettes de bois aux dimensions de  $5 \times 10 \times 100$  mm (Tangentiel, Radial, Longitudinal). Un nombre de 3 répétitions par position radiale a pu être obtenu.

### 2. Mise en place des essais

La méthode expérimentale utilisée pour les essais de durabilité naturelle est une adaptation de la norme (XP CEN/TS 15083-2 2006). Elle permet d'évaluer la dégradation des éprouvettes de bois dans un sol forestier, qui se compose d'une microflore active dont les champignons de pourriture molle. Ces essais sont menés en routine au laboratoire des Sciences du bois et permettent d'obtenir des résultats fiables et reproductibles pour l'essence testée au cours de cette étude. Des éprouvettes d'essai ( $100 \times 10 \times 5$  mm L, R, T) ont été enfouies verticalement (à  $3/4$  de leur longueur) dans le sol pour une durée d'exposition de 6 mois à l'égard de la microflore active. Le sol est une terre forestière provenant de Pointe Combi. Les essais ont été conditionnés dans une pièce climatique ( $30^\circ\text{C}$  et  $75\%$  HR). Les masses anhydres des éprouvettes d'essais, mesurées après leur passage à l'étuve à  $103^\circ\text{C}$  pendant 48 h, sont pesées avant exposition ( $m_0$ ) et après exposition à la microflore ( $m_1$ ). Les pertes de masse permettant d'évaluer la durabilité naturelle sont calculées à partir des valeurs de  $m_0$  et de  $m_1$  des éprouvettes d'essai à l'aide de l'Équation 4 suivante :

$$pertes\ de\ masse\ (\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} * 100$$

### Équation 4: Calcul de la perte de masse



Un total de 3 éprouvettes d'essai a été utilisé par individu (à l'exception de l'individu A4) et par position radiale. Des éprouvettes de *Virola michelii*, essence non durable (EN 350, 2016), ont été utilisées comme éprouvettes de référence afin de contrôler la virulence de la microflore du sol, avec un minimum de 3 éprouvettes par individu (soit 45 éprouvettes au final). L'essai est considéré comme valide lorsque les pertes de masse moyennes des éprouvettes de référence sont égales ou supérieures à 20 % après une durée d'exposition de 6 mois.

## Résultats

Les résultats de la durabilité naturelle, pour chacun des individus, s'expriment sous la forme d'un ratio noté  $x$  correspondant au rapport de la valeur médiane des pertes de masse pour 3 éprouvettes d'essai avec la valeur médiane des pertes de masse pour les éprouvettes de référence afin de s'affranchir de la variabilité de la virulence. Les classes de durabilité seront attribuées en fonction de la valeur  $x$  (Tableau 5) pour chaque individu, en accord avec la norme européenne EN 350 (2016).

**Tableau 5: Description des classes de durabilité naturelle selon la norme Européenne EN 350 (2016)**

Classe de durabilité (CD)	Description	Ratio $x$
1	Très durable	$\leq 0.10$
2	Durable	$> 0.10$ to $\leq 0.20$
3	Moyennement durable	$> 0.20$ to $\leq 0.45$
4	Faiblement durable	$> 0.45$ to $\leq 0.80$
5	Non durable	$> 0.80$

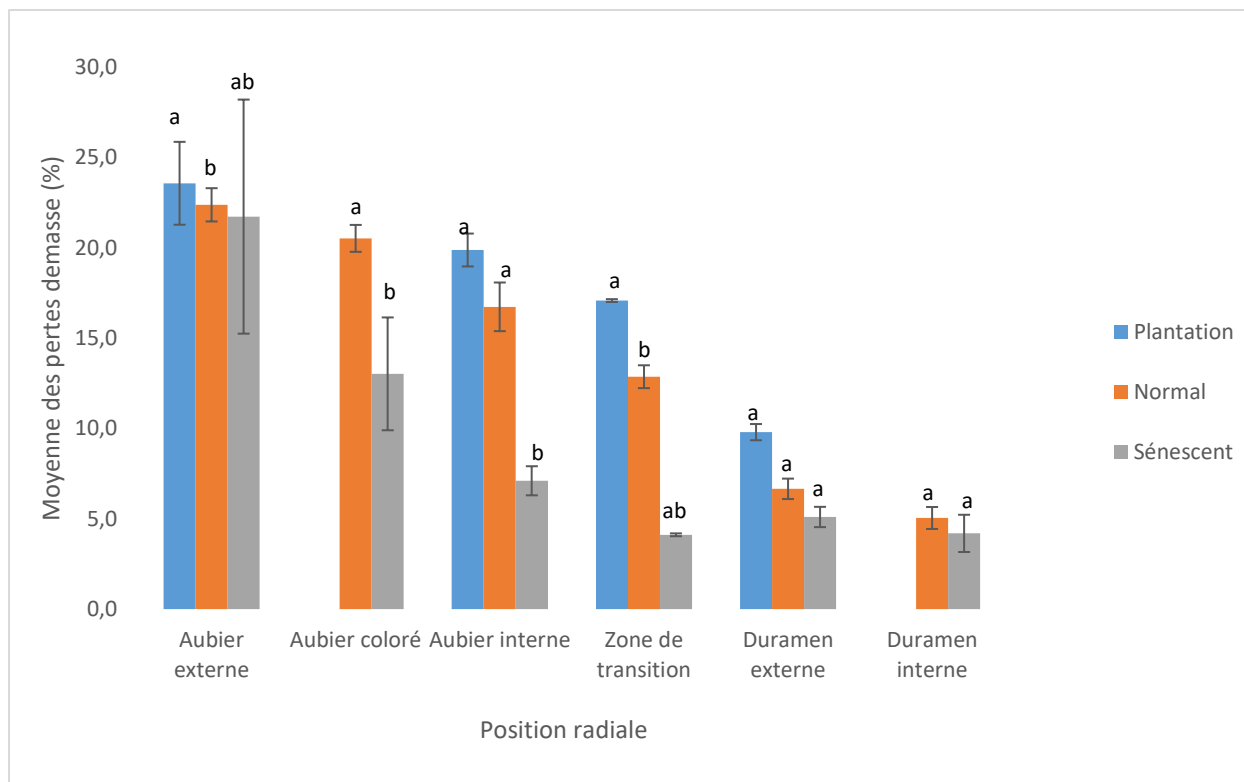
Après une durée d'exposition de 6 mois, la perte de masse moyenne des éprouvettes de contrôle, utilisées pour évaluer la virulence de la microflore du sol, s'élève à 50,6 %. Ces valeurs sont supérieures à 20 % ce qui permet de valider l'essai conformément à la norme (XP CEN/TS 15083-2 2006). Les résultats des pertes de masse permettent d'évaluer la durabilité naturelle des différents types de tissus ligneux identifiés chez les 15 individus de l'échantillonnage.

Initialement, les individus ont été sélectionnés en fonction de critères architecturaux contrastés, afin d'avoir accès à une variabilité de la durabilité naturelle. Pour valider la pertinence de la stratégie de sélection de ces individus, la variabilité de la durabilité naturelle a été analysée à l'échelle (1) des groupes architecturaux (individus normaux, de plantations ou sénescents) (2) à l'échelle intra-individuelle (pour les 15 individus de l'échantillonnage) et (3) à l'échelle inter individuelle, pour le duramen externe uniquement.

### I. Variabilité entre les groupes architecturaux

La **Figure 25** montre les pertes de masse moyennes obtenues pour les trois groupes architecturaux, en fonction des différents types de tissus ligneux. Un test non paramétrique de Mann Whitney a été réalisé pour tous les groupes. L'analyse statistique des résultats révèle des différences significatives entre les trois groupes architecturaux dans le cas des tissus non duraminisés (aubier externe, aubier coloré, aubier interne et zone de transition). Par exemple, pour la zone de transition, les individus sénescents sont significativement différents des individus issus des groupes normaux et de plantation, avec des moyennes de pertes de masse respectives de 4,1 %, de 12,9 % et de 17,1 % ce qui illustre bien une variabilité de la durabilité naturelle entre les tissus non duraminisés de ces groupes. À l'inverse, aucune différence significative n'est observée entre le duramen externe et le duramen interne dont les moyennes des pertes de masse relevées varient entre 5,1 % et 9,8 % pour le duramen externe et entre 4,2 % et 5,0 % pour le duramen interne. Ces résultats indiquent une faible variabilité de la durabilité naturelle pour les tissus duraminisés entre les individus normaux, de plantation et sénescents : les résistances biologiques sont significativement différentes.

Par conséquent, dans le cas de l'Angélique, la variabilité de la durabilité naturelle dépend du type de tissu ligneux à l'échelle du groupe architectural.



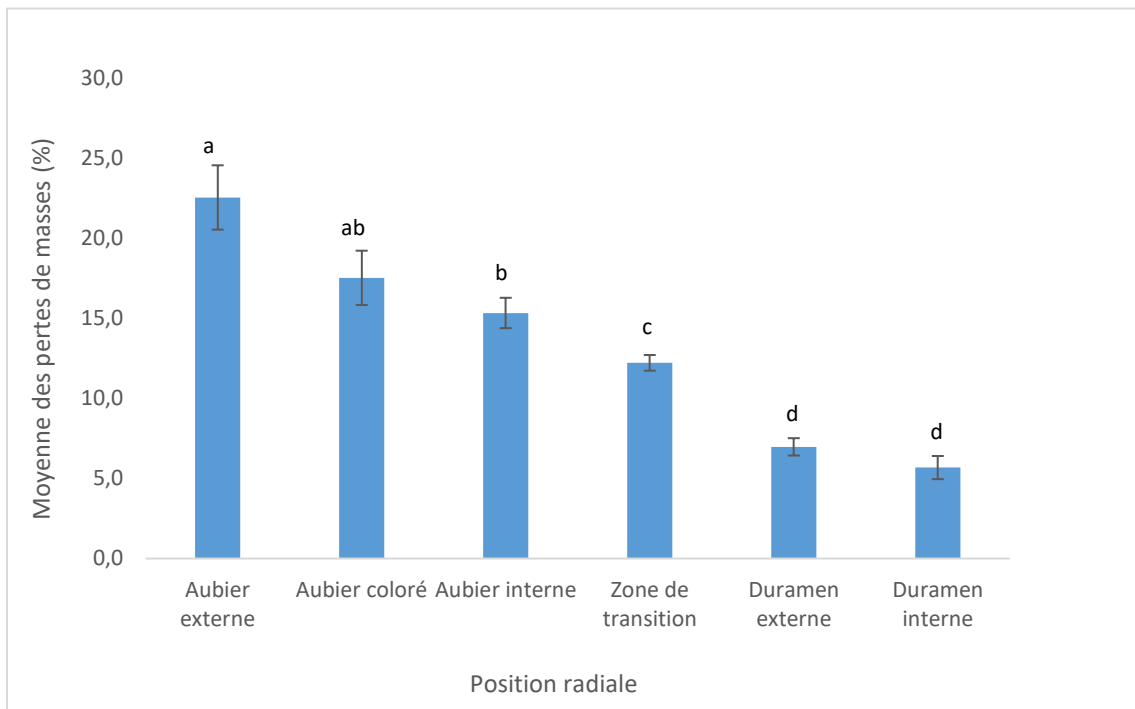
\*Les tissus avec des lettres différentes pour chaque groupe architectural sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) selon le test non paramétrique de Mann Whitney. Les barres d'erreurs représentent les écart-types calculés pour les pertes de masse moyennes de chaque groupe architectural.

Figure 25: Moyenne des pertes de masse en fonction des groupes architecturaux (n=15 individus)

## II. Variabilité par type de tissu

Une moyenne des pertes de masse a été réalisée par type de tissus ligneux à partir des 15 individus de l'échantillonnage, ceci pour une évaluation de la résistance biologique entre les différents tissus. Un test non paramétrique de Mann Whitney a été réalisé pour tous les types de tissus. L'analyse des résultats (Figure 26) montre que les tissus duraminisés sont significativement plus résistants que les tissus non duraminisés. L'aubier externe est le tissu le moins résistant (22,5 % de pertes de masse moyenne), suivi par l'aubier coloré (17,5 % de moyenne de pertes de masse) puis l'aubier interne (15,3 % de moyenne de pertes de masse) et enfin la zone de transition est significativement la plus résistante des tissus non duraminisés (12,2 % de moyenne de pertes de masse). Comme attendu, les tissus du duramen externe et duramen interne sont ceux qui présentent les plus faibles moyennes de pertes de masse respectivement de (7 %) et (5,7 %). L'ensemble des résultats témoigne de l'existence d'une variabilité de la résistance biologique du bois à l'égard de la microflore active, le long du profil

radial.



\*Les tissus avec des lettres différentes sont significativement différents ( $p$ -value < 0,05) selon le test non paramétrique de Mann Whitney. Les barres d'erreurs représentent les écart-types calculés pour les pertes de masse moyennes de chaque tissu.

Figure 26: Moyenne des pertes de masse des différents tissus ligneux des 15 individus

### III. Variabilité inter individuelle : cas du duramen externe

L'étude de la variabilité de la durabilité naturelle à l'échelle inter individuelle se focalise sur le duramen externe principalement. Ce dernier est un tissu ligneux nouvellement duraminisé, généralement considéré comme durable et qui se caractérise par la présence de métabolites secondaires (composés phénoliques, alcaloïdes) présents à l'état natif. Les moyennes des pertes de masse varient entre 2,75 % pour l'individu Cim 09 et 16,17 % pour l'individu A2. Un test non paramétrique de Kruskal Wallis a été réalisé à partir des pertes de masse obtenues pour les 15 individus. En fonction de la valeur des pertes de masse, trois groupes significatifs ont pu être établis (Tableau 6) : le groupe A, aux plus faibles pertes de masse constitué par un seul individu Cim 09, le groupe B aux plus fortes pertes de masse qui comprend les individus A2 et A0 et le groupe AB constitué des 12 individus restants. Dans ce dernier groupe, des individus issus de différents groupes architecturaux sont présents, ce qui suggère que les moyennes des pertes de masse des duramens externes ne sont pas fonction d'un groupe architectural particulier. Néanmoins, une variabilité significative des moyennes des pertes de masse est observée.

Les individus de l'échantillonnage ont ensuite été classés selon la norme Européenne EN 350

(2016), qui définit les classes de durabilité naturelles en fonction de la valeur du ratio  $x$ . D'après cette classification, 33 % des échantillons issus du duramen externe de l'Angélique sont très durables (classe de durabilité CD 1), 47 % sont durables (CD 2) et 20% sont moyennement durables (CD 3). Ces classes de durabilité ne coïncident pas avec les groupes précédemment décrits. De même, les résultats du **Tableau 6** montrent que les individus ne sont pas répartis dans les classes de durabilité naturelle en fonction de leur type architectural. Les classes de durabilité naturelle 1 et 2 sont toutes deux composées par les individus normaux, de plantations et sénescents, tandis que la classe 3 compte parmi ses rangs des individus normaux et de plantations. La variabilité de la durabilité naturelle des individus testés est donc dépendante du type de tissu mais n'est pas dépendante du type architectural.

**Tableau 6: Résultats des pertes de masse et des classes de durabilité naturelle des duramens externes des 15 individus**

Individu	Type architectural	Moyenne des pertes de masse (%)	Ecart-type (%)	Ratio $x$	Classe de durabilité
A9	Sénescent <sup>ab</sup>	5,73	0,73	0,10	1
Cim 09	Normal <sup>a</sup>	2,75	0,21	0,05	1
Cim 01	Normal <sup>ab</sup>	4,24	0,16	0,08	1
Cim 13	Normal <sup>ab</sup>	5,18	0,11	0,10	1
A7	Plantation <sup>ab</sup>	4,30	0,62	0,08	1
HP3	Sénescent <sup>ab</sup>	4,18	0,81	0,12	2
A3	Sénescent <sup>ab</sup>	5,39	0,14	0,14	2
A5	Normal <sup>ab</sup>	5,25	0,16	0,11	2
A6	Normal <sup>ab</sup>	5,41	0,25	0,11	2
Cim 02	Normal <sup>ab</sup>	5,65	0,65	0,11	2
Cim 11	Normal <sup>ab</sup>	6,14	0,12	0,12	2
A8	Plantation <sup>ab</sup>	7,92	0,09	0,14	2
A0	Normal <sup>b</sup>	16,10	0,93	0,41	3
A1	Normal <sup>ab</sup>	9,19	0,61	0,23	3
A2	Plantation <sup>b</sup>	17,16	0,64	0,44	3

\*Les individus avec des lettres différentes sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) selon le test non paramétrique de Kruskal Wallis.

## Chapitre 2: Origine de la durabilité naturelle

Les mécanismes de défenses d'un arbre peuvent reposer sur des facteurs de nature chimiques, anatomiques et physico-chimiques notamment la densité, le bois étant un biomatériau hétérogène et complexe par sa structure. Ces facteurs confèrent une résistance au bois à l'égard des différents agents de dégradation du bois et contribuent ainsi à la propriété de durabilité naturelle. En identifiant ces facteurs chez l'Angélique, il sera alors possible d'expliquer l'origine de la variabilité de sa durabilité à l'égard des champignons lignivores. Ce chapitre se décline en trois parties qui sont essentielles pour répondre à la problématique de départ, à savoir quels sont le ou les facteurs de durabilité naturelle prépondérants chez l'espèce étudiée.

La première partie de ce chapitre concerne l'étude du rôle des extractibles en tant que biomarqueurs de la durabilité naturelle, selon deux approches métabolomique : une approche non ciblée et une approche ciblée. En effet, les extractibles jouent un rôle incontournable dans cette étude car ils sont biologiquement actifs et peuvent constituer une protection chimique aux pathogènes du bois. Par l'étude métabolomique selon une approche non ciblée, il est possible d'évaluer le rôle de tous les extractibles du duramen de l'Angélique et de mettre en évidence ceux qui expliquent la variabilité de la durabilité naturelle observée au sein de l'échantillonnage. Mais le faible nombre de métabolites identifiés par rapport à la diversité structurale chimique qu'offre le bois de l'Angélique constitue un véritable frein à la compréhension du rôle de ces extractibles. Cette approche non ciblée nous permettra également d'identifier des potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle connus et/ou non connus, par stratégie de déréplication. En revanche, l'étude métabolomique par approche ciblée se base sur la quantification d'extractibles (famille chimique ou extractible isolé) qui sont considérés comme de potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle. Dans le cas de l'Angélique, sur la base d'études bibliographiques, notre attention s'est portée sur les alcaloïdes (plus particulièrement la tryptamine) composé alcaloïdique majoritaire et les composés phénoliques totaux. Une variation des teneurs de ces métabolites pourrait expliquer la variabilité inter individu observée. Pour étudier le rôle des extractibles de l'Angélique dans la durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores, deux tests biologiques ont été réalisés. Le premier test consiste en l'évaluation de l'activité antifongique d'extraits préparés à partir de l'aubier et du duramen de l'individu A5 ainsi que la tryptamine et des composés phénoliques totaux sur deux souches de champignons lignivores (Chapitre 1, Tableau 3, duramen externe = CD 2). Le second test permet d'évaluer le rôle des extractibles en les retirant des éprouvettes de bois, préparés à partir de l'individu A5, à l'aide de solvants d'extractions.

La seconde partie de ce chapitre sera consacrée aux facteurs de durabilité naturelle autres que les extractibles, telle que la lignine (type et teneur) et l'infradensité. De nombreux agents de dégradations ne sont pas en mesure de décomposer la lignine car ils ne disposent pas de système enzymatique adapté. De ce fait, la lignine constitue une véritable barrière à l'encontre des champignons lignivores. Par opposition à la lignine, l'holocellulose, qui se compose de cellulose et d'hémicelluloses, est plus facilement dégradée par les champignons. Le rôle de l'infradensité sera aussi mis en avant dans cette partie. En effet, cette mesure rend compte de la matière lignocellulosique du bois mais aussi au vide présent dans le tissu ligneux et peut être corrélée à la durabilité naturelle. Un bois ayant une faible valeur d'infradensité est généralement caractérisé par des pores à large lumen, ce qui permet une plus grande surface de tissu exposé aux enzymes produites par les champignons lignivores. De plus, des pores de grandes tailles favorisent le développement du champignon, en augmentant la capacité de rétention de l'eau et de l'air (Wong *et al.* 1983).

Enfin, la dernière partie permettra d'expliquer la durabilité naturelle du bois de l'Angélique, qui ne repose pas exclusivement sur un seul facteur. Dans cette partie, l'ensemble des facteurs étudiés sera confronté afin de discuter de leur contribution respective et de proposer un modèle les intégrant. Cette partie repose essentiellement sur des analyses statistiques réalisées sous R.

## Matériel et méthodes

### *Partie 1 : Rôle des extractibles*

#### **A. Etude métabolomique par une approche non ciblée**

##### **I. Sélection de potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle du duramen de l'Angélique**

###### **1. Préparation des extraits et conditionnement des vials**

Pour chaque individu de l'échantillonnage et chaque position radiale lorsqu'elles étaient présentes (*i.e.* aubier externe, aubier coloré, zone de transition, duramen externe et duramen interne), 500 mg de poudre de bois (200  $\mu\text{m}$ ) ont été extraites avec un mélange binaire de solvants : méthanol et eau (80 :20 v/v). L'extraction s'est déroulée à température ambiante (25°C) par agitation orbitale pendant 48 h. Une seule extraction par position radiale et par individu a été réalisée. À l'issue des 48 h, les extraits ont été filtrés sur coton, réduits et séchés par évaporateur rotatif puis sous le vide d'une pompe à palette.

Une fois sec, les extraits sous forme de poudre ont été solubilisés dans le méthanol (qualité HPLC) afin d'obtenir des solutions à la concentration de 1mg/mL. Ils ont ensuite été filtrés sur cartouche de 0,22  $\mu\text{m}$  (filtre à membrane polytétrafluoroéthylène, PTFE) et transférés dans des vials. Un total de 53 échantillons indépendants a été préparé en vue de l'analyse métabolomique par une approche non ciblée. L'acquisition des spectres MS et MS<sup>2</sup> pour la construction de réseaux moléculaires a été réalisé par Grégory Genta Jouve en novembre 2016 au laboratoire de toxicologie de l'Université de Paris Descartes.

###### **2. Acquisition des spectres MS**

L'analyse métabolomique a été réalisée selon une approche non ciblée à partir d'une chromatographie UPLC couplée à un spectromètre de masse haute résolution (HRMS Synapt G2 HDMS, Waters). Un volume de 5  $\mu\text{L}$  des extraits issus des différentes positions radiales pour chaque arbre a été injecté sur une colonne Waters Acquity UPLC (2,1\*100 mm, porosité de 1,7  $\mu\text{m}$ ) à 40°C, avec un débit de 0,5 mL/min. Les éluants A et B, respectivement l'eau milliQ et l'acétonitrile qualité HPLC tous deux à 0,1% d'acide formique, ont été employés avec le gradient suivant : 5% de B à 99% de B de 0 min à 6 min, 99% de B de 6 min à 8 min et 99% de B à 5% de B de 8 min à 10 min. L'acquisition des données s'est déroulée en mode d'ionisation positive, de 100 à 1200 m/z. Un échantillon de contrôle, le QC (Quality Control) a été préparé en parallèle et injecté dans les mêmes conditions. Le QC est un mélange de l'ensemble des extraits constituant l'échantillonnage qui permet de suivre la stabilité du système analytique au cours du run.



Les spectres obtenus ont d'abord subi un prétraitement afin d'extraire les variables d'intérêt et leurs informations pour favoriser leur interprétation. Ces étapes ont été menées sur le logiciel R (<https://www.r-project.org/>) (R Core Team 2016) à l'aide du package xcms (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/xcms.html>). Cette matrice a été soumise sur la plateforme MetaboAnalyst 3.0 pour l'analyse et le traitement de données métabolomiques (Xia and Wishart 2016). Les données ont été normalisées puis ont subi une transformation logarithmique ainsi qu'un dimensionnement par « pareto scaling », afin de permettre une comparaison entre les variables. La PLS-DA (Partial Least Squares/Projection to Latent Structures-Discriminant Analysis), analyse multivariée supervisée, est une méthode de classification qui a pour principe de maximiser la covariance entre la matrice des variables, constituées par les ions et la matrice des classes. Cette analyse a été utilisée pour identifier les biomarqueurs potentiels de la durabilité naturelle susceptibles d'expliquer les différences observées entre les individus. Le nombre optimal de variables latentes pour la classification a été déterminé par cross-validation. Le score de la VIP (Variable Importance in Projection), mesure caractéristique très importante pour la PLS-DA, permet de hiérarchiser les variables, c'est-à-dire les ions, qui permettent le mieux d'expliquer les différences observées entre les individus classés par groupe de durabilité naturelle et groupe architectural.

## II. Identification des potentiels biomarqueurs par stratégie de déréplication

### 1. Construction de réseaux moléculaires

Les extraits issus du duramen externe des 15 individus (à l'exception de l'individu A4) ont été analysés sur le même système chromatographique que celui utilisé pour l'acquisition des spectres MS, composé d'une UPLC couplée à un spectromètre de masse haute résolution (HRMS Synapt G2 HDMS, Waters). Un volume de 5 µL de l'extrait a été injecté sur une colonne Waters Acquity UPLC (2.1\*100 mm, porosité de 1,7 µm) à 40°C, avec un débit de 0,5 mL/min. Les éluants A et B, respectivement l'eau milliQ et l'acétonitrile qualité HPLC tous deux à 0,1% d'acide formique, ont été employés selon le gradient suivant : 5% de B à 99% de B de 0 min à 6 min, 99% de B de 6 min à 8 min et 99% de B à 5% de B de 8 min à 10 min. En mode positif, les ions sélectionnés ont un m/z compris entre 100 et 1200. La fragmentation s'est déroulée en mode indépendant, avec des énergies de collision de 15eV et 35eV pour le pic majoritaire du scan et une exclusion dynamique d'une durée de 1 seconde.

Les réseaux moléculaires sont ensuite générés à partir des spectres MS<sup>2</sup> obtenus précédemment. Les données sont tout d'abord converties au format mzXML à partir du format .raw à l'aide du logiciel MS-Convert (ProteoWizard, <http://proteowizard.sourceforge.net/>). Les réseaux

moléculaires sont ensuite établis directement sur la plateforme GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) (Wang *et al.* 2016). Différents paramètres ont été utilisés pour la construction des réseaux avec un score de similarité appelé cosine score (CS) de 0,7, un matched peaks minimal de 6, une tolérance de 2,0 Da pour l'ion précurseur et de 0,02 pour l'ion fragment, un network topK de 10 et un nombre minimal de cluster de 2. Les spectres MS<sup>2</sup> ayant une forte similarité spectrale (CS >7) sont représentés par des nœuds (node) et les liaisons entre ces nœuds (edge) apparaissent dès lors que la valeur du CS est supérieure à 0,7 et que les spectres possèdent six ions en communs.

## 2. Fractionnement de l'extrait alcaloïdiques à noyaux indoles

Les alcaloïdes sont généralement présents à l'état de sels avec des acides minéraux (sulfates, nitrates...) ou organiques (citrate, malate, tartrate...) ou alors combinés aux tanins. Leur basicité est due à la présence d'un doublet non liant situé sur l'atome de l'azote. L'extraction des alcaloïdes doit donc prendre en compte leur basicité et leurs états de sels, caractéristiques qui sont propres à chaque composé. Ces caractéristiques sont importantes car elles déterminent la solubilité de l'alcaloïde dans une phase aqueuse ou organique. À l'état de sels les alcaloïdes sont solubles dans l'eau et les alcools dilués alors qu'à l'état de bases, ils ne sont solubles que dans les solvants organiques. Les alcaloïdes à noyau indoles sont connus pour avoir un caractère plutôt acide que basique, c'est pourquoi les extractions des alcaloïdes minoritaires se sont déroulées en milieu acide (Bruneton 2016).

Un kilogramme de poudre (0,5 mm de granulométrie) prélevé dans le duramen de l'individu A4, représentatif de l'échantillonnage, a été solubilisé dans 10 L d'une solution hydro-alcoolique acidifiée de pH = 4 (Eau/Méthanol/Acide acétique 80 :20 :1). La macération s'est déroulée sous agitation magnétique pour une durée de 24 h à température ambiante (25°C). Trois extractions successives ont été effectuées. Par la suite, le méthanol a été éliminé sous vide à l'évaporateur rotatif, permettant la récupération de 400 mL d'une solution aqueuse acide composée de sels d'alcaloïdes. Cette solution aqueuse a été filtrée sous vide sur membrane de nitrocellulose. Les sels d'alcaloïdes ont été récupérés par alcalinisation de la phase aqueuse à pH = 13 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) suivi d'une double extraction liquide – liquide au dichlorométhane (400 mL).

Dans l'objectif d'extraire les alcaloïdes totaux en fonction de leur basicité, la phase organique recueillie a été évaporée à l'évaporateur rotatif et solubilisée dans 100 mL d'une solution aqueuse acidifiée à 1% d'acide acétique. Le pH de la solution a ensuite été ajusté à 8, puis à 10 et à 12 à l'aide d'une solution de NaOH. Trois extractions successives ont été réalisées à chacun

de ces pH avec 200 mL de dichlorométhane. Les extraits recueillis ont été respectivement concentrés et séchés à l'évaporateur rotatif, au Speedvac™ (Savant SPD 121 P) et sous le vide d'une pompe à palette. À l'issue du séchage de la phase organique, la masse des extraits alcaloïdiques totaux aux pH = 8, pH = 10 et pH = 12 était respectivement de 310 mg, de 1,03 g et de 2,19 g.

Pour la suite des expérimentations, seul l'extrait à pH 10, dont le profil chromatographique se rapprochait le plus de celui de l'extrait alcaloïdique total, a été retenu pour le fractionnement. Le choix s'est porté sur cet extrait car il est susceptible de renfermer des alcaloïdes de basicités différentes et donc de structures chimiques très variées de par sa ressemblance avec l'extrait alcaloïdique total. L'extrait à pH 10 a été analysé à l'aide d'une HPLC analytique (Dionex Ultimate 3000 RS, détecteur à barrette de diode UV/VIS (DAD) et détecteur Corona veo SD) sur une colonne Thermo Hypersil Gold C18, 150 × 2,1 mm, porosité de 3µm, avec un débit de 0,7 mL/min et une température de 40°C. La phase mobile se compose d'eau milliQ (A) et d'acétonitrile (B), tous deux à 0,1% d'acide formique. Le gradient suivant a été utilisé pour l'analyse : 2 % de B pendant 1 min ; 2 % de B à 30 % de B (1 - 10 min) ; 30 % de B à 60 % de B (10 - 30 min) ; 60 % de B à 100 % de B (30 - 35 min) ; 100 % de B à 100 % de B (35 - 40 min) ; 100 % de B à 2 % de B (40 - 41 min).

Sur le profil chromatographique de l'extrait à pH 10, le pic correspondant à la tryptamine était majoritaire ce qui pose problème pour la détection des composés alcaloïdiques minoritaires. Afin d'éliminer une quantité maximale de tryptamine dans l'extrait, la technique de SPE a été utilisée. L'extrait a tout d'abord été « lavé » sur une cartouche de silice C18 en utilisant un gradient linéaire constitué d'eau milliQ (éluant A) et d'acétonitrile qualité HPLC (éluant B) tous deux à 0,1% d'acide formique. Le gradient de solvant utilisé est le suivant : (A/B) (95 :5 ; 90 :10 ; 80 :20 ; 50 :50). À l'issue du lavage, 4 fractions ont été récupérées, avec la fraction A (413 mg à 95 :5 A/B), fraction B (384 mg à 90 :10 A/B), fraction C (75 mg à 80 :20 A/B) et fraction D (84 mg à 50 :50 A/B). Les profils chimiques des 4 fractions ont été comparés en HPLC analytique dans les mêmes conditions décrites précédemment. À l'issue de la comparaison, seule la fraction D, qui présentait de faibles absorbances en UV pour la tryptamine, a été conservée pour la suite des expérimentations.

Pour une meilleure séparation des métabolites, la fraction D a été fractionnée sur une HPLC semi-préparative, couplée à un détecteur UV à barrette de diode (à 280 nm) et équipé d'une

colonne Luna C18, 210 × 21,20 mm, porosité de 5 µm avec un débit de 20 mL/min. L'appareil utilisé contient des composantes du HPLC Dionex Ultimate 3000 RS dont le détecteur DAD hormis les pompes qui proviennent de l'appareil Varian Prepstar (Agilent). La phase mobile se compose d'eau milliQ (A) et d'acétonitrile qualité HPLC (B), tous deux à 0,1% d'acide formique. Une méthode qui comprend un gradient « step » de 0 à 15 min et un gradient linéaire de 15 à 50 min a été optimisée pour l'analyse de la fraction. La fraction D a été collectée dans 161 tubes à essai de 20 mL et le contenu des tubes a été rassemblé en 4 sous-fractions en fonction du temps d'éluion des métabolites de l'extrait. Le seuil de détection choisi pour la collecte des composés était de 10 mAU. Ainsi, 4 sous fractions ont été recueillies à savoir : G1 (41 mg), G2 (5 mg), G3 (24 mg) et G4 (14 mg). La sous- fractions G2 possédant une faible quantité en extraits, seules les sous fractions G1, G3 et G4 ont été retenues pour la suite des expérimentations.

L'isolement des alcaloïdes effectué à partir des sous-fractions G1, G3 et G4, a été réalisé par collecte automatisée des métabolites en tubes de 20 mL. Les sous-fractions ont été analysées sur une HPLC semi-préparative en utilisant la même colonne et les mêmes solvants (A) et (B) que précédemment. Les méthodes d'analyses ont été adaptées en fonction des sous fractions avec la mise en place de 3 gradients linéaires :

- 10% de B à 100% de B (0 - 40 min) pour FD-G1 ; collecte de 67 tubes de 20 mL
- 25% de B à 100% de B (0 - 40 min) FD-G3 ; collecte de 33 tubes de 20 mL
- 30% de B à 100% de B (0 - 35 min) pour FD-G4 ; collecte de 66 tubes de 20 mL

La collecte des composés a été effectuée selon le seuil de détection de 10 mAU pour FD-G1 et FD-G3 et par tube pour FD-G4 (20 mL/tube/min). Après vérification par HPLC analytique des produits de collectes des 3 sous-fractions (Dionex Ultimate 3000, détecteur DAD UV/VIS Corona veo SD), 38 métabolites plus ou moins purs ont pu être isolés. Pour les fractions contenant les composés les moins purs, de nouvelles purifications ont été opérées sur le même équipement. Elles ont été injectées sur une colonne Phenomenex Luna (C18, 250\*10 mm, porosité de 100 µm) avec un débit de 4 mL/min et une température de colonne de 40°C. Les méthodes d'analyses ont été adaptées en fonction des composés.

Enfin, les composés isolés ont été caractérisés par RMN du proton <sup>1</sup>H et spectrométrie de masse. Ces analyses ont été menées en décembre 2015 par le Laboratoire de Mesures Physiques, appartenant à la plateforme d'analyse et de caractérisation (PAC) du Pôle chimie Balard, à

l'Université de Montpellier.

**Analyses de spectroscopie RMN :** Les expériences du proton  $^1\text{H}$  ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance III (600 MHz) équipé d'une cryosonde Prodigy TCI et d'un passeur d'échantillons. Les composés ont tous été dissous dans un volume de 600  $\mu\text{L}$  de méthanol deutéré.

**Analyses de LC-MS :** Les 38 composés considérés comme purs ont été analysés sur un système de couplage LC-MS, composé d'une UPLC Acquity (Waters) et d'un spectromètre de masse haute résolution Synapt G2-S (Waters) équipé d'une source ESI. Cette analyse est surtout utilisée pour la détermination de la masse de l'ion moléculaire. Un volume de 1  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont injectés sur la colonne chromatographique Acquity C18 (Waters), aux dimensions de 50  $\times$  2,1 mm, porosité de 1,7  $\mu\text{m}$  à 25 °C. La phase mobile délivrée dans la colonne est constituée d'eau milliQ (A) et d'acétonitrile qualité HPLC (B), tous deux à 0,1% d'acide formique. Un gradient linéaire a été utilisé (de 0 % de B à 100 % de B en 3 minutes) associé à un débit de 0,5 ml/min. Les spectres ont été enregistrés en mode positif, entre 100 et 1500 Da. Les conditions de la source sont les suivantes : la tension de capillaire est de 3000 V et la tension de cône est de 30 V ; la température de la source et de la désolvation sont respectivement de 140 °C et 450 °C.

Parmi les 38 produits initialement isolés, seuls 3 alcaloïdes ont pu être identifiés. Après analyse de tous les spectres de masses et du proton  $^1\text{H}$  de tous les composés isolés, des ébauches de structures moléculaires ont pu être établies pour 3 composés uniquement. Pour parvenir à l'élucidation structurale de la molécule entière, des expérimentations supplémentaires par RMN 1D ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) et en 2D (COSY, TOCSY, HSQC et HMBC) ont été réalisées pour ces 3 composés à partir du spectromètre Varian de 400 MHz équipé d'une sonde inverse de 5 mm (Auto X PGF).

## **B. Etude métabolomique par une approche ciblée**

### **I. Quantification de potentiels biomarqueurs : cas de la tryptamine**

#### **1. Développement de la méthode d'extraction des alcaloïdes totaux**

Le bois de l'Angélique est le lieu de synthèse et de stockage d'alcaloïdes dérivés du tryptophane connus pour leurs nombreuses activités pharmacologiques. Parmi ces alcaloïdes, la tryptamine est l'alcaloïde majoritaire, qui serait aussi antifongique à forte concentration (Déon, 1980).

Ainsi, la tryptamine serait un potentiel biomarqueur de durabilité ce qui justifie la mise en place d'une méthode d'extraction de cet alcaloïde en vue d'une quantification. Les méthodes d'extractions permettent l'obtention d'extraits en alcaloïdes totaux enrichis en tryptamine. Bien que la tryptamine ait un caractère plutôt acide, les extractions ont été réalisées en milieu basique. Classiquement, lors d'une extraction des alcaloïdes totaux en milieu basique, le matériel végétal est dans un premier temps extrait avec une solution aqueuse alcaline (extraction solide-liquide), puis les métabolites sont récupérés à l'aide d'un solvant organique (extraction liquide-liquide) en ampoule à décanter. La seconde étape consiste en une extraction liquide-liquide des alcaloïdes bases en présence d'une solution aqueuse acide diluée. Enfin, la solution aqueuse en sels d'alcaloïdes est alcalinisée puis une seconde extraction liquide-liquide est réalisée avec un solvant organique non miscible. À l'issue de cette étape, l'extrait en alcaloïdes totaux est récupéré. La succession de toutes ces étapes peut à terme influencer la détermination du rendement en alcaloïdes totaux. Par comparaison avec l'extraction en milieu basique, celle qui se déroule en milieu acide est plus longue et implique des étapes supplémentaires et donc influence aussi les rendements d'extraction.

Ces dernières remarques justifient le développement d'une méthode d'extraction d'alcaloïdes totaux en milieu basique au cours de cette thèse. Cette méthode se veut simple d'usage, rapide, reproductible et adaptée à tous les individus dans le cas où la tryptamine est un véritable biomarqueur de durabilité naturelle. La méthode d'extraction proposée permet de réunir à la fois les conditions pour l'extraction des alcaloïdes à partir de la poudre de bois en milieu basique (extraction liquide-solide) mais aussi l'extraction liquide-liquide pour récupérer les alcaloïdes, extraits de la matrice lignocellulosique, avec un solvant organique non miscible. Pour simplifier la récupération de la phase organique plus dense que l'eau (cas du dichlorométhane), l'unité d'extraction choisie est une cuve en verre équipée d'un robinet. Ainsi, la phase organique contenant l'extrait en alcaloïdes totaux peut être directement collecté dans un bécher. Deux alternatives de la méthode d'extraction en milieu basique sont proposées ci-dessous, appelées « one step » et « two step ». Dans les deux cas, les extractions se sont déroulées avec 2 g de poudre de bois (duramen de l'individu A4) pour des durées de 30 min. Les résultats des rendements en alcaloïdes totaux permettront de sélectionner la méthode la plus performante.

La méthode « one step » a été mise au point à partir du duramen externe (granulométrie de 500  $\mu\text{m}$ ) de l'individu A4 représentatif de l'échantillonnage. Dans une cuve, la poudre de bois est mise en contact avec une solution biphasique de dichlorométhane (200 mL) et d'eau (100 mL, pH = 14, 2 g de chlorure de sodium (NaCl)) (Figure 27). Le NaCl a été rajouté au mélange

aqueux afin de briser les émulsions formées. L'extraction se déroule à température ambiante (25°C) sous agitation magnétique. À l'issue de l'extraction, le mélange est placé dans un bain à ultrason pendant 30 secondes afin de favoriser la séparation de la phase aqueuse et de la phase organique. Après avoir recueilli la phase organique, contenant les alcaloïdes totaux dans un erlenmeyer, la solution aqueuse est de nouveau extraite à l'aide de 200 mL de dichlorométhane. Cette extraction est renouvelée deux fois. Pour éliminer l'eau qui peut être encore présente dans les phases organiques cumulées, du sulfate de magnésium est ajouté puis les phases organiques sont filtrées sur coton. Enfin, elles sont concentrées et séchées à l'évaporateur rotatif, au concentrateur Speedvac™ (Savant SPD 121 P) et sous le vide d'une pompe à palette. Dans le cas de l'évaluation de la méthode « one step », seul un extrait en alcaloïde totaux a été préparé par individu.

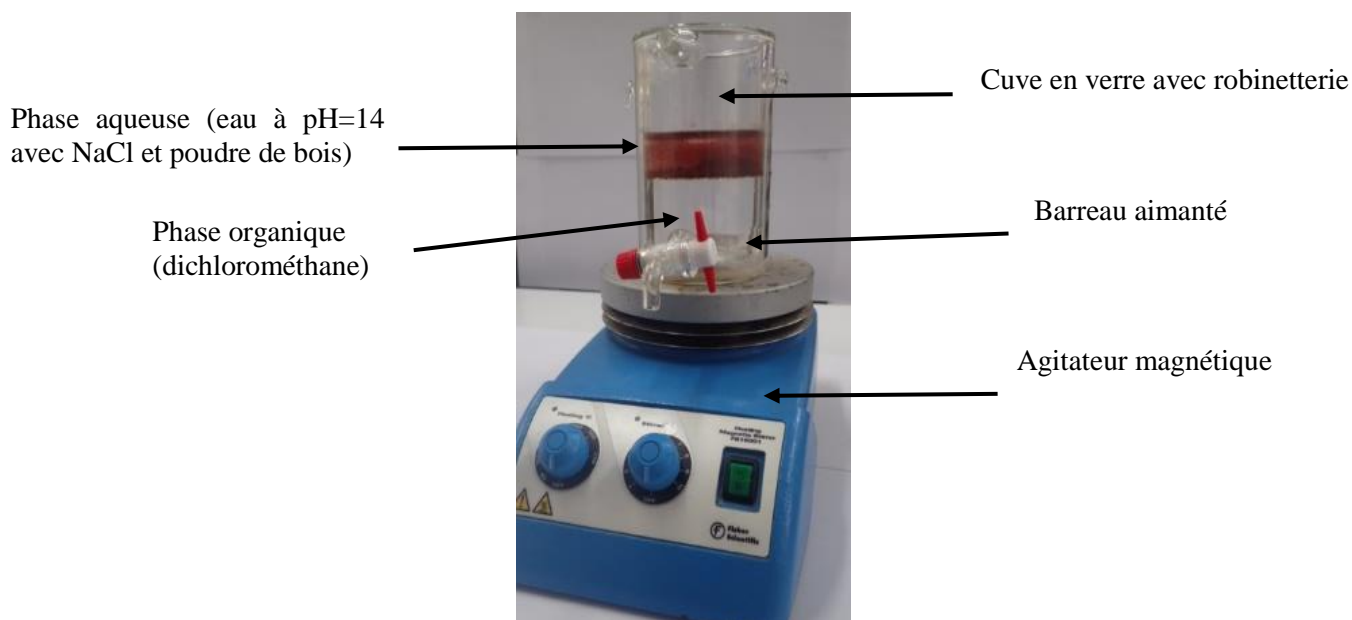


Figure 27: Photographie illustrant le matériel requis pour les extractions en alcaloïdes totaux

Par comparaison, la méthode « two step » a pour objectif d'améliorer les rendements en alcaloïdes totaux par comparaison à la méthode « one step ». Pour cela, une étape de macération de la poudre de bois dans la phase aqueuse basique (100 mL, pH = 14, 2 g de chlorure de sodium ou NaCl) a été réalisée avant l'étape d'extraction au dichlorométhane (200 mL). La macération se déroule pendant une heure sous agitation magnétique à température ambiante (25°C, 65%

d'humidité relative). L'étape d'extraction au dichlorométhane est identique à celle de la « one step ». Après les 3 extractions successives des alcaloïdes totaux, du sulfate de magnésium est ajouté aux phases organiques cumulées qui sont par la suite filtrées sur coton. Un extrait d'alcaloïdes totaux a été réalisé par individu pour cette méthode.

Pour la suite de nos expérimentations, la méthode « one step » a été retenue. Elle se veut plus rapide que la méthode « two step » comme elle ne dure que 15 minutes et permet d'obtenir des rendements en alcaloïdes similaires.

## 2. Paramètres influençant le rendement d'extraction en alcaloïdes totaux

De manière générale, les rendements en extractibles sont influencés par la méthode d'extraction qui prend en compte plusieurs paramètres tels que la masse initiale de poudre de bois, les volumes en solvants d'extraction ou encore la durée d'extraction. Les paramètres suivants ont été testés, pour des volumes inchangés en solvants :

- La quantité de poudre de bois 2 g, 4 g et 6 g de poudre de bois (granulométrie 500 µm)
- La durée de l'extraction : 15 ou 60 minutes sous agitation magnétique, à température ambiante (25°C).

Afin de mettre en évidence l'influence des volumes de solvants sur les teneurs en alcaloïdes totaux, la méthode « one step » s'est déroulée exceptionnellement dans des béchers, pour une durée d'extraction de 15 min sous agitation magnétique. L'extraction a été réalisée pour les quantités de poudre de bois de 2, 4 et 6 g et les volumes en solvants ont été adaptés en fonction de ces quantités. Initialement pour l'extraction de 2 g de poudre de bois, les volumes en solvants aqueux et organiques utilisés sont de 100 ml et 200 ml respectivement. Pour les quantités de poudre de bois, 4 g et 6 g, ces volumes de solvants ont été doublés et triplés (**Tableau 7**).

**Tableau 7: Récapitulatif des volumes en solvants d'extraction utilisés par rapport à la quantité de poudre de bois initiale**

	2 g	4 g	6 g
Volume phase aqueuse (ml)	100	200	300
Volume phase organique (ml)	200	400	600



Pour évaluer la répétabilité de la méthode d'extraction, nous avons réalisé 3 extractions indépendantes d'alcaloïdes totaux, conduites en simultanées à partir du duramen externe de l'individu A4 représentatif de l'échantillonnage. Dans ce cas, les mêmes paramètres d'extraction ont été conservés pour l'obtention des 3 extraits. Cette expérimentation permettra d'identifier les éventuels biais liés par exemple, à l'appareillage (impact de l'épaisseur de la cuve, taille du coton, etc).

### 3. Quantification de la tryptamine par RMN quantitative du proton $^1\text{H}$

L'extraction des alcaloïdes totaux a été réalisée avec la méthode « one step », à partir de 2 g de poudre de bois (granulométrie de 200  $\mu\text{m}$ ), sous agitation magnétique pendant 15 min, à température ambiante (25°C) pour uniquement 9 individus de l'échantillonnage. Les individus sélectionnés sont représentatifs des 3 groupes architecturaux, à savoir les individus normaux (A0, A5, A1), sénescents (A3, A9, HP3) et de plantations (A2 A7, A8). Les individus appartenant à des groupes architecturaux contrastés sont susceptibles de présenter des variabilités de leur durabilité naturelle. La tryptamine étant considérée comme un potentiel biomarqueur, il peut être supposé que cette variabilité observée soit due à une variation des teneurs de ce métabolite entre les individus de ces 3 groupes.

Un total de 27 extraits alcaloïdiques a été obtenu. Pour chaque individu, trois extractions indépendantes et effectuées simultanément du duramen externe ont été réalisées, avec l'utilisation de 3 cuves séparées. Par la suite, le dosage de la tryptamine a été réalisé à partir des 27 extraits alcaloïdiques précédemment préparés pour analyses quantitatives par RMN du proton  $^1\text{H}$  dans un premier temps. À ce titre, l'extrait alcaloïdique total sec, contenant notamment la tryptamine, est dissout dans 600  $\mu\text{L}$  de diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO  $d_6$ ), en présence de 8 mg d'un standard RMN, le 1, 2, 4,5-Tetrachloro-3-nitrobenzène (1,2,4,5 TCNB ; **Figure 28**) (CAS : 117-18-0 ; Sigma Aldrich). Ce standard se caractérise par la présence d'un unique proton.



**Figure 28: Structure moléculaire du standard 1,2,4,5-Tetrachloro-3-nitrobenzène**

Le principe de quantification en RMN repose sur l'existence d'une proportionnalité entre l'aire sous la courbe des signaux du composant à quantifier avec sa concentration dans l'extrait. À l'aide du standard 1,2,4,5 TCNB qui ne possède pas de signaux chevauchant avec le composé d'intérêt, il est possible de déterminer la quantité de mole de la tryptamine dans le cas présent. La quantification de la tryptamine a pu être réalisée en RMN car les signaux correspondants sont majoritaires dans l'extrait alcaloïdique. Les spectres protons  $^1\text{H}$ , qui ont servi à la quantification de la tryptamine, ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Varian de 400 MHz équipé d'une sonde inverse de 5 mm (Auto X PGF). Pour chaque spectre proton  $^1\text{H}$ , les paramètres requis pour l'expérimentation sont les suivants : 12 scans ; 30 secondes de temps de relaxation et  $45^\circ$  d'angle d'impulsion. Le traitement des spectres a été réalisé sur le logiciel MestReNova 9.0 (Mestrelab Research), avec une correction de la ligne de base et une intégration automatique des signaux correspondant aux déplacements chimiques des 5 protons aromatiques du noyau indole de la tryptamine (deux doublets à 7,50 ppm et 7,32 ppm ; un singulet à 7,13 ppm ; deux triplets à 7,05 ppm et 6,96 ppm) (Figure 29).

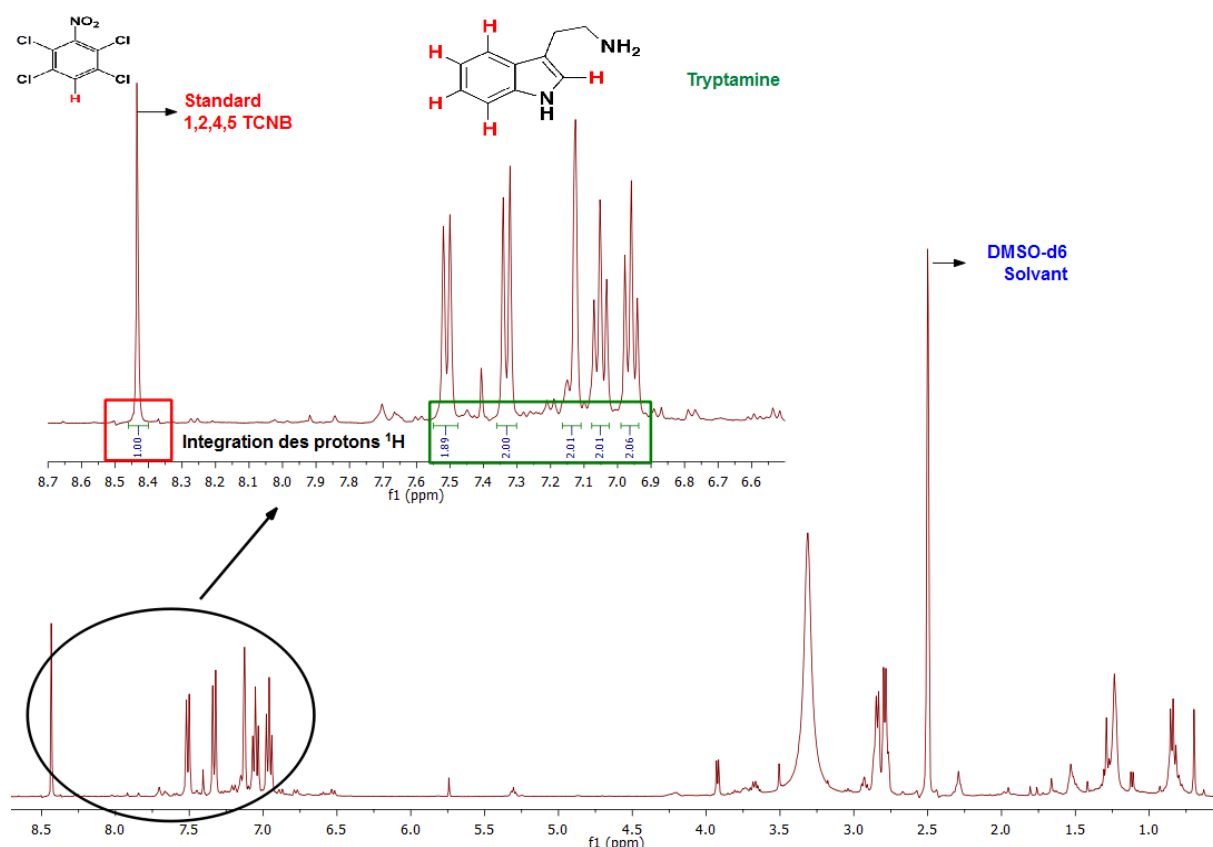


Figure 29: Signaux caractéristiques des protons,  $^1\text{H}$  de la tryptamine dans le spectre RMN d'un extrait alcaloïdique total du duramen de l'Angélique

Une fois l'intégration réalisée, il faut appliquer une 'automatic multiplet analysis' qui permet

de déterminer la multiplicité de tous les signaux intégrés (doublet, singulet, triplet, etc). Chaque multiplet sélectionné correspond donc au signal de résonance des 5 protons aromatiques du noyau indole de la tryptamine. Enfin, la quantification se fait de manière automatisée avec l'utilisation du plugin 'qNMR' disponible sur le logiciel MestReNova 9.0 (Mestrelab Research). Pour cela, il suffit de renseigner la masse (en g) et la masse molaire du standard ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) dans l'onglet 'CCF setup' (Concentration Conversion Factor) afin de calculer les quantités de moles en tryptamine présentes dans chaque extrait alcaloïdique total. Les quantités de moles sont calculées pour chaque multiplet et sont ensuite moyennées par le logiciel. La masse (en g) de tryptamine est déterminée par le calcul suivant selon Malz and Jancke (2005) (Équation 5) :

$$m_{try} = \frac{I_{try}}{I_{std}} * \frac{N_{std}}{N_{try}} n_{std} * M_{try}$$

**Équation 5: Calcul de la quantité de tryptamine (en g) présente dans l'extrait en alcaloïde totaux**

Avec :  $I_{try}$  : Moyenne de l'aire des pics des protons de tryptamine ;  $I_{std}$  : Aire du pic du proton du standard ;  $N_{std}$  : Nombre de proton du standard ;  $N_{try}$  Nombre de proton de la tryptamine ;  $n_{std}$  : Nombre de mole du standard (mole) ;  $M_{try}$  = Masse molaire de la tryptamine ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et  $m_{try}$  = Masse de la tryptamine (g).

#### 4. Les facteurs susceptibles d'influencer la quantification de la tryptamin en RMN

La quantification de la tryptamine en RMN peut être influencée par plusieurs facteurs (température, etc) d'où la nécessité de les identifier pour éviter des biais de mesure. Le séchage permet une meilleure conservation du matériel végétal et de ce fait, il est souvent employé mais une température trop importante peut altérer la composition chimique du matériel végétal si le composé d'intérêt est thermosensible. Appliqué à nos poudres de bois, il peut impacter les rendements en tryptamine et constitue ainsi un critère important. À cet effet, des extraits alcaloïdiques ont été préparés selon la méthode « one step » à partir des échantillons de bois humide (50%), sec à l'air (8%) et anhydre (0%) issu de l'individu A4 (granulométrie de 500  $\mu\text{m}$ ), considéré comme normal. Les teneurs en tryptamine ont ensuite été mesurées en qRMN du proton  $^1\text{H}$  à partir des 3 extraits alcaloïdiques.

De plus, une mauvaise conservation des extraits alcaloïdiques est une source potentielle de variation des teneurs en tryptamine. En effet, les alcaloïdes à l'état de base se conservent

difficilement en solution organique et sont sensibles à certains facteurs tels que la température, la lumière ou l'oxygène par exemple (Bruneton 2016). Par conséquent, il s'avère important d'identifier les conditions optimales de stockage des extraits solubilisés dans le DMSO-d<sub>6</sub> avant analyse par RMN pour assurer un rendement en tryptamine non biaisé. Les conditions de stockage de ces extraits en solution dépendent de la durée ainsi que de la température. Pour étudier l'effet de ces deux paramètres sur les teneurs en tryptamine, 3 extraits alcaloïdiques ont été préparés à partir du duramen externe (granulométrie de 200 µm) de l'individu A1, représentatif d'un individu normal, avec la méthode d'extraction « one step ». Ces 3 extraits ont ensuite été solubilisés dans du DMSO-d<sub>6</sub>. Le 1<sup>er</sup> extrait a été préparé et ensuite analysé par qRMN <sup>1</sup>H le jour même et les teneurs en tryptamine ont pu être quantifiés à partir du spectre <sup>1</sup>H enregistré. Les 2 autres extraits ont été conditionnés à 25°C pendant respectivement 11 et 43 jours après extraction. Ils ont été analysés en qRMN <sup>1</sup>H à l'issue de ces durées. De même, pour mettre en évidence l'effet d'une longue durée de conservation des extraits sur les rendements en tryptamine, le 1<sup>er</sup> extrait issu de l'individu A1, qui a été préparé et analysé le même jour par qRMN <sup>1</sup>H, a été conservé pendant un an à -20°C. À l'issue de cette durée, l'extrait a de nouveau été analysé par qRMN <sup>1</sup>H.

#### 5. Reproductibilité de la mesure par qRMN <sup>1</sup>H

Une courbe de calibration constituée de 4 points (Figure 30) a été établie à partir de la tryptamine commerciale afin de s'assurer de la reproductibilité des expérimentations du proton <sup>1</sup>H effectuées par qRMN. Cette courbe permet également de déterminer les seuils de quantification et l'erreur (RMSD) de l'appareil de mesure. Pour cela, des teneurs connues en tryptamine (1,0 mg, 3,5 mg, 6,4 mg et 11,0 mg) ont été mesurées en présence du standard 1,2,4,5 TCNB l'aide d'un spectromètre Varian de 400 MHz équipé d'une sonde inverse de 5 mm (Auto X PGF). La tryptamine commerciale (CAS : 61-54-1 ; Sigma-Aldrich) a été solubilisée dans 600 µL de DMSO-d<sub>6</sub>. Les paramètres requis pour l'expérimentation du proton <sup>1</sup>H sont les suivants : 8 scans ; 80 secondes de temps de relaxation (T1) et 45° d'angle d'impulsion. Les conditions d'analyses utilisées ici n'ont pas pu être appliquées aux extraits alcaloïdiques issus des 9 individus pour un souci d'appareillage.

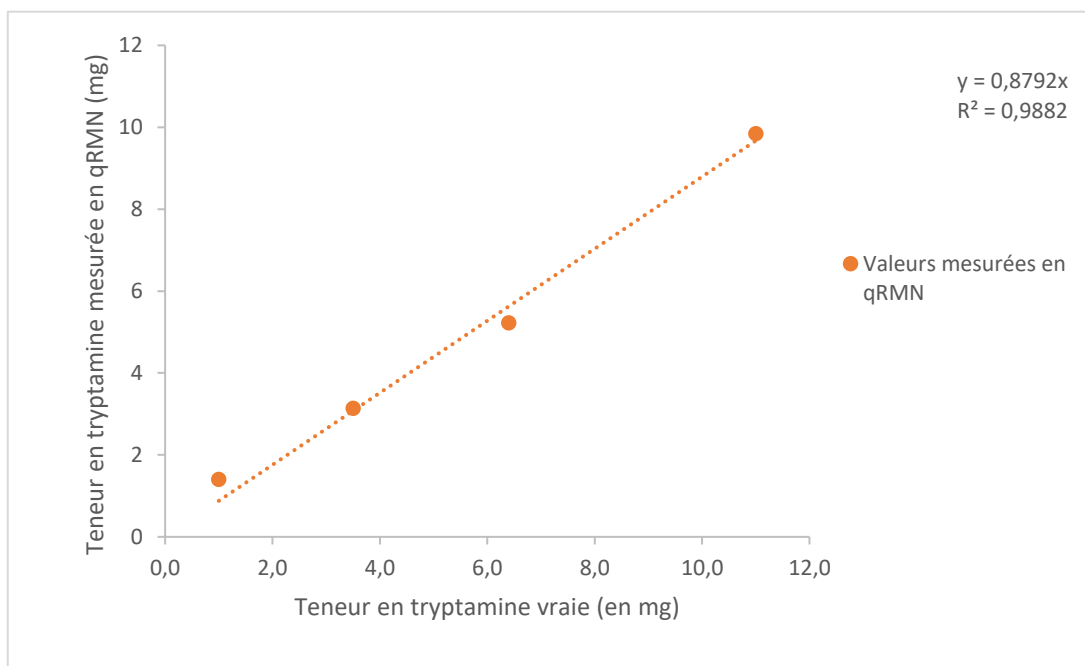


Figure 30: Courbe de calibration des teneurs en tryptamine commerciale vraie (par pesée) VS les teneurs en tryptamine commerciale mesurées par qRMN

## 6. Quantification de la tryptamine par HPLC-DAD

La quantification par HPLC-DAD est très utilisée dans le cas où les composés ont la capacité d'absorber les rayonnements UV, comme c'est le cas des alcaloïdes à noyau indoles. Cette quantification implique aussi la présence d'un standard en usage interne, (directement introduit dans l'échantillon à quantifier) ou alors en usage externe (par la réalisation d'une courbe de calibration à partir de ce standard). Dans le cas de la quantification de la tryptamine présente naturellement dans le bois de l'Angélique, la tryptamine commerciale a été utilisée comme standard externe. La quantification de la tryptamine a été réalisée à partir des 27 extraits alcaloïdiques qui ont servi à la quantification de la tryptamine par qRMN. Les teneurs en tryptamine mesurées avec les deux techniques analytiques (qRMN et HPLC-DAD) seront comparées afin de sélectionner la technique analytique la plus adéquate pour la quantification.

Pour la réalisation de la courbe de calibration, plusieurs solutions de tryptamine commerciale (CAS : 61-54-1 ; Sigma-Aldrich) ont été préparées dans de l'éthanol anhydre (qualité HPLC) aux concentrations de 10 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 300 µg/mL, 500 µg/mL, 700 µg/mL, 850 µg/mL et 1000 µg/mL. Toutes les solutions ont été filtrées sur cartouche de 0,22 µm (filtre à membrane polytétrafluoroéthylène, PTFE) avant injection dans la colonne. Les analyses ont été faites sur une HPLC analytique (Varian 920-LC ; détecteur DAD-UV à

280 nm). Pour chaque concentration, 3 injections d'un volume de 10  $\mu$ L ont été effectuées sur une colonne Hypersil Gold (C18, 150\*2,1mm, porosité de 3 $\mu$ m). Une méthode d'analyse en gradient linéaire a été utilisée sur une durée de 20 min, avec de l'eau milliQ (A) et de l'acétonitrile qualité HPLC (B) tous deux à 0,1% d'acide formique en solvants d'analyse et un débit de 1 mL/min. La méthode utilisée est la suivante : 2 % de B pendant 1 min ; 2 % à 10 % de B pendant 6 min ; 10 % à 100% de B pendant 3 min ; 100% de B pendant 5 min ; 100% à 2% de B pendant 2min ; 2% de B pendant 3 min.

Une régression linéaire réalisée à partir du logiciel XLSTAT a permis d'établir la courbe d'étalonnage de la tryptamine (Figure 31) et d'estimer le coefficient de détermination  $R^2$ .

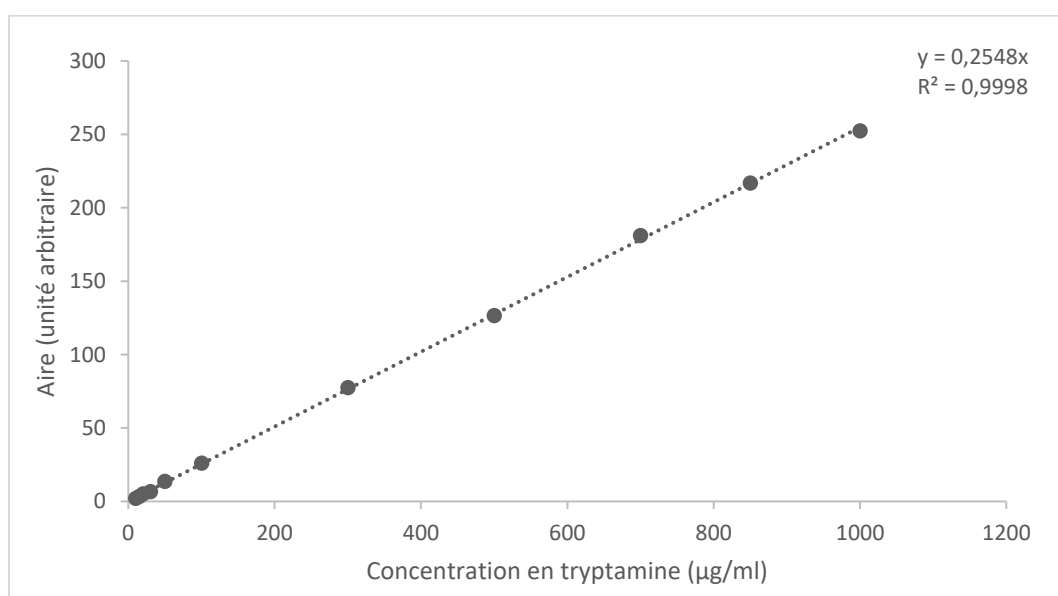


Figure 31: courbe d'étalonnage de la tryptamine commerciale mesurée en HPLC-DAD

La quantification de la tryptamine présente dans les extraits alcaloïdiques totaux préparés précédemment par HPLC-DAD a été réalisée à l'aide d'une courbe de calibration. Les analyses ont été réalisées sur la HPLC Varian 920-LC équipée d'un détecteur DAD-UV à 280 nm. Pour cela, tous les extraits alcaloïdiques totaux ont d'abord été dilués au 1/25<sup>e</sup> dans de l'éthanol absolu (qualité HPLC) et 10  $\mu$ L des extraits dilués ont été injectés sur la colonne Hypersil Gold (C18, 150\*2,1mm, porosité de 3 $\mu$ m). Chaque extrait alcaloïdique total a été analysé 3 fois.

Les chromatogrammes ont été traités manuellement sur le logiciel OriginPro, afin de mesurer les aires à mi-hauteur du pic correspondant à la tryptamine permettant ainsi de déterminer les teneurs de cette dernière dans les extraits alcaloïdiques totaux.

## II. Quantification de potentiels biomarqueurs : les phénols totaux

### 1. Généralités sur les méthodes d'extractions des composés phénoliques

La notion de composés phénoliques fait référence à des métabolites regroupés en fonction de leur origine biosynthétique, généralement ceux issus de la voie du shikimate et de l'acétyl-CoA (Bruneton, 2016). Ces composés englobent une pluralité de familles chimiques (les flavonoïdes, les tanins, etc) et sont généralement solubles dans les solvants polaires tels que l'eau, (chauffée ou non), l'éthanol ou le méthanol. Ils ont aussi la particularité d'être antioxydants. En effet, les composés phénoliques sont capables de retarder significativement ou de prévenir l'oxydation de lipides, de protéines ou de glucides provoquée par la production de radicaux oxygénés libres ou ROS (Reactive Oxygen Species), à l'origine d'importants dégâts cellulaires. Ces dégâts cellulaires sont induits par les champignons lignivores, par exemple, au cours de la dégradation du bois. De manière *in vitro*, l'évaluation de l'activité antioxydante peut se faire par le biais de méthodes antiradicalaires qui reposent sur la capacité de piégeage de radicaux libres tels que les ROS par des antioxydants. Par conséquent, cette activité antiradicalaire est un facteur de résistance biologique face à la dégradation du bois par le champignon lignivore. Dans le cas de cette thèse, les teneurs en composés phénoliques totaux du bois de 15 individus échantillonnés ont été déterminées puis leurs activités antiradicalaires ont été évaluées.

### 2. Extraction des polyphénols totaux

L'extraction des polyphénols totaux a été réalisée à partir du duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage, en 3 exemplaires analytiques. Un total de 45 extraits a ainsi été obtenu. Cette extraction s'est déroulée à partir de 50 mg de poudre de bois (granulométrie de 200 µm), en présence de 1,8 mL d'une solution préparée avec 800 mL de méthanol et 200 mL d'eau milliQ dans laquelle 25,2 mg de 6 méthoxyflavone ont été dissous (témoin interne en cas de quantification en HPLC-DAD). L'extraction a été réalisée selon le protocole de Boizot and Charpentier (2006). Tous les extraits sont conservés dans de l'eau ultra pure, à 4°C en vue de la quantification des polyphénols totaux.

### 3. Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques a été effectué selon le protocole de Boizot and Charpentier (2006) par le réactif de Folin Ciocalteu, en présence d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à  $75 \text{ g.L}^{-1}$  et des extraits en polyphénols totaux préparés à l'étape précédente. Le principe de la réaction repose sur la réduction des acides phosphotungstique et phosphomolybdique de couleurs jaunes, composant le réactif de Folin Ciocalteu, en tungstène et molybdène de couleurs bleues en présence de composés phénoliques. L'acide gallique a été

utilisé pour établir la courbe de calibration (Figure 32) constituée de 8 points de gammes : 0  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ , 12  $\mu\text{g/mL}$ , 15  $\mu\text{g/mL}$  et 20  $\mu\text{g/mL}$ . Toutes les absorbances ont été mesurées à 735 nm, à partir du lecteur de microplaques SAFAS Xenius XML (SAFAS Monaco).

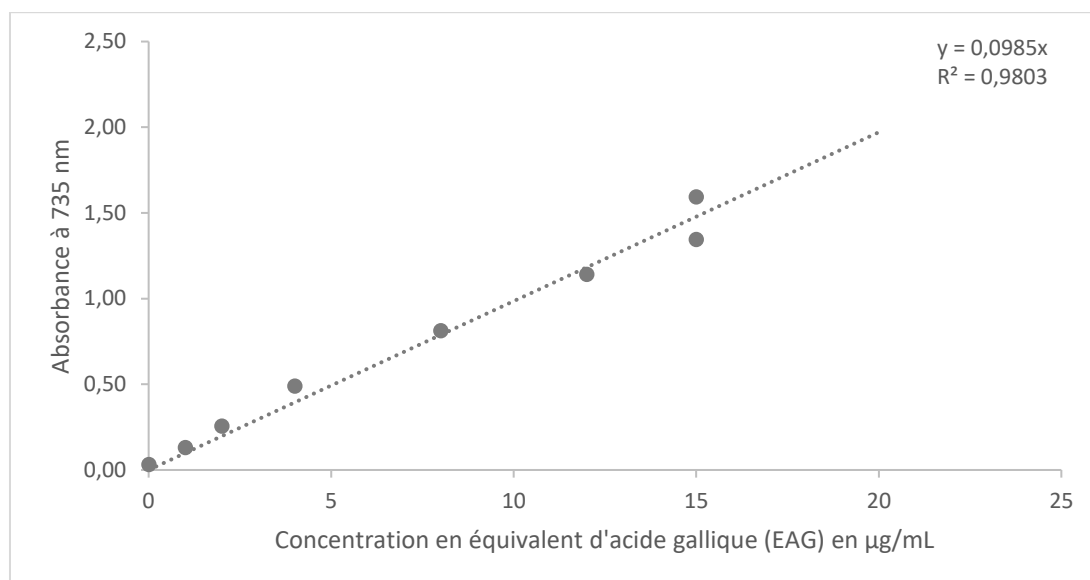


Figure 32: Courbe de calibration de l'acide gallique (absorbance à 735 nm)

#### 4. Mesure de l'activité antiradicalaire des extraits en composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques sont connus pour leur capacité à piéger les radicaux libres et donc pour leur activité antioxydante (Bruneton 2016). Cette activité est liée à la présence des groupements hydroxyles présents sur les composés polyphénoliques. Elle peut être mesurée en utilisant la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) avec le radical libre DPPH• (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) Figure 33), qui possède un électron non apparié sur l'atome d'azote au niveau du pont. La méthode au radical libre DPPH• est simple, stable et reproductible. Son principe repose sur la réduction du radical DPPH• de couleur violette, en présence de composés capables piéger les radicaux libres (R) tels que les polyphénols (ArOH) (Brand-Williams *et al.* 1995; Prior *et al.* 2005). La réaction de réduction s'accompagne d'une perte de couleur du radical libre DPPH• associée à une diminution de son absorbance. En effet, la quantité de DPPH restant dans le milieu réactionnel est proportionnelle à la concentration de composés capables de piéger les radicaux libres. La réduction du radical libre DPPH• repose sur deux mécanismes : par transfert d'hydrogène du composé piègeur de radicaux libres (ici,



les polyphénols) ou alors par transfert d'électron (Prior et al. 2005).

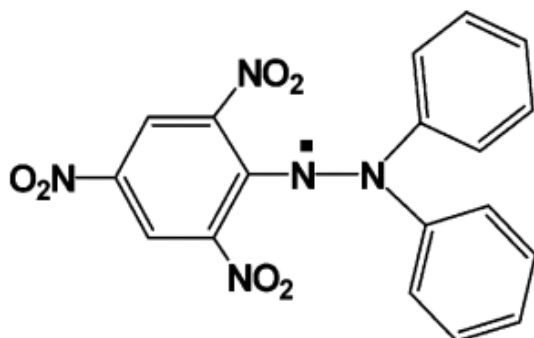


Figure 33: structure moléculaire du radical libre DPPH•

La méthode est standardisée par rapport au Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8 tétraméthylchroman-2-carboxylique) qui est capable de réduire le radical libre DPPH•. Cette méthode permet de déterminer la réduction relative du DPPH• en pourcentage d'inhibition. Le trolox, utilisé comme standard, est un analogue de la vitamine E (Figure 34).

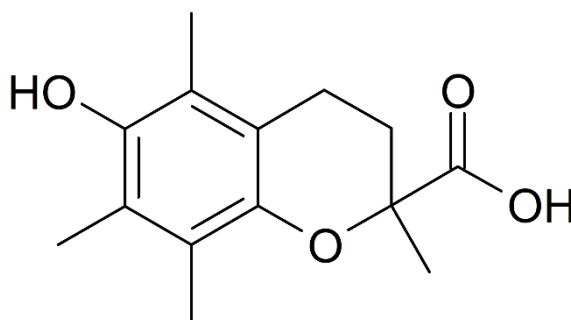


Figure 34: Structure moléculaire du Trolox

L'activité antiradicalaire des composés phénoliques totaux, présents dans les extraits de duramen externe des 15 individus échantillonnés, a été mesurée en présence du radical libre DPPH• de couleur violette. Une solution mère de Trolox à la concentration de 10 mM a été utilisée pour la réalisation des points de gamme dans le méthanol, à savoir 320 µM, 640 µM, 960 µM, 1280 µM et 1600 µM. La courbe d'étalonnage réalisée est présentée en Figure 35. La mesure de l'activité antiradicalaire a été adaptée selon la méthode décrite par Kordali *et al.* (2005).

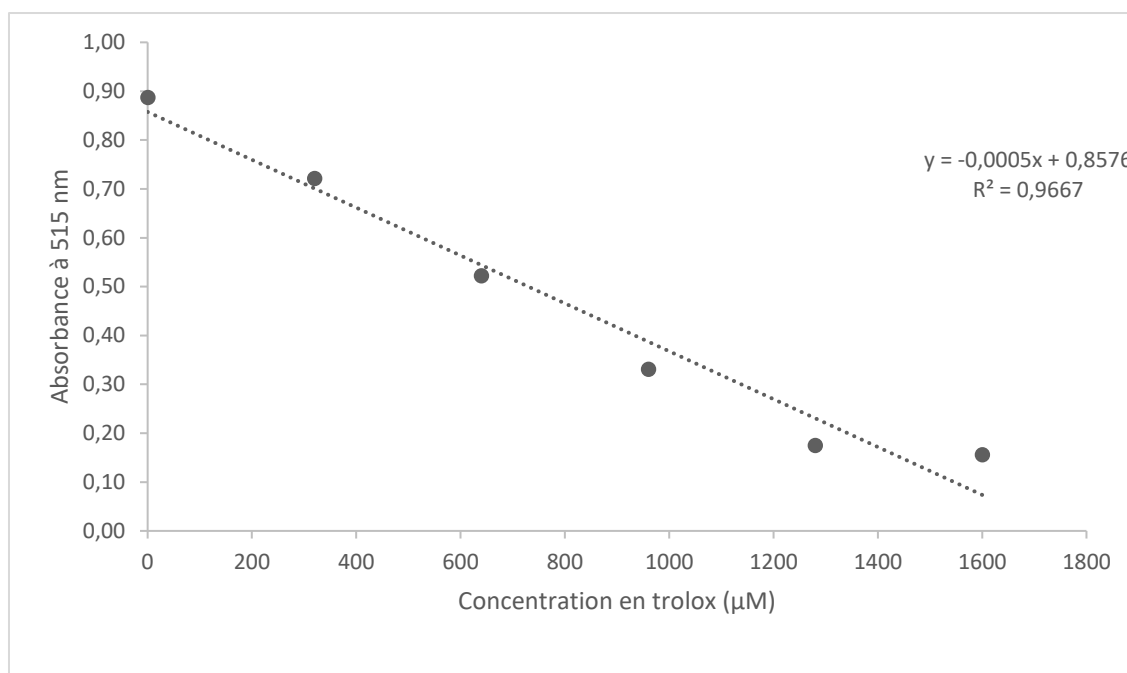


Figure 35: Courbe de d'étalonnage du Trolox à 515 nm

Tous les extraits ont été dilués au 1/8<sup>e</sup> dans le méthanol qualité HPLC. Un volume de 3,9 mL d'une solution de DPPH à 0,1 mM additionnés de 0,1 mL de l'extrait ou de la solution de Trolox sont d'abord agités au vortex (au moins 5 secondes) puis introduits dans des cuves. Le temps d'incubation est de 2 h à l'obscurité avant analyse. Les absorbances ont été mesurées à 515 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Varian Cary® 50 UV-Visible (Agilent).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'inhibition des radicaux libres en utilisant l'Équation 6 suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left( \frac{A-B}{A} \right) * 100$$

Équation 6: Calcul du pourcentage d'inhibition des extraits en composés phénoliques totaux ;

A : absorbance du contrôle négatif et B : absorbance de l'extrait ou du Trolox

Ce pourcentage d'inhibition montre la capacité de l'extrait à une concentration donné de réduire ou non le DPPH.

### III. Rôle des extractibles dans la durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores

Durant le processus de duraminisation, initié à partir des zones les plus internes de l'aubier, les extractibles sont synthétisés puis sont stockés dans le duramen nouvellement formé. Le duramen est généralement plus durable que l'aubier ce qui montre que l'acquisition de la propriété de durabilité naturelle, majoritairement due à la présence d'extractibles, se fait au

cours de la duraminisation. L'aubier possède pourtant des métabolites, mais ces derniers ne semblent pas jouer de rôle dans la durabilité naturelle. Pour mettre en évidence le rôle des extractibles de l'Angélique dans la durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores, deux tests biologiques ont été réalisés. Le premier test consiste à évaluer l'activité antifongique d'extraits préparés à partir de l'aubier et du duramen de l'individu A5, considéré comme normal. Un total de 4 extraits a été préparé, dont un extrait total de l'aubier et du duramen externe, afin de montrer l'impact de la duraminisation sur la résistance biologique d'un bois. Deux autres extraits ont été préparés à partir du duramen externe, à savoir les extraits alcaloïdiques totaux et en composés phénoliques totaux. La tryptamine pure a aussi été testée. Le second test biologique a permis d'évaluer le rôle des extractibles par délavage des éprouvettes de bois dans des solvants d'extractions. Ces deux tests ont été réalisés uniquement à partir de l'individu A5, présentant un développement normal comme l'atteste sa description architecturale. De plus, il est classé comme un bois durable à l'égard des champignons lignivores.

### 1. Evaluation de l'activité antifongique des extractibles par la méthode « broth microdilution »

Afin d'évaluer l'activité antifongique des métabolites du bois de l'Angélique, 4 extraits ont été préparés. Les extraits totaux d'aubier externe (P1) et de duramen externe (P2) ont été préparés à partir de 1 g de poudre (granulométrie de 200  $\mu\text{m}$ ). La poudre de bois a été extraite avec 200 mL d'un mélange ternaire de solvant composé de 50 % d'acétate d'éthyle et de 50 % d'une solution à base de méthanol/eau (80 :20). L'utilisation de solvants ayant différentes polarités favorise l'extraction de métabolites issus de plusieurs familles chimiques qui seront présents dans les extraits totaux. L'extraction s'est déroulée pendant 48 h à température ambiante (25°C) sous agitation magnétique (à 700 rpm) sur une plaque d'agitation orbitale. A l'issue de la macération, l'extrait a été filtré sur coton, concentré et séché à l'évaporateur rotatif, au concentrateur Speedvac™ (Savant SPD 121 P) et sous le vide d'une pompe à palette. L'extrait d'alcaloïdique total (P3) a été préparé selon la méthode d'extraction « one step » présentée dans la partie III de ce chapitre, à partir de 2 g de poudre (granulométrie de 200  $\mu\text{m}$ ) de duramen externe de l'individu A5. Enfin, l'extrait en composés phénoliques totaux (P4) à été préparé à partir de 2,5 g de poudre (granulométrie de 200  $\mu\text{m}$ ) de duramen externe de l'individu A5 qui ont été extraits avec 500 mL d'eau (milliQ) par reflux pendant 1 h. L'eau chauffée a été utilisée comme solvant pour permettre une extraction sélective des composés phénoliques et éviter la présence de métabolites issus d'autres familles chimiques notamment les alcaloïdes. L'extrait

recueilli a ensuite été lyophilisé pendant 24 h avec le lyophilisateur Labconco FreeZone® 2,5 L.

Pour évaluer l'activité antifongique de nos 4 extraits, il existe actuellement divers tests biologiques permettant qu'ils soient en mélange dans un extrait ou qu'ils soient purs. Dans le cas de cette thèse, le choix de la méthode d'évaluation de l'activité antifongique des extraits du bois de l'Angélique s'est porté sur la méthode de « broth microdilution », testé en milieu liquide. Cette méthode de microdilution, adaptée en microplaque de 96 puits, présente l'avantage d'être reproductible, de nécessiter de faibles quantités de solutions d'essais et de permettre l'évaluation en simultanée de plusieurs extraits ou métabolites isolés (Balouiri *et al.* 2016). La méthode de « broth microdilution » consiste à mettre en suspension la solution d'essai (préparée à partir des extraits ou d'un composé isolé) testée généralement à différentes concentrations, le milieu de culture et l'inoculum fongique. L'inhibition de la croissance du champignon peut être déterminée soit visuellement, soit par la mesure de la densité optique ou encore à l'aide de techniques de coloration, par comparaison avec un témoin exempt de solution d'essai. Lorsque les solutions d'essai sont testées à différentes concentrations, il est possible de déterminer leur CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). La CMI correspond à la plus faible concentration testée qui inhibe totalement la croissance du champignon.

Le mode opératoire du test biologique utilisé au cours de la thèse se décline en plusieurs étapes :

- Préparation de l'inoculum fongique

Deux souches de champignon dont une souche de pourriture cubique (*Gloeophyllum trabeum* Pers. Fr. Murr. BAM Ebw 109) et une souche de pourriture fibreuse (*Pycnoporus sanguineus* L. (Murrill) 270 (CTFT)) (mycothèque CIRAD), ont été cultivées sur milieu de culture malt agar (40 g d'extrait de malt, 20 g d'agar qsp 1 L d'eau milliQ) pendant 2 semaines. Ces souches ont servi à la préparation de l'inoculum fongique. Dans un premier temps, un volume de 10 mL d'eau distillée stérile a été déversé sur des boîtes de pétri contenant le mycélium, puis, à l'aide d'une spatule stérile, les mycéliums ont été décollés délicatement de la surface du milieu de culture afin d'être mis en suspension. La suspension obtenue a été ajustée par densitométrie à la plage d'unité McFarland de 2. Avant essai, la suspension a été diluée au 1/5<sup>e</sup> dans du milieu de culture malt liquide (40 g d'extrait de malt, 1 L d'eau milliQ).

- Préparation de la microplaque d'essai

Les extraits totaux d'aubier (P1) et de duramen (P2), d'alcaloïdes totaux (P3) et de composés

phénoliques totaux (P4) ainsi que la tryptamine commerciale (P5) et le kétoconazole (témoin négatif) ont tous été testés aux mêmes concentrations. Les extraits en alcaloïdes et en composés phénoliques totaux ont aussi été testés en combinaison dans les proportions respectives de 50 :50 (v/v) (P6), 40 :60 (v/v) (P7), 25 :75 (v/v) (P8) et 10 :90 (v/v) (P9) afin de simuler d'éventuels effets de synergie. Tous les échantillons (extraits secs et molécule pure) ont été solubilisés dans le DMSO à 50 mg/mL (solution mère). Dans le puits B2, 4 µL de la solution mère sont dilués dans 196 µL de milieu de culture malt liquide (dilution au 1/50<sup>e</sup>) afin d'obtenir une solution fille à 1000 µg/mL et à 2 % de DMSO. Par la suite, une dilution en cascade a été réalisée afin d'obtenir les concentrations de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL et 31 µg/mL. Enfin 100 µL de la solution d'inoculum fongique est rajouté dans les puits contenant 100 µL de la solution à tester, pour obtenir des concentrations finales de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL 31,2 µg/mL et 15,6 µg/mL.

Au total, 4 types de témoins différents ont été utilisés au cours de ce test : un témoin de milieu malt liquide seul permettant de s'assurer de la stérilité du milieu de culture, deux témoins positifs (un contenant du milieu de culture et du DMSO à 2% et un autre avec du milieu de culture et de l'eau milliQ) et un témoin négatif, le kétoconazole (pharmaceutical secondary standard ; CAS 65277-42-1, Sigma-Aldrich) connu pour ses propriétés antifongiques. Le plan de la microplaque d'essai est présenté en **Figure 36**.

- Incubation de la microplaque

La microplaque est incubée à l'obscurité pendant 72 h à 25°C. La lecture de la plaque se fait visuellement, par comparaison avec les puits contenant le témoin négatif dans lesquels aucune croissance du champignon n'a été observée (solution limpide).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML
B	ML	P1	P1	P2	P2	P3	P3	T-	T-	T+	T+	ML
C	ML	P1	P1	P2	P2	P3	P3	T-	T-	T+	T+	ML
D	ML	P1	P1	P2	P2	P3	P3	T-	T-	T+	T+	ML
E	ML	P1	P1	P2	P2	P3	P3	T-	T-	T+	T+	ML
F	ML	P1	P1	P2	P2	P3	P3	T-	T-	T+	T+	ML
G	ML	P1	P1	P2	P2	P3	P3	T-	T-	T+	T+	ML
H	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML	ML

Sens de dilution des produits à tester : de 500  $\mu\text{g/mL}$  à 15,6  $\mu\text{g/mL}$

Figure 36: Schéma d'une microplaque, montrant la répartition des extraits, des témoins positifs et négatifs, utilisée pour l'évaluation de l'activité inhibitrice à l'égard du champignon lignivore; ML (milieu de culture malt liquide) ; P1 (extrait aubier total) P2 (extrait duramen total) et P3 (extrait alcaloïdique total) aux concentrations de 500  $\mu\text{g/mL}$  à 15,6  $\mu\text{g/mL}$ ; T- (Kétoconazole) aux concentrations de 500  $\mu\text{g/mL}$  à 15,6  $\mu\text{g/mL}$ ; T+ violet (milieu de culture avec 2% de DMSO) et T+ en bleu milieu de culture avec de l'eau).

## 2. Mise en évidence de l'influence des extractibles par comparaison d'éprouvettes extraites et non extraites

Afin de comprendre l'influence des extractibles sur la durabilité naturelle de l'Angélique à l'égard d'*Antrodia vaillantii*, les pertes de masse issues d'éprouvettes extraites avec des solvants de polarités différentes ont été comparées avec des éprouvettes non extraites. Les éprouvettes ont été préparées à partir du duramen externe de l'individu A5, représentatif de l'échantillonnage, ayant pour dimensions 100\*10\*5 mm (L, R, T). Le faible rapport de surface par rapport au volume des éprouvettes favorise la colonisation du bois par la souche sélectionnée pour les essais. Les éprouvettes d'essais sont réparties en 6 lots de 10 éprouvettes, dont 2 lots qui sont utilisés comme éprouvettes témoins :

## Eprouvettes non extraites

- Lot 1 (n = 10) et lot 2 (n = 10) : Les éprouvettes ont été séchées à l'étuve à 60°C pendant 7 jours, ceci afin d'éviter une altération des métabolites thermosensibles. Au-delà de 60°C, une modification de la composition chimique des métabolites est possible et est fortement susceptible de modifier la résistance biologique du bois à l'égard du mycélium au cours du test.
- Lot 5 (n = 10) : Les éprouvettes témoins ont été séchées à 103° C pendant 48 h afin de déterminer la teneur en humidité ( $M_H$ ) (Équation 7) ainsi que la masse théorique anhydre (Équation 8) des éprouvettes des lots 1 et 2 avant essai ( $M_{théorique}$ ).

$$H = \frac{(m - m_0) * 100}{m_0}$$

### Équation 7: Calcul du taux d'humidité des éprouvettes d'essais

Avec  $H$  : taux d'humidité des éprouvettes de bois (%),  $m_H$  : masse humide des éprouvettes de bois (g) et  $m_0$  : masse anhydre des éprouvettes après 48 h à l'étuve à 103°C (g)

Une fois le taux d'humidité déterminé, il est possible d'accéder à la masse théorique anhydre des éprouvettes de bois avant essai (Équation 8):

$$m_{théorique} = m_H - (m_H * \frac{H}{100})$$

### Équation 8: Calcul de la masse théorique anhydre des éprouvettes d'essais

Avec  $m_{théorique}$  : masse théorique anhydre des éprouvettes de bois

## Eprouvettes extraites au Soxhlet

- Lot 3 (n = 10) et lot 4 (n = 10) : Les éprouvettes ont été extraites selon la méthode décrite par Kirker *et al.* (2013). Le protocole d'extraction des éprouvettes s'articule en 3 étapes. La première étape consiste à l'extraction des éprouvettes avec 300 mL de l'éthanol à 95° pendant 6 h, puis leur séchage pendant une nuit à température ambiante. Dans la seconde étape du protocole, les éprouvettes ont été extraites avec cette fois-ci 300 mL d'un mélange

de solvants composé d'éthanol à 95° et de toluène dans les proportions (2 :1 v/v) pendant 6 h. Les éprouvettes ont ensuite été séchées pendant une nuit à température ambiante. Enfin, les éprouvettes ont été placées dans 300 mL d'eau chaude (100°C) pendant 1 h. Cette dernière étape a été renouvelée deux fois. À l'issue de l'extraction des éprouvettes, ces dernières ont été séchées à 60°C pendant 7 jours.

- **Lot 6** : Les éprouvettes témoins ont été extraites conformément au protocole d'extraction employé pour les lots 3 et 4 puis séchées à 103°C pendant 48 h. Elles permettent la détermination du taux d'humidité ( $m_H$ ) (Équation 7) et de la masse anhydre théorique (Équation 8) des éprouvettes des lots 3 et 4 avant essai ( $m_0$ ).

### **Eprouvettes de références**

Des éprouvettes de références ( $n = 36$ ) préparées à partir de *Virola michelii* (espèce tropicale non durable, (EN 350, 2016)) ont aussi été utilisées afin de contrôler la virulence de la souche d'essai. Elles ont été séchées à 103°C pendant 48 h.

### **Stérilisation des éprouvettes d'essais et de référence**

Tous les lots d'éprouvettes d'essais (hormis les éprouvettes des lots 5 et 6) ainsi que les éprouvettes de référence ont été stérilisés aux rayons gamma avant exposition au champignon d'essai.

Après préparation des éprouvettes d'essai, ces dernières ont été soumises à l'action d'un champignon de pourriture cubique *Antrodia vaillantii* en boîte de pétri pendant 10 semaines. Cette souche tropicale a été choisie car le bois de *D. guianensis* présente une sensibilité plus grande à l'égard des champignons de pourriture cubique, comparativement aux champignons de pourritures blanches (Déon 1980). Les essais mis en place ont été adaptés de Royer (2008). Le mycélium datant de moins de 4 semaines a été cultivé sur du milieu malt agar (40 g d'extrait de malt, 20 g d'agar qsp 1 L d'eau milliQ) dans des boîtes de pétri de 15 cm de diamètre à l'obscurité. Les lots d'éprouvettes 2 et 4 ont été mis en contact avec le mycélium dans les boîtes de pétri contenant le milieu malt agar et les lots 1 et 3 ont été placés dans des boîtes contenant du milieu gélosé en absence du mycélium. Ces éprouvettes serviront à déterminer la perte de masse qui n'est pas due à la dégradation par le champignon.



Dans chaque boîte de pétri avec ou sans présence de la souche *Antrodia vaillantii*, 8 éprouvettes sont disposées sur des grilles stérilisés avec 5 éprouvettes de duramen externe et 3 éprouvettes de référence (Figure 37). Les boîtes sont incubées pendant 10 semaines à l'obscurité à 28 °C, avec une humidité relative de 65 %.

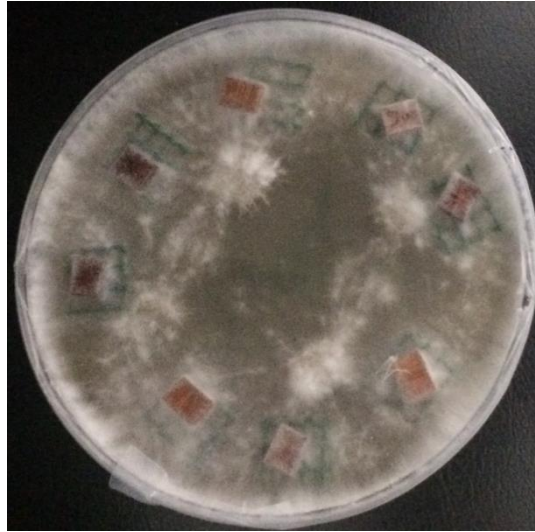


Figure 37: Photographie illustrant l'essai de durabilité naturelle avec les éprouvettes d'essai sur milieu malt-agar en présence de la souche *Antrodia vaillantii*

À l'issue de l'essai, les éprouvettes sont nettoyées individuellement, séchées à 103°C pendant 48 h et pesées avant ainsi qu'après l'étape de séchage. Les masses anhydres des éprouvettes après essais ( $m_1$ ) permettent de déterminer les pertes de masse absolues par le calcul comme indiqué par l'Équation 9 :

$$\text{pertes de masse (\%)} = \frac{(m_0 - m_1)}{m_0} * 100$$

Équation 9: Calcul de la perte de masse pour les éprouvettes d'essai

## **Partie 2 : Autres facteurs de durabilité naturelle**

### **I. Dosages de macromolécules**

Le dosage des macromolécules (lignines, cellulose et hémicelluloses) et des extractibles totaux a été réalisé par l'équipe d'Anne Clément Vidal, de l'Unité Mixte de Recherche Amélioration Génétique et Adaptation des plantes Méditerranéennes et Tropicales (AGAP) du Cirad. Tous les dosages ont été réalisés à partir du duramen externe (granulométrie de 200  $\mu\text{m}$ ) provenant des 15 individus de l'échantillonnage. Une étape préliminaire d'extraction des métabolites totaux présents dans la poudre de bois a été réalisée en amont du dosage des macromolécules. En effet, les extractibles peuvent induire un biais de mesure dans la quantification des macromolécules.

#### **1. Dosage des extractibles totaux**

Les extractibles du duramen externe ont été extraits à l'aide du Soxtec™ qui est un système d'extraction par solvant semi-automatisée. Quelques modifications ont été apportées sur ce système d'extraction. Des ballons de 2 L faits sur mesure ainsi que des chauffe-ballons adéquats et des colonnes réfrigérantes ont été adaptés sur cet appareil. Des cartouches de cellulose ont été utilisées pour l'extraction, dans lesquelles 2,5 g de poudre de bois (200  $\mu\text{m}$ ) ont été déposés. La poudre de bois a été séchée au préalable à l'étuve à 105°C pendant 2 h avant extraction. Dans les ballons de 2 L, un volume de 250 mL du solvant d'extraction a été introduit. Deux types d'extractions ont été effectués, avec une extraction par immersion de la poudre de bois (contenue dans la cartouche) dans le ballon une fois le solvant à ébullition, durant 30 min. La seconde extraction s'est déroulée par entraînement à la vapeur des extractibles, en disposant la cartouche à 1 cm au-dessus du solvant pendant une heure. La cartouche a été suspendue au-dessus du solvant à l'aide d'un fil. L'eau milliQ puis l'éthanol 95° ont été utilisés comme solvants d'extraction aux températures d'ébullition respectives de 100°C et 70°C. L'extrait récupéré dans le ballon a été concentré et séché à l'évaporateur rotatif et à l'étuve à 105°C pendant 2 h. Un seul extrait en extractibles totaux a été préparé par individu. De même, un seul dosage a été effectué par individu échantillonné (hormis l'individu A4) pour l'extrait total. Les résultats des dosages sont exprimés en pourcentage d'extraits par rapport à la masse sèche de la poudre de bois.

La poudre de bois extraite sera utilisée pour le dosage des lignines, de l'holocellulose (cellulose et hémicelluloses) ainsi que l' $\alpha$ -cellulose (phase insoluble de la cellulose). Un seul dosage a été effectué par individu de l'échantillonnage (hormis l'individu A4) et par type d'analyse, à savoir la mesure de la lignine, de l'holocellulose et de l' $\alpha$ -cellulose.

## 2. Dosage de la lignine Klason et de la lignine acide-soluble

Avant dosage de la lignine, la poudre de bois dépourvue de ses extractibles a été séchée à l'étuve à 105°C pendant 2 h. Le dosage de la lignine a été réalisé en milieu acide. La méthode de dosage se base sur l'insolubilité de la lignine dans un milieu acide concentré alors que les autres constituants pariétaux (cellulose et hémicelluloses) sont hydrolysés et dissous. Cette lignine insoluble, qui peut être estimée par méthodes gravimétriques, est aussi connue sous le nom de lignine Klason. Une petite partie de la lignine reste cependant soluble dans les acides ou lignine acide-soluble. Plusieurs étapes sont nécessaires pour permettre leur estimation dans le bois (Giger 1985; Monties 1984).

L'étape d'hydrolyse principale consiste à mettre en contact 5 mL d'acide sulfurique concentré à 72 % avec 360 mg de poudre de bois sèche puis de placer le mélange au bain marie à 20°C pendant 2 h. Le mélange est agité toutes les 10 minutes. Une étape de post hydrolyse a été réalisée, avec ajout de l'eau distillée jusqu'à obtenir une concentration en acide de 3% dans le mélange. Cette étape a pour but de favoriser la précipitation de la lignine acide-soluble. Le mélange a ensuite été placé à l'autoclave à 121°C pendant une heure pour permettre un lavage en profondeur du résidu. Afin de récupérer la lignine Klason, le mélange a d'abord été filtré sous vide et la lignine déposée sur le papier filtre a été séchée à l'étuve pendant 2 h à 105°C. Les résultats des dosages sont exprimés en pourcentage de lignine Klason en fonction de la masse sèche de la poudre de bois.

Le filtrat liquide, contenant la lignine acide-soluble a été conservé pour effectuer le dosage du composé au spectromètre UV.

## 3. Dosage de l'holocellulose

La méthode utilisée pour le dosage de l'holocellulose est celle décrite par Browing (1977) avec quelques modifications. Le dosage consiste à mettre en contact 1 g de la poudre de bois dépourvue d'extractibles avec 80 mL d'une solution tampon acétate de sodium (environ 6,2 g de NaOH, 17,8 mL d'acide acétique glaciale qsp 250 mL d'eau distillée) et 2 mL d'une solution de chlorite de sodium à 27 %. Le mélange précédemment formé est placé au bain marie à 76°C pendant 1 h, avec une agitation manuelle fréquente. Un volume de 2 mL de solution de chlorite de sodium à 27 % est ajouté à chaque heure dans le mélange maintenu au bain-marie. Au total, 6 mL sont rajoutés dans le mélange.

La solution de chlorite a été utilisée pour la délignification sélective du bois, avec la lignine qui se retrouve en solution. L'holocellulose, résidu solide, est constituée de cellulose et

d'hémicelluloses. Pour récupérer l'holocellulose, le mélange a été filtré puis rincé avec 300 mL d'eau distillée et 15 mL d'acétone pour obtenir une décoloration. Enfin, elle a été séchée à l'étuve pendant 2 h à 105 °C. Après avoir déterminé les teneurs en holocellulose, cette dernière a été conservée pour le dosage de l' $\alpha$ -cellulose. Les résultats des dosages sont exprimés en pourcentage d'holocellulose par rapport à la masse sèche de la poudre de bois

#### 4. Dosage de l' $\alpha$ -cellulose

L' $\alpha$ -cellulose a été obtenue à partir de l'holocellulose. Elle représente la phase insoluble de la cellulose en milieu alcalin. Pour ce dosage, toutes les étapes ont été réalisées au bain-marie à 20°C. La première étape a consisté à l'imbibition de 800 mg d'holocellulose avec 5 mL d'une solution de NaOH à 17,5 %. Puis, de petits volumes de la solution de NaOH (2,5 mL) ont été rajoutés régulièrement au mélange précédemment formé accompagnés d'une agitation manuelle de 5 min. Enfin, pour récupérer l' $\alpha$ -cellulose, le mélange obtenu précédemment a été filtré en présence de 50 mL d'une solution de NaOH à 8,3 %. L' $\alpha$ -cellulose déposée sur le filtre a été rincée deux fois à l'eau distillée.

Afin de neutraliser la soude encore présente dans l' $\alpha$ -cellulose, cette dernière a été rincée avec 7,5 mL d'acide acétique à 10 %. L' $\alpha$ -cellulose a aussi été rincée avec de l'eau milliQ jusqu'à l'obtention d'une couleur blanche. Enfin, elle a été séchée à l'étuve à 105°C pendant 2 h afin de déterminer sa teneur dans le bois. Les résultats des dosages sont exprimés en pourcentage de l' $\alpha$ -cellulose par rapport à la masse sèche de la poudre de bois.

## II. Mesure de l'infradensité

La densité du bois est définie par sa masse volumique (rapport entre la masse du bois et son volume) à une humidité donnée du bois. Les méthodes de mesure de densité sont directes, par mesure de la masse et du volume, par déplacement d'eau ou des dimensions des éprouvettes selon les trois plans (longueur, largeur et épaisseur) (Rajemison 2013). Le bois étant un matériau hygroscopique, la densité peut être mesurée pour différents états d'humidité des éprouvettes d'essais, par exemple, à 12% d'humidité, à l'état vert ou encore à l'état anhydre. Il existe une mesure particulière de la densité, à savoir l'infradensité qui est le rapport de la masse anhydre du bois sur un volume saturé en eau.

Dans le cas de cette thèse, la mesure d'infradensité a été réalisée afin d'évaluer son influence dans la résistance biologique à l'égard des champignons lignivores. Elle intègre de nombreuses propriétés du bois et permet une bonne estimation de la masse de la matière lignocellulosique (Chave *et al.* 2009). La mesure de l'infradensité a été réalisée avec précision par la méthode

du déplacement de la masse d'eau comme décrite par Williamson and Wiemann (2010). Cette méthode nécessite une immersion dans l'eau des éprouvettes de bois de petites dimensions dans un système sous vide. Idéalement, les éprouvettes sont mesurées à l'état vert ( $M_v$ ), dans un délai maximal de 24 h après abattage. Dans le cas de cette thèse, les éprouvettes ont d'abord été immergées pendant 10 jours dans un dispositif sous vide, afin de les saturer en humidité puis leurs masses saturées ont été mesurées ( $M_s$ ). La masse d'eau déplacée par l'éprouvette saturée en eau est ensuite mesurée ( $M_i$ ) à l'aide d'une balance équipée d'un kit de détermination de densité (Sartorius YDK). Les éprouvettes sont ensuite séchées à l'étuve pendant 48 h à 103°C, et les pesées sont réalisées à l'issue de cette durée, ceci afin de déterminer la masse anhydre ( $M_0$ ). Les mesures ont été effectuées à partir du duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage, avec une éprouvette par individu.

Toutes ces mesures donnent accès à l'infradensité par l'Équation 10 suivante :

$$\text{Infradensité (ID)} = \frac{M_0}{M_s - M_i} = \frac{M_0}{V_s}$$

Équation 10: Calcul de l'infradensité

Avec  $M_0$  : Masse anhydre,  $M_s$  : Masse saturée,  $M_i$  : Masse immergée et  $V_s$  : Volume saturé de l'éprouvette.

### **Partie 3 : Modèle explicatif de la durabilité naturelle chez l'Angélique**

Par l'étude des données bibliographiques (Etat de l'art, Partie 2), plusieurs facteurs impliqués dans la durabilité naturelle à l'égard de champignons lignivores ont pu être mis en évidence chez certains ligneux tropicaux et tempérés. Sur cette base, des facteurs ont été retenus pour expliquer la durabilité nature du bois de l'Angélique. Des données quantitatives relatives aux propriétés intrinsèques du duramen externe et à la structure de l'arbre ont été mesurées à partir du duramen externe ainsi que de l'arbre pour les 15 individus de l'échantillonnage :

Données intrinsèques au duramen externe	Données propres à l'arbre
Teneurs en extractibles totaux	Hauteur
Teneurs en composés phénoliques totaux	Diamètre à hauteur de poitrine
Activité antiradicalaire	Ratio H/D
Teneur en lignine Klason, lignine acide-soluble, en holocellulose et en $\alpha$ -cellulose	Proportion d'aubier et de duramen
Mesure de l'infradensité	

Un total de 13 variables explicatives a été déterminé grâce à ces données quantitatives. Chaque donnée a été mesurée en un seul exemplaire pour les 15 individus, excepté les teneurs en composés phénoliques totaux et l'activité antiradicalaire dont 3 mesures ont été réalisées par individu. Les teneurs en alcaloïdes totaux et en tryptamine, ayant été mesurées uniquement pour 9 individus de l'échantillonnage, n'ont pas été retenues comme variable explicatives.

#### **I. Réduction du nombre de covariables**

Le nombre de covariables étant beaucoup trop important par rapport au nombre d'individus, il était nécessaire d'évaluer la dépendance des covariables entre elles. Deux analyses ont été utilisées pour décrire ces dépendances, une matrice de corrélation et une Analyse en Composante Principale (ACP). L'objectif est de sélectionner les covariables non corrélées entre elles ou peu corrélées permettant de conserver le maximum de variabilité des 13 covariables pour établir le modèle explicatif. La sélection se base sur la valeur des intensités de la corrélation entre ces covariables, déterminée par les coefficients de corrélations. Dans la matrice, seules les corrélations significatives ( $p$  value < 0,05) seront présentes. La matrice de corrélation a été réalisée sous R (<https://www.r-project.org/>) (R Core Team 2016) à l'aide du package `corrplot` (<https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/vignettes/corrplot-intro.html>).

Alors que la matrice de corrélation permet une comparaison deux à deux des variables significatives, le cercle de corrélation de l'ACP permet de visualiser les relations entre toutes les covariables en simultanée. Il permet aussi de déterminer celles qui sont importantes pour les deux premières composantes principales (PC1 et PC2). Le graphique a été réalisé sous R (<https://www.r-project.org/>) (R Core Team 2016), à l'aide des packages FactoMineR (<https://cran.r-project.org/web/packages/FactoMineR/index.html>) et factoextra (<https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html>) qui sont utilisés pour l'analyse de données multivariées.

## II. Construction du modèle explicatif de la durabilité naturelle

Plusieurs modèles linéaires avec et sans effets aléatoires ont été construits à partir des covariables sélectionnées par la matrice de corrélation et l'ACP. Le critère utilisé pour la sélection du modèle le plus performant est le critère AIC (Akaike Information Criterion). Ce critère se définit de la manière suivante (Équation 11):

$$AIC = -2 * \text{LogLik} + 2 * K$$

### Équation 11: Calcul du critère de sélection AIC

Avec LogLik :log-vraisemblance des paramètres associés aux données et K : nombre de paramètre indépendant dans le modèle.

Il permet de mesurer la qualité du modèle statistique : le meilleur modèle est celui pour lequel la valeur du critère est la plus faible. Plusieurs stratégies permettent de tester toutes les combinaisons possibles en covariables significatives afin de proposer le meilleur modèle basé sur le critère AIC :

- La procédure ascendante ou forward, avec une variable ajoutée à chaque étape de la construction du modèle
- La procédure descendante ou backward durant laquelle toutes les variables de départ sont prises en compte et à chaque étape, la variable qui induit une valeur plus importante en AIC est éliminée
- La procédure mixte ou both avec des variables qui sont éliminées après chaque étape d'ajout de variables, afin de retirer du modèle les éventuelles variables devenues moins indispensables suite à l'ajout de nouvelles.

Les modèles linéaires ont été réalisés sous R (<https://www.r-project.org/>) (R Core Team 2016) à l'aide des deux packages nlme (<https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>) et

MASS (<https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/index.html>).



## Résultats

### *Partie 1 : Rôle des extractibles*

#### **A. Etude métabolomique par une approche non ciblée**

##### **I. Sélection de potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle du duramen de l'Angélique**

L'évaluation du rôle des extractibles dans la durabilité naturelle a été réalisée au cours d'une étude métabolomique par spectrométrie de masse selon une approche non ciblée. Par cette analyse, il est possible de comparer les spectres de masses des duramens externes issus des 15 individus de l'échantillonnage à l'aide de méthodes statistiques multivariées, la PLS-DA dans le cas présent. La comparaison a été réalisée en fonction de deux variables catégorielles : le « type architectural », (plantation, normal et sénescence), critère de sélection des individus et leurs classes de durabilité naturelle. Une troisième variable catégorielle a été évaluée, à savoir le type de tissu ligneux. Le modèle établi par la PLS-DA permet aussi de sélectionner les potentiels biomarqueurs qui supportent les différences observées entre le duramen des 15 individus de l'échantillonnage par le biais du VIP score. Ainsi, il est possible de mesurer la contribution de ces potentiels biomarqueurs dans le modèle de PLS-DA, qui sont listés par ordre d'importance et quantifiés de manière relative (code couleur en fonction des teneurs relative). Des mesures de p-value ont été effectuées pour les 15 potentiels biomarqueurs proposés par le modèle, afin de vérifier leur significativité (ANOVA et t-test en fonction du nombre de groupe à comparer). Les métabolites identifiés dans le bois de l'Angélique par Anouhé (2017) ont été pris en compte dans cette analyse multivariée. La performance du modèle est évaluée par certains critères notamment le  $Q^2$  qui doit être proche de 1. Ce critère indique que la discrimination entre deux groupes est performante et assure la fiabilité des potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle proposés par le modèle (Szymańska *et al.* 2012).

## 1. Par type architectural

Les résultats du modèle de PLS-DA établi en fonction de la variable « type architectural » à partir du duramens externe des 15 individus sont présentés en **Figure 38**. L'analyse des résultats montre que les individus normaux et de plantations se regroupent dans un même cluster tandis que le groupe constitué par les individus sénescents se détache des deux autres groupes architecturaux. Le modèle de PLS-DA explique près de 30,3 % de la variabilité à partir des deux premières composantes principales. Dans le cas du modèle de PLS-DA défini pour la variable « type architectural », la valeur du  $Q^2$  est négative. Par conséquent, le modèle n'est pas performant pour la discrimination des différents groupes architecturaux.

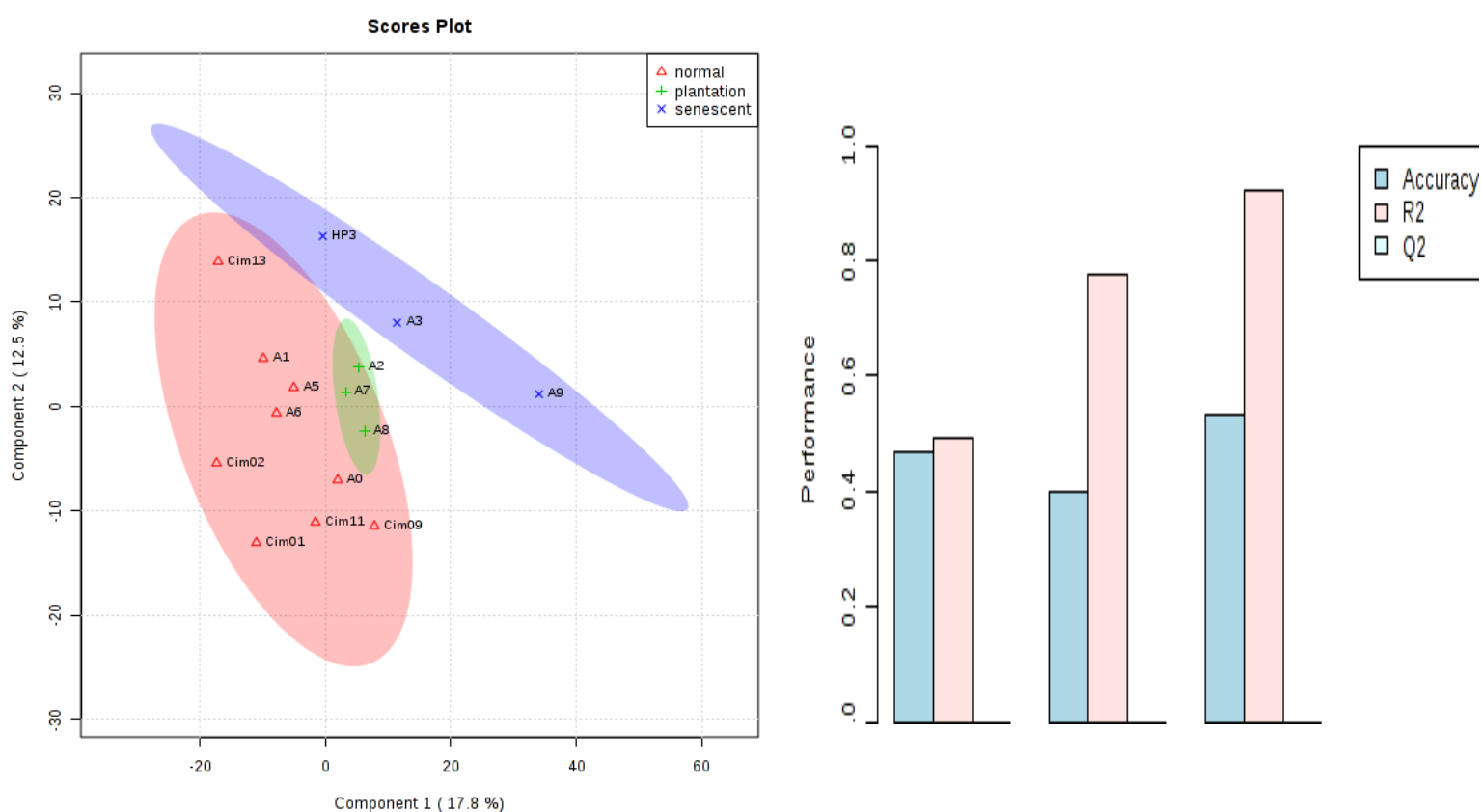


Figure 38: Score plot de l'analyse de PLS-DA obtenu avec la variable catégorielle

Une liste de 15 ions moléculaires correspondant à des potentiels biomarqueurs a été générée par le modèle PLS-DA (**Figure 39**). Cependant, l'analyse ANOVA révèle que la répartition des 15 métabolites présents chez les 3 groupes architecturaux n'est pas significative et ne permet pas d'expliquer la variabilité entre ces groupes. L'analyse du plot révèle que ces potentiels biomarqueurs listés sont tous présents chez les 3 individus sénescents à de faibles teneurs relatives par comparaison aux individus des deux autres groupes architecturaux. Cette

observation pourrait expliquer les résultats du score plot sur lequel les individus des groupes sénescents se détachent des autres groupes. Dans le cas des groupes d'individus normaux et de plantations, les teneurs relatives de ces biomarqueurs varient aléatoirement entre ces deux groupes. La comparaison des spectres de ces 15 ions avec ceux disponibles dans les bases de données n'a pas permis de proposer une structure moléculaire pour ces masses moléculaires. Leurs poids moléculaires varient entre 500 et 1000 Da, à l'exception d'un ion de masse 282,37 Da.

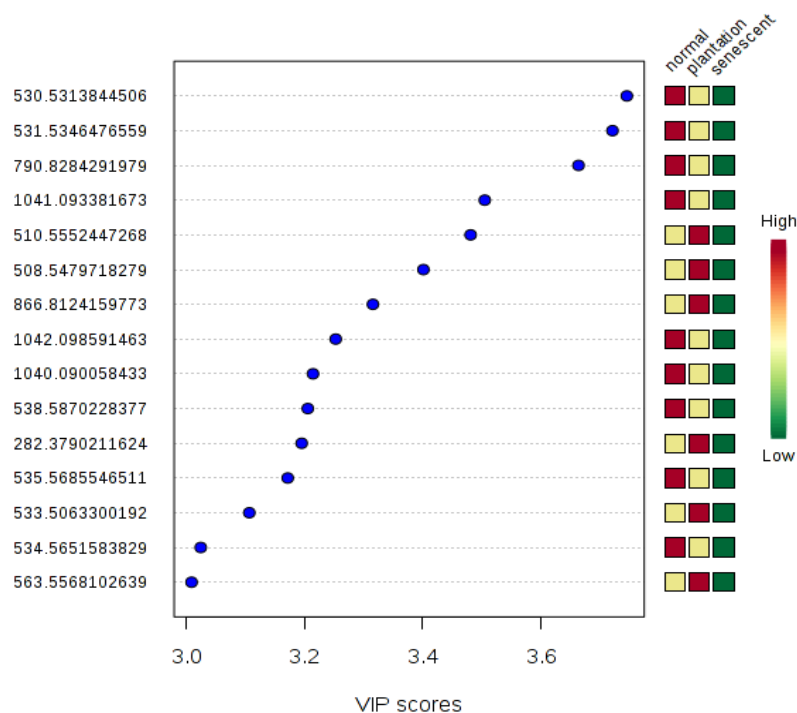


Figure 39: Plot du VIP score du modèle de PLS-DA obtenu avec la variable catégorielle « type architectural »

## 2. Par classe de durabilité naturelle

Dans le cas du duramen externe des 15 Angélique de l'échantillonnage, trois classes de durabilité naturelle ont été identifiées : classe 1 (très durable), classe 2 (durable) et classe 3 (moyennement durable). Les résultats du modèle de PLS-DA qui a été établi en fonction de cette variable sont présentés en Figure 40. L'analyse des résultats montre que les clusters des classes de durabilité naturelle 1 et 2 se recouvrent tandis que le cluster des individus de classe 3 se détache légèrement des deux autres. Le modèle de PLS-DA explique près de 34,8 % de la variabilité à partir des deux premières composantes principales. Dans le cas du modèle de PLS-

DA défini pour la variable « classe de durabilité naturelle », la valeur de  $Q^2$  est aussi négative. Par conséquent, le modèle n'est pas performant pour la discrimination des différents groupes de durabilité naturelle.

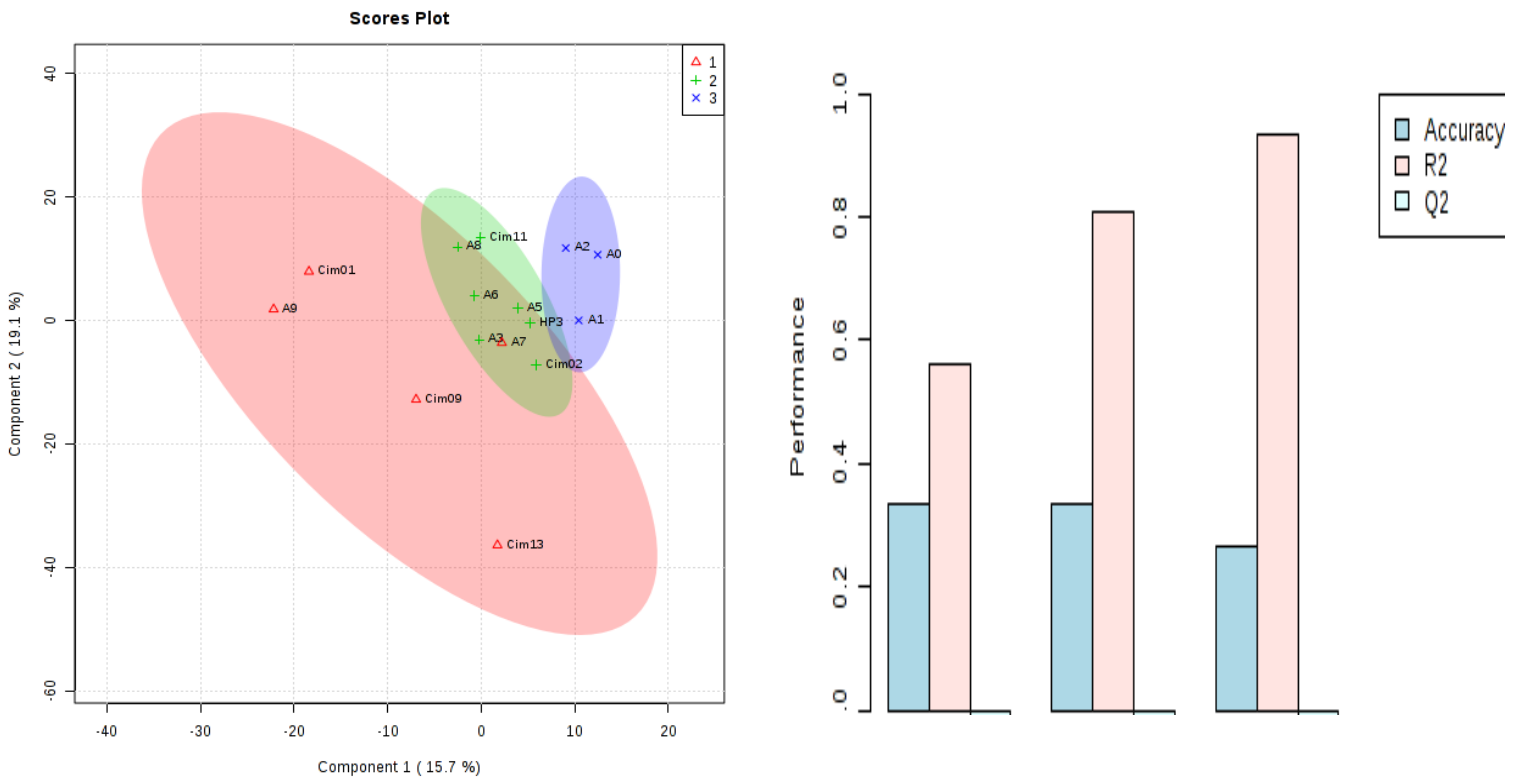


Figure 40: Score plot du modèle de PLS-DA obtenu avec la variable « classe de durabilité naturelle » pour le duramen externe des 15 individus et les résultats de cross-validation du modèle

Aucune des masses moléculaires, présentées en Figure 41 n'a pu être identifiée dans cette analyse. De plus, le test ANOVA, réalisé sur les 15 masses moléculaires listées par le modèle, montre que leur répartition dans les différentes classes de durabilité n'est pas significative ( $p > 0,05$ ) et de ce fait, elles n'expliquent pas les différences observées entre les 3 classes de durabilité. L'analyse du plot révèle que les individus de classe 1, les plus durables, ne sont pas ceux qui présentent les plus fortes teneurs relatives en métabolites : 10 des 15 potentiels biomarqueurs sont présents dans des faibles teneurs relatives. Les teneurs relatives de ces métabolites seraient plus importantes dans les groupes de classe 2 et 3, et leur répartition semble aléatoire entre les deux classes. La liste des potentiels biomarqueurs est différente de celle

proposée dans le cas du modèle pour le type architectural, ce qui laisse supposer que les métabolites impliqués ne sont pas les mêmes en fonction de la variable catégorielle.

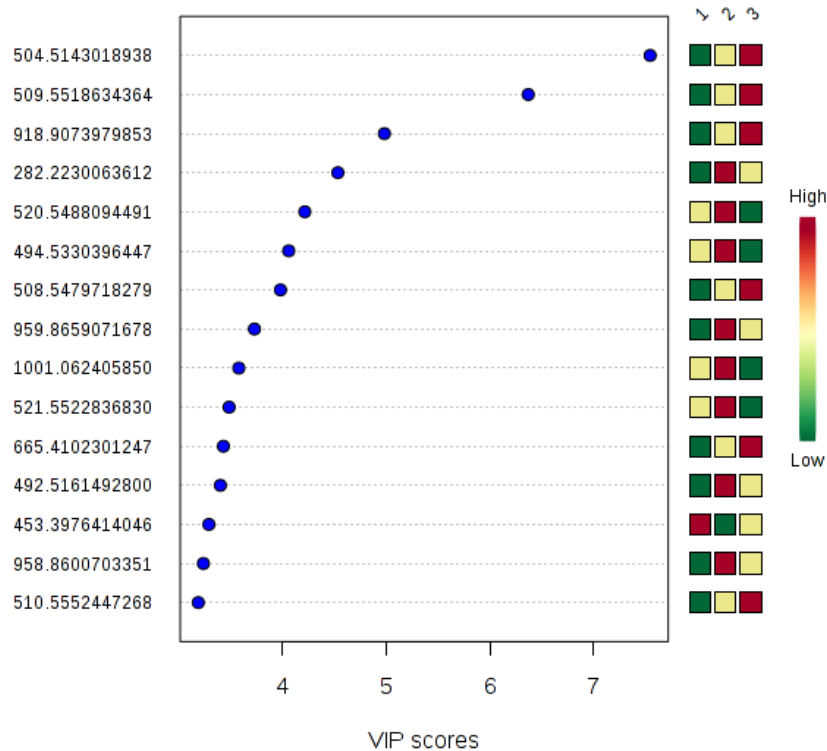


Figure 41: Plot du VIP score du modèle de PLS-DA obtenu avec la variable "classe de durabilité"

### 3. Par type de tissu : duramen externe VS aubier externe

Les modèles de PLS-DA précédemment présentés ne sont pas performants comme en atteste la valeur du  $Q^2$ . Un autre modèle a été réalisé à partir du duramen externe (tissu duraminisé) et l'aubier externe (tissu non duraminisé). Ces deux types de tissus étant contrastés, la variabilité observée entre ces deux tissus pour l'ensemble des individus devrait être plus importante qu'au sein d'un même tissu. Les résultats, présentés en Figure 42, montrent effectivement que les clusters représentant les deux types de tissus sont nettement séparés. Le modèle de PLS-DA explique 58,8 % de la variance à partir des 5 composantes principales du modèle. Le modèle est performant comme en témoigne la valeur du  $Q^2$  de 0,7 ce qui indique que l'analyse métabolomique par spectrométrie de masse peut être utilisée pour discriminer ces deux types de tissus ligneux chez l'Angélique.

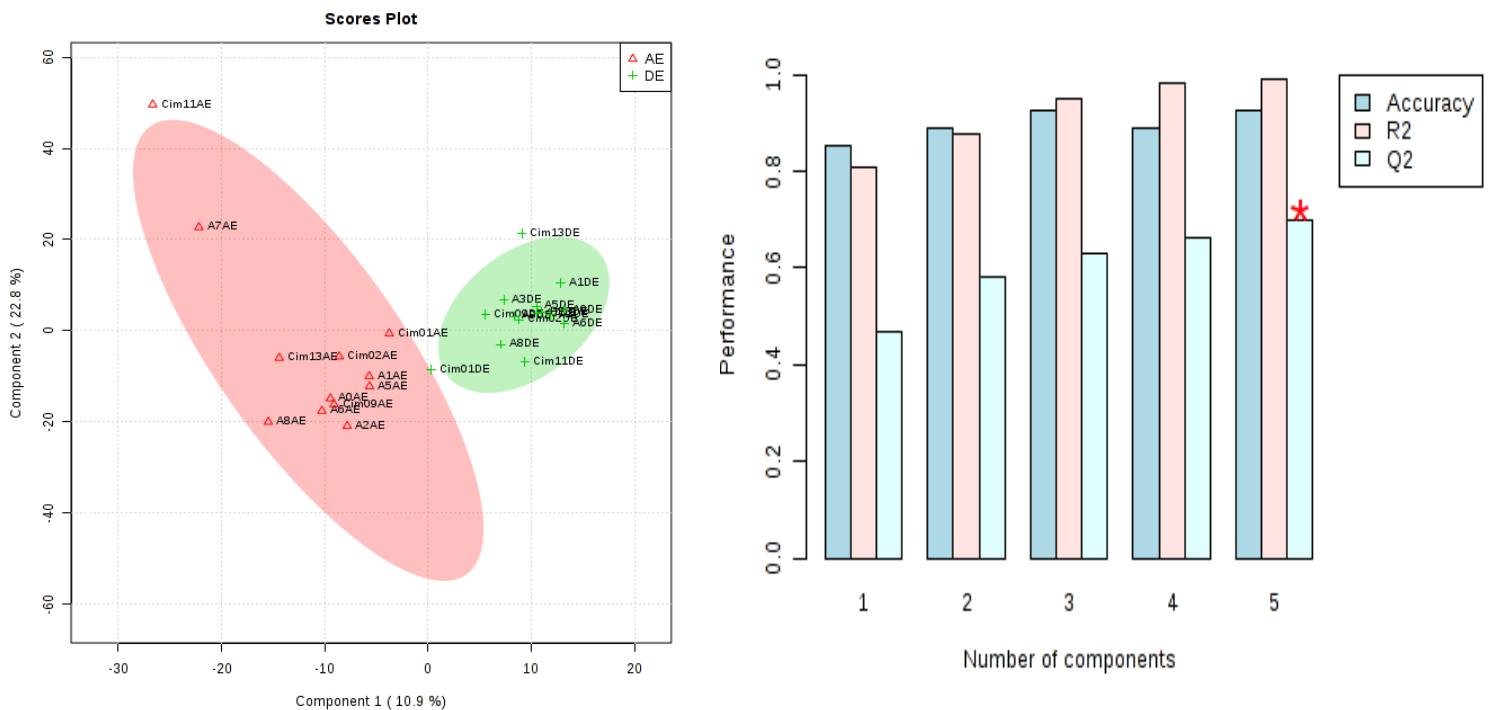


Figure 42: Score plot du modèle de PLS-DA obtenu avec la variable « type de tissu » pour le duramen et aubier externe des 15 individus et le plot de la cross-validation du modèle

Le modèle de PLS-DA propose une liste de 15 ions moléculaires comme potentiels biomarqueurs (Figure 43), dont leur présence au sein des tissus de l'aubier et du duramen externe est significative ( $p < 0,05$ ). Parmi ces 15 masses importantes pour le modèle, la masse correspondant à la tryptamine est la seule qui a pu être identifiée. Les teneurs relatives en tryptamine sont beaucoup plus importantes dans le duramen que dans l'aubier. La présence de la tryptamine est significative ( $p < 0,05$ ) dans le duramen et peut être plutôt considérée comme un biomarqueur de duraminisation mais aussi potentiellement comme un biomarqueur de durabilité naturelle dans ce cas présent. La répartition des potentiels biomarqueurs est donc significativement propre à un type de tissu. Dans le cas de l'aubier ces masses peuvent correspondre à des précurseurs et dans le duramen, ils sont susceptibles de jouer un rôle dans la durabilité naturelle.

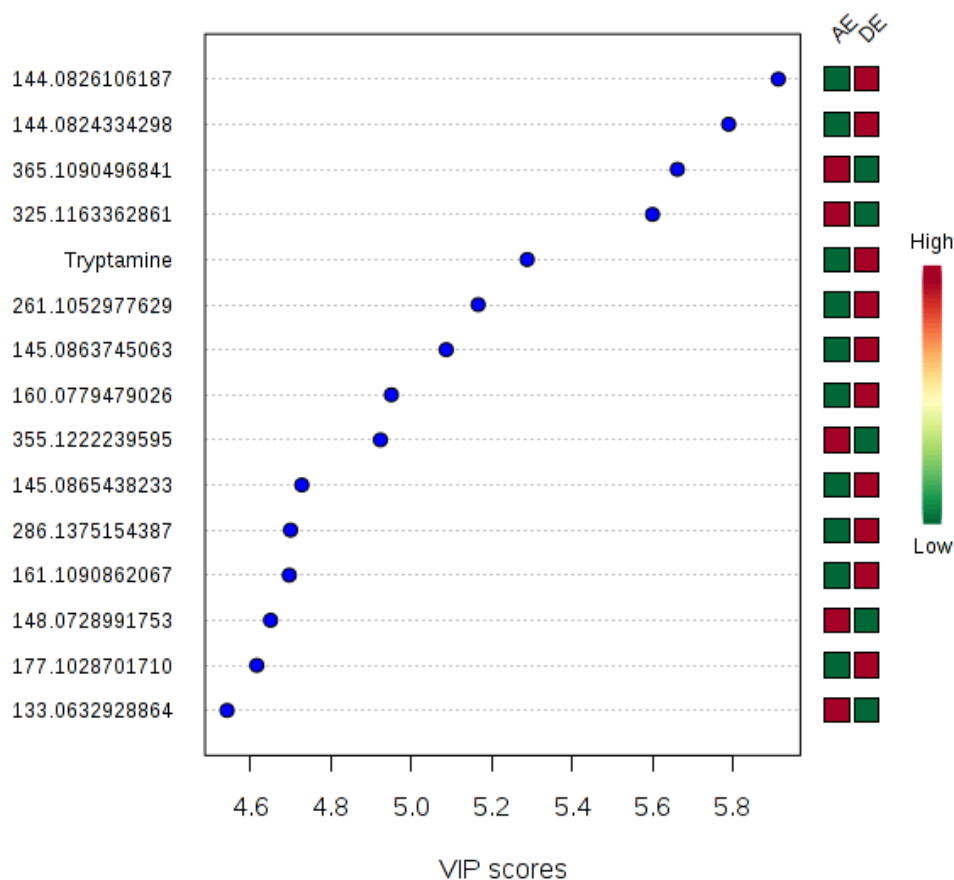


Figure 43: Plot du VIP score pour le modèle de PLS-DA établi à partir de la variable "type du tissu" pour l'aubier et duramen externe

En conclusion, les résultats de cette analyse métabolomique par spectrométrie de masse sont en accord avec ceux présentés dans le chapitre 1, c'est-à-dire que la variabilité entre les duramens externes des individus de l'échantillonnage n'est pas significative, car beaucoup trop faible. Il est difficile d'expliquer les différences de durabilités naturelles observées en employant des outils de pointe en chimie analytique et des analyses statistiques. De ce fait, aucun biomarqueur chimique n'a pu être identifié et caractérisé. De plus, la sélection des individus sur la base de critères architecturaux permet d'avoir accès à une variabilité inter individuelle de la durabilité naturelle cependant cette dernière est indépendante des groupes architecturaux. L'absence de lien entre le type architectural et la durabilité naturelle compromet l'utilisation de la métabolomique pour séparer les individus aux durabilités naturelles contrastées selon leur profil chimique.

En revanche, en comparant les spectres du duramen externe avec ceux de l'aubier externe, il

est possible de dissocier le type de tissu par une analyse métabolomique de spectrométrie de masse permettant ainsi de générer une liste d'ions corrélés à la durabilité naturelle. Toutes les masses détectées dans le duramen externe aux teneurs significativement plus importantes que dans l'aubier externe peuvent alors être proposées comme potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle du bois de l'Angélique : c'est le cas de la tryptamine et des 9 autres masses de métabolites sélectionnés par le modèle, dont les structures moléculaires restent à identifier.

## II. Stratégie de déréplication pour l'identification structurale de potentiels biomarqueurs

### 1. Réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires sont générés à partir de spectres  $MS^2$  sur la plateforme en ligne de GNPS et peuvent constituer un outil puissant dans les stratégies de déréplication. Les spectres acquis au cours de l'analyse métabolomique sont comparés aux spectres présents dans les bases de données spectrales, afin d'identifier les métabolites connus qui ont été détectés dans les extraits du duramen de l'Angélique. Les réseaux générés pourront être annotés avec les ions identifiés et permettent également d'évaluer et de visualiser la diversité chimique des métabolites du duramen en plus de favoriser la découverte de métabolites analogues. Dans un réseau, la présence d'un cluster de deux nœuds (node) correspond à deux ions qui possèdent un profil de fragmentation proche, c'est-à-dire qu'ils partagent des fragments identiques et cette similarité correspond à une valeur (cosine score) qui va définir la distance et la taille de la connexion. Les métabolites seront donc regroupés par famille chimique formant ainsi un réseau moléculaire dont la taille dépend du nombre de nœuds présents. Si la structure chimique d'un ion, présent dans un réseau moléculaire, est connue des bases de données de la plateforme GNPS ou si le composé est injecté comme standard pur dans le spectromètre de masse, il pourra être directement annoté dans le réseau. Les réseaux moléculaires ont été générés à partir des extraits de duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage.

À partir de ces réseaux, il est possible de connaître la répartition de ces masses moléculaires au sein des 3 classes de DN : la couleur violette des nœuds indique que les masses moléculaires ont été retrouvées chez les individus appartenant aux 3 classes de durabilité naturelle, en rose les masses moléculaires présentes chez les individus appartenant aux classes de durabilité 1 et 2 et en orange, les individus des classes de durabilité 2 et 3 (Figure 44). Les résultats montrent qu'il n'existe pas de réseau moléculaire propre à une classe de durabilité naturelle et donc, que



la répartition des masses moléculaires est homogène au sein des 3 classes de durabilité naturelle. L'analyse de l'ensemble des réseaux moléculaires révèle également qu'aucun nœud n'a été annoté, et donc qu'aucune masse moléculaire, présente dans ces réseaux, n'est connue de la base de donnée spectrale de la plateforme GNPS (Figure 44). Cette stratégie ne permet donc pas d'apporter de nouvelles informations pour l'identification de biomarqueurs de durabilité naturelle de l'Angélique.

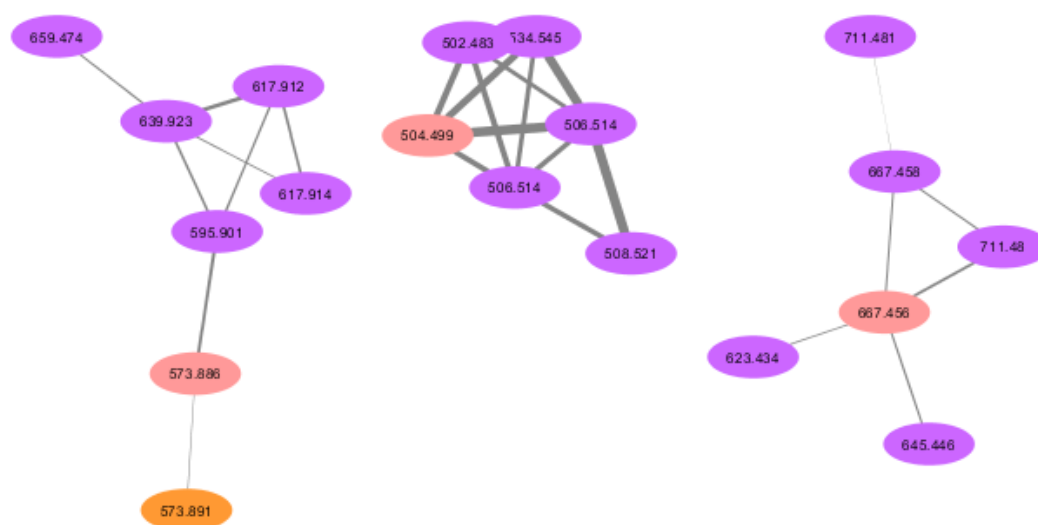


Figure 44: Exemple de réseaux moléculaires construits à partir de spectres MS<sup>2</sup> ; en violet : ions présents chez les individus de 3 classes de durabilité naturelle, en rose : ions présents chez les individus de classes 1 et 2 et en orange : ions présent chez les individus de classes 2 et 3 ; en gris : liaison entre les nœuds, largeur du nœud proportionnelle à la valeur du cosinus score

Néanmoins, après comparaison des spectres MS<sup>2</sup> avec ceux disponibles dans les bases de données de la plateforme GNPS, un total de cinq ions a pu être identifié dans le duramen externe des 15 individus de l'Angélique bien qu'aucun de ces ions ne faisaient partis d'un réseau moléculaire. Ces ions identifiés sont des composés phénoliques, de la famille des flavonoïdes : catéchine, l'épicatéchine, la quercétine (3, 5, 7, 3', 4' pentahydroxyflavanone) et la procyanidine B2. La catéchine ainsi que l'épicatéchine ont déjà été identifiées précédemment dans l'Angélique (Anouhé 2017). Une vérification s'avère nécessaire pour confirmer la présence de la quercétine ainsi que la procyanidine B2 dans le duramen. Cette vérification peut s'effectuer en HPLC-DAD par exemple, en présence d'un extrait en flavonoïdes totaux et des réactifs commerciaux des deux métabolites. L'ion [M+H]<sup>+</sup> de la tryptamine (161 m/z) a aussi

été détecté dans le duramen externe, ce qui corrobore avec l'ensemble des données bibliographiques (Anouhé *et al.* 2015 ; Déon 1980; Vanbellinghen *et al.* 2016). Mis à part la tryptamine, qui a déjà été identifiée comme potentiel biomarqueur, la masse moléculaire des 4 flavonoïdes identifiés ne coïncide avec aucun autre métabolite proposé dans l'analyse de PLS-DA reposant sur le type de tissu ligneux (Figure 43).

Dans notre cas, cinq masses moléculaires ont pu être identifiées, ce qui reste assez faible par comparaison au nombre de métabolites détectés dans le bois de l'Angélique au cours de l'analyse. Une seconde approche a été employée dans cette thèse pour les alcaloïdes indoliques minoritaires. Elle permet l'identification structurale par l'isolement et la caractérisation chimique d'un plus grand nombre de métabolites afin d'identifier plus de structures moléculaires pour enrichir les bases de données existantes.

## 2. Identification structurale de trois alcaloïdes indoliques

Le bois de l'Angélique renferme de nombreux composés alcaloïdiques qui sont susceptibles d'être de potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle, comme la tryptamine. Mais ces métabolites restent encore largement méconnus. Afin de les caractériser, 1,03 g d'un extrait alcaloïdique préparé à partir du duramen externe de l'individu A4 (représentatif de l'échantillonnage) a été séparé en quatre fractions (Fraction A, B, C et D). Un total de 38 alcaloïdes indoliques a pu être détecté à partir de 84 mg de la fraction D. Cependant, seulement trois composés ont pu être identifiés par spectroscopie RMN (600 MHz), notamment en RMN 2D (HSQC, HMBC et COSY) pour permettre l'élucidation structurale complète et par spectrométrie de masse afin de confirmer la structure chimique du métabolite. Le pouvoir rotatoire n'a été mesuré pour aucun des composés isolés. Les ions moléculaires des 3 métabolites identifiés ont aussi été détectés dans le bois des 15 individus de l'échantillonnage à l'aide des spectres MS<sup>2</sup> acquis aux cours des analyses métabolomiques, mais aucun n'est inclus dans un cluster d'un réseau moléculaire.

- Description du *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]formamide

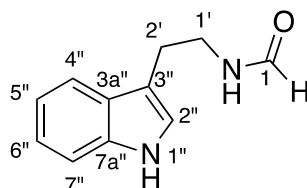


Figure 45: Structure moléculaire du composé *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]formamide

L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution du premier composé (Figure 45) ( $[M+H]^+$  189,1021) indique une formule brute possible  $C_{11}H_{12}ON_2$ . Cet alcaloïde minoritaire à noyau indole a pu être identifié par l'analyse des spectres RMN ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , gHSQC et HMBC) (Annexe 1), dont les données sont indiquées dans le Tableau 8 et par comparaison avec les données de la littérature. Les déplacements des protons aromatiques du noyau indole sont similaires à ceux de la tryptamine : deux doublets à 7,56 ppm et 7,33 ppm ; un singulet à 7,09 ppm ; deux triplets à 7,08 ppm et 7,00 ppm. À la différence de la tryptamine, l'éthanamine du composé est substituée par un aldéhyde au niveau de l'amine primaire. Le déblindage du proton à 8,21 représenté par un singulet confirme la présence de l'aldéhyde (163,5 ppm, C1).

Tableau 8: Déplacements chimiques et couplages homonucléaires et hétéronucléaires dans le méthanol- $d_6$  pour le *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]formamide

Position	$^1H$ : $\delta$ (ppm) ; multiplicité ; J (Hz)	$^{13}C$ : $\delta$ (ppm) d'après les analyses HSQC; mult.	HMBC ( $^1H \rightarrow ^{13}C$ )
1	8,21 ; s ; 1H	163,5 ; CH	C1'
1'	3,53 ; t ; J =7,3 Hz; 2H	39,7 ; CH2	C1, C2', C3'',
2'	2,96 ; t ; J = 7,3 Hz; 2H	26,0 ; CH2	C1', C2'', C3'', C3a''
1''			
2''	7,09 ; s ; 1H	123,2 ; CH	C3'', C3a'', C7a''
3''		112,7 ; C	
3a''		128,5 ; C	
4''	7,56 ; dt ; J =7,9 ; 1,0 Hz; 1H	119,0 ; CH	C5'', C7a''
5''	7,00 ; ddd ; J =7,9 ; 7,0 ; 1,0 Hz ; 1H	119,4 ; CH	C7'', C3a''
6''	7,08 ; ddd ; J = 8,2 ; 7,0 ; 1,2 Hz ; 1H	122,1 ; CH	C4'', C7a''
7''	7,33 ; dt ; J = 8,2 ; 0,9 Hz; 1H	112,0 ; CH	C5'', C3a''
7a''		138,0 ; C	

- **Description du composé *N*-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]- 1H-indole-3-carboxamide**

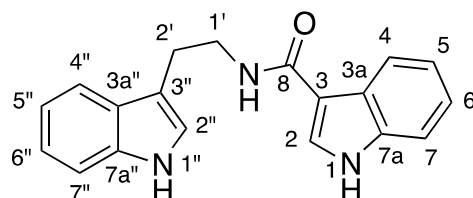


Figure 46: Structure moléculaire du *N*-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]- 1H-indole-3-carboxamide isolé (2)

La formule brute du second composé (Figure 46) proposée par la masse de haute résolution ( $[M+H]^+$  304,1439) est  $C_{19}H_{17}ON_3$ . Les spectres RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , gHSQC et HMBC (Annexe 2) indiquent la présence de deux noyaux indoles, avec le déblindage des protons aromatiques d'un des deux noyaux indoles décrits Tableau 9. Ce déblindage des protons aromatiques observé témoigne d'une liaison avec le carbonyle de la fonction amide (168,2 ppm, C8). De même, le déblindage est aussi visible au niveau du groupement éthyle (3,70 ppm, H1' et 3,10 ppm, H2') par comparaison avec ceux de la tryptamine. La structure du composé a été identifiée par comparaison avec les données spectroscopiques retrouvées dans Veale *et al.* (2015). La présence de cette molécule *N*-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]- 1H-indole-3-carboxamide n'a pas encore été décrite, à notre connaissance.

Tableau 9: Déplacements chimiques et couplages homonucléaires et hétéronucléaires dans le méthanol- $d_6$  pour le *N*-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]- 1H-indole-3-carboxamide

Position	$^1H$ : $\delta$ (ppm) ; multiplicité ; J (Hz)	$^{13}C$ : $\delta$ (ppm) d'après les analyses HSQC; mult.	HMBC ( $^1H \rightarrow ^{13}C$ )
1			
2	7,79 ; s ; 1H	128,7 ; CH	C3, C3a, C7a
3		111,7 ; C	
3a		126,6 ; C	
4	7,96 ; br d ; J = 7,9 Hz; 1H	121,3 ; CH	C6, C7a
5	7,11 ; td ; J = 8,0; 1,0 Hz ; 1H	121,6 ; CH	C3a, C7
6	7,17; td; J = 8,1; 1,2 Hz; 1H	123,0 ; CH	C4, C7a
7	7,41; br d; J = 8,1 Hz; 1H	112,4 ; CH	C3a, C5

7a		137,8 ; C	
8		168,2 ; C	
1'	3,70 ; t ; J = 7,3 Hz; 2H	41,2 ; CH2	C2', C3'', C8
2'	3,10 ; t ; J = 7,3 Hz; 2H	26,3 ; CH2	C1', C2'', C3'', C3a''
1''			
2''	7,13; s; 1H	123,1 ; CH	C3'', C3a'', C7a''
3''		113,3 ; C	
3a''		128,6 ; C	
4''	7,64; br d; J = 7,9 Hz; 1H	119,1 ; CH	C6'', C7a''
5''	7,00; td; J = 7,9; 0,9 Hz; 1H	119,3 ; CH	C3a'', C7''
6''	7,09; td; J = 8,1; 1,0 Hz; 1H	122,0 ; CH	C4'', C7a''
7''	7,34; br d; J = 8,1 Hz; 1H	111,9 ; CH	C3a'', C5''
7a''		137,9 ; C	

---

- **Description du composé N-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl-2-(1 *H*-indol-3-yl)]-2-oxoacetamide**

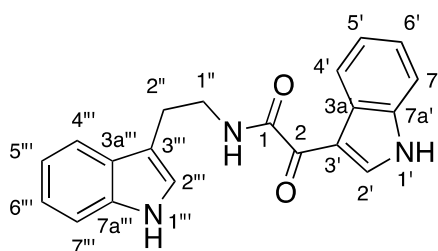


Figure 47: Structure moléculaire du *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl-2-(1 *H*-indol-3-yl)]-2-oxoacetamide isolé

Par analyse des spectres de RMN ([Annexe 3](#)) et comparaison avec les données de la littérature ([Bokesch et al. 2000](#); [Gupta et al. 2015](#)), ce troisième composé ([Figure 47](#)) a pu être identifié comme le *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl-2-(1 *H*-indol-3-yl)]-2-oxoacetamide ou le 8,9-dihydrocoscinaïde ([Tableau 10](#)). La molécule est uniquement connue par synthèse ([Gupta et al. 2015](#)). Cet alcaloïde bis indole possède une masse haute résolution de  $([M+H]^+ 332,1388)$  ce qui indique une formule brute de  $C_{20}H_{17}N_3O_2$ .

Tableau 10 : Déplacements chimiques et couplages homonucléaires et hétéronucléaires dans le méthanol- $d_6$  pour le *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl-2-(1 *H*-indol-3-yl)]-2-oxoacetamide

Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) ; multiplicité ; J (Hz)	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm) d'après les analyses HSQC ; mult.	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )
1		165,4 ; C	
2		185 ; C	
3a		127,6 ; C	
1'			
2'	8,67; s; 1H	139,2 ; CH	C3', C3a, C7a'
3'		113,7; C	
4'	8,29 ; m ; 1H	122,7; CH	C6', C7a'
5'	7,25; m; 1H	123,5; CH	C7'
6'	7,26; m; 1H	124,5; CH	C4'
7'	7,47; m; 1H	112, 8; CH	C3a, C5'

7a'		137,7; C	
1''	3,65; br t; J = 7,6 Hz; 2H	40,9; CH2	C1'', C2'', C3''
2''	3,06; br t; J = 7,6 Hz; 2H	25,9; CH2	C1'', C2'', C3'', C3a''
1'''			
2'''	7,12; br s; 1H	123,2; CH	
3'''		112,7; C	
3a'''		128,4 ; C	
4'''	7,63; br dt; J = 7,9 ; 1,0 Hz; 1H	119,0 ; CH	C6''', C7a'''
5'''	7,00; ddd; J = 7,8 ; 7,0 ; 1,0 Hz; 1H	119,3 ; CH	C3a''', C7'''
6'''	7,09; ddd; J = 8,2 ; 7,0 ; 1,0 Hz; 1H	122,1 ; CH	C4''', C7a'''
7'''	7,34; br dt; J = 8,1 ; 0,9 Hz; 1H	111,9 ; CH	C3a''', C5'''
7a'''		137,9 ; C	

La stratégie de déréplication traditionnelle, bien que chronophage, permet d'obtenir la structure moléculaire des métabolites isolés. *A contrario*, l'acquisition de spectre MS<sup>2</sup>, pour la construction des réseaux moléculaires, peut se faire directement à partir d'extraits bruts du duramen. Les métabolites issus de plusieurs familles chimiques peuvent être détectés en une analyse. Dans notre cas, nous avons isolés trois alcaloïdes uniquement par une stratégie de déréplication plus traditionnelle. Le faible nombre de métabolite identifié est probablement dû aux faibles teneurs en métabolites isolés ne permettant pas toujours l'acquisition de spectres RMN de qualité pour l'élucidation structurale. Ces trois alcaloïdes ont bien été détectés au cours des analyses métabolomiques, mais ils ne se retrouvent pas dans les réseaux moléculaires.

## B. Etude métabolomique par une approche ciblée

### I. Quantification de potentiels biomarqueurs : cas de la tryptamine

#### 1. Développement et optimisation de la méthode d'extraction en alcaloïdes totaux

La tryptamine, identifiée comme potentiel biomarqueur de durabilité naturelle est aussi le composé alcaloïdique majoritaire du bois de l'Angélique. Pour évaluer son rôle en tant que biomarqueur, une méthode d'extraction de la tryptamine a développée dans le cas de cette thèse. La méthode développée consiste à extraire 2 g de poudre de bois issu de l'individu A4 (représentatif de l'échantillonnage) en présence d'un mélange biphasique (phase aqueuse

basique et phase organique composée de dichlorométhane). Deux variations de cette méthode sont proposées afin de sélectionner la meilleure méthode :

- Dans la méthode « one step », l'extrait alcaloïdique total est obtenu en une seule étape qui combine à la fois une macération de la poudre de bois dans la phase aqueuse basique (solide-liquide) et une extraction des alcaloïdes avec le dichlorométhane (liquide-liquide).
- Dans la méthode « two step », l'étape de macération de la poudre de bois dans la phase aqueuse basique dure une heure suivi d'une seconde étape d'extraction des alcaloïdes totaux en présence de dichlorométhane.

Pour l'évaluation du rendement total obtenu avec les deux méthodes, un seul extrait alcaloïdique a été réalisé par méthode.

Les résultats montrent que la teneur en alcaloïdes totaux, obtenue avec le procédé « one step », est légèrement plus importante que celle obtenue avec le procédé « two step », avec des valeurs respectives de 11,9 et 11,0 mg/g de bois sec. L'intégration d'une étape de macération ne semble pas avoir une influence sur les rendements d'extraction en alcaloïdes ce qui est d'autant plus favorable à l'utilisation de la méthode « one step », qui se veut trois fois plus rapide que la « two step » (30 min vs 90 min). Ces résultats confirment la pertinence du choix de la méthode d'extraction « one step ». Néanmoins, un seul extrait a été réalisé par méthode, ce qui ne permet pas d'évaluer la variabilité des mesures entre ces deux méthodes.

Certains paramètres (quantité de matière végétale, durée d'extraction ou volume en solvants d'extraction) sont connus pour influencer les teneurs en métabolites dans un extrait donné. L'identification de ces paramètres dans le cas des extraits alcaloïdiques permettra d'optimiser les teneurs en tryptamine, qui seront quantifiées sur un plus large échantillonnage. La méthode « one step » a été employée pour évaluer l'effet des quantités croissantes de poudre de bois (2, 4 et 6 g) durant 15 min et 60 min de temps d'extraction respectivement. Les volumes des solvants d'extractions (100 mL de phase aqueuse et 200 mL de phase organique) sont restés inchangés pour tester les effets des quantités de bois et de la durée d'extraction. L'influence du volume de solvant a aussi été évaluée sur le même principe que la méthode « one step », avec une durée d'extraction de 15 min, pour les quantités de bois similaires. Les volumes des phases aqueuses et organiques ont été adaptés en fonction des quantités de poudre de bois de la façon suivante :



- 2g de poudre : 100 mL de phase aqueuse et 200 mL de phase organique
- 4g de poudre : 200 mL de phase aqueuse et 400 mL de phase organique
- 6g de poudre : 300 mL de phase aqueuse et 600 mL de phase organique

Pour chaque condition testée, un seul extrait en alcaloïde total a été préparé.

Les résultats présentés en **Figure 48** révèlent l'absence de proportionnalité entre les rendements en extraits alcaloïdiques totaux et les quantités de poudre de bois initiales : le rendement en alcaloïdes est d'autant plus élevé que les quantités de poudres de bois sont faibles. De plus, quel que soit la durée d'extraction appliquée, les teneurs en extraits alcaloïdiques sont d'autant plus faibles que la masse initiale de bois est élevée. En effet, pour les extraits préparés à l'issue d'une extraction de 15 min avec les quantités de 2, 4 et 6 g de poudre de bois, les rendements d'extractions observés sont de 11,9, 7,4 et 6,1 mg/g de bois sec respectivement. Le même constat peut être relevé pour le lot d'extrait obtenu avec une durée d'extraction de 60 min. Ces résultats sont surprenants car on pourrait s'attendre à une teneur en alcaloïdes positivement corrélée à la masse de bois à extraire. Ils montrent que dans le cas de la méthode « one step », au regard du volume de la cuve d'essai limité à 500 mL, la quantité de poudre de bois destinée à l'extraction est un critère primordial. Une masse de 2 g de poudre, correspondant au rendement en alcaloïdes totaux le plus élevé sera retenu pour la suite de l'étude.

En ce qui concerne la durée d'extraction, les résultats présentés aussi en **Figure 48** montrent que ce paramètre est sans effet sur les teneurs en alcaloïdes totaux, et ce quel que soit les volumes de poudres initialement utilisées. En effet, pour une même quantité de poudre de bois, les teneurs en alcaloïdes totaux sont relativement proches alors que les durées d'agitation diffèrent d'un facteur 4. À titre d'exemple, pour une quantité de poudre de 2 g, les teneurs d'alcaloïdes obtenues avec 15 min et 60 min d'agitation sont respectivement de 11,9 et 11,8 mg/g de bois sec. La durée de 15 min d'agitation a été retenue pour la méthode « one step » : en une heure, il sera possible de réaliser 4 fois plus d'extraction avec une durée d'agitation de 15 min qu'avec une durée de 60 min.

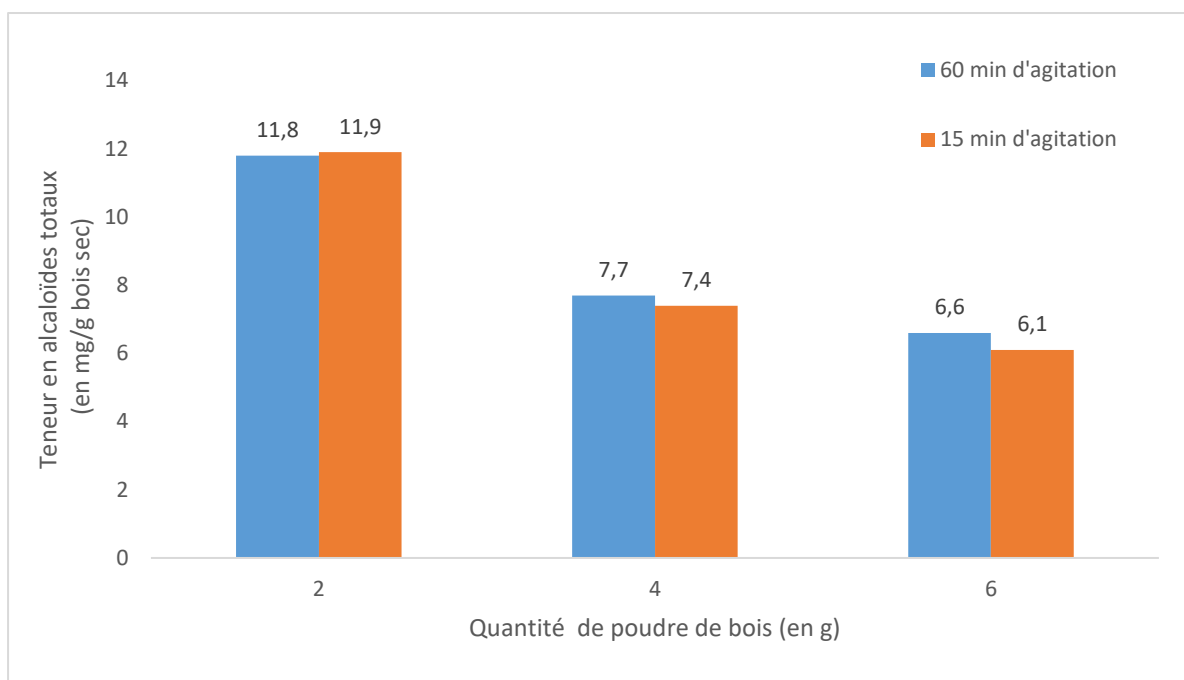


Figure 48: Teneur en alcaloïdes totaux en fonction de la quantité initiale en poudre de bois (2g, 4g et 6g) et des durées d'extraction (15 min et 60 min)

L'influence du volume des solvants d'extraction a aussi été évaluée pour les mêmes quantités de poudre de bois (2, 4 et 6 g) durant 15 min, avec la méthode « one step ». Les résultats (Figure 49) confirment l'influence du volume de solvants d'extractions sur les rendements en extrait d'alcaloïdiques totaux. Des teneurs quasi-similaires en extrait alcaloïdiques totaux (11,8 mg et 11,9 mg) ont été obtenus à partir de 2 g de poudre de bois pour des volumes en solvants d'extractions identiques. Mais avec l'augmentation proportionnelle des volumes en solvants d'extraction pour les quantités de 4 et 6 g de poudre de bois, les teneurs en extraits alcaloïdiques totaux augmentent aussi de manière proportionnelle. En effet, pour une extraction à partir de 4 g de poudre de bois avec des volumes de 100 mL et 200 mL de phase aqueuse et de phase organique respectivement, 7,4 mg/g de bois sec ont été recueillis contre 28,7 mg/g de bois sec avec les volumes de 200 mL et 400 mL. En doublant les volumes de solvants, les teneurs en extraits ont été multipliées par 4. De même, à partir de 6 g de poudre de bois, lorsque les volumes en solvants d'extractions sont triplés, les teneurs en extraits sont 6 fois plus importantes.

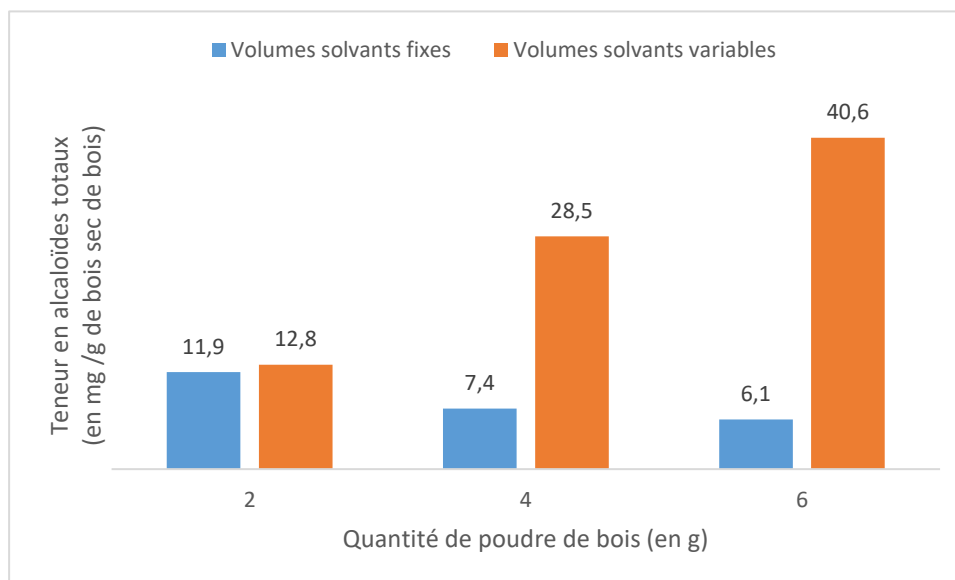


Figure 49: Teneurs en alcaloïdes totaux recueillis par extrait à partir de l'individu A4 en fonction des volumes en solvants organiques et aqueux

Au final, la méthode « one step » optimale, qui permettra d'obtenir les rendements optimaux en extraits alcaloïdique totaux et donc en tryptamine, réunie les conditions suivantes : 2 g de poudre de bois, pour des volumes d'extractions de 100 mL et 200 mL pour les phases aqueuses et organiques respectivement et une durée d'agitation de 15 min. Ces conditions ont été retenues pour toutes les futures extractions en alcaloïdes totaux avec la méthode « one step ».

Afin de s'assurer de la répétabilité de la mesure en alcaloïdes totaux au regard de la méthode d'extraction « one step », les rendements en alcaloïdes totaux, provenant de 3 extractions réalisées en simultanées à partir de 3 cuves d'essai, ont été comparés. Les extractions se sont déroulées à partir de 2 g de poudre de bois issus de l'individu A4 (représentatif de l'échantillonnage) pour une durée d'extraction de 15 min. Le **Tableau 11** met en évidence la répétabilité de la mesure de ces extractions avec une teneur moyenne de  $11,4 \pm 1,14$  mg/g de bois sec et un coefficient de variation de 5 % (faible dispersion des résultats). La méthode d'extraction « one step » présente ainsi un caractère répétable.

Tableau 11: Teneur en alcaloïdes totaux après 3 extractions du duramen externe de l'individu A4

Teneur en alcaloïdes totaux (mg/ g de bois sec)	Moyenne (mg/g de bois sec)	Ecart -type	CV (%)
11,9			
10,7	11,4	1,1	5,5
11,6			

## 2. Quantification de la tryptamine par qRMN

La tryptamine est le métabolite alcaloïdique du bois qui sera évalué comme potentiel biomarqueur de durabilité naturelle dans cette partie. L'optimisation de la méthode d'extraction « one step » a permis de s'assurer d'un rendement optimal en alcaloïdes totaux, et donc en tryptamine dans les extraits. Après sélection de la méthode d'extraction et de ces conditions optimales, la tryptamine a été quantifiée par qRMN. Cette technique analytique, fiable et reproductible, a pu être employée dans le cas des extraits en alcaloïdes totaux car la tryptamine est le composé majoritaire. Par conséquent, les signaux correspondants aux protons aromatiques présents sur les spectres RMN  $^1\text{H}$ , sur lesquels repose la quantification, sont attribués à la tryptamine uniquement.

Certains facteurs liés au stockage du matériel végétal ou de son extrait, tels que le séchage de la poudre de bois préalablement à l'extraction ainsi que les conditions de stockage des extraits alcaloïdiques totaux en solution (avant quantification), influencent la quantification de la tryptamine par qRMN. En effet, si la tryptamine est un composé thermolabile, ses teneurs seront variables en fonction du taux de séchage de la poudre de bois avant extraction. De même, les alcaloïdes à noyau indole se conserveraient moins bien lorsqu'ils sont sous forme de base en solution dans un solvant organique par comparaison aux alcaloïdes sous forme de sels, plus stables. Par conséquent, ces facteurs constituent une source de biais importante pour la quantification des teneurs en tryptamine par qRMN.

Tout d'abord, pour évaluer l'influence du séchage sur les teneurs finales en tryptamine, la poudre de bois issu de l'individu A4 (représentatif de l'échantillonnage) présentant des teneurs différentes en humidité (50 %, 12 % et 0%) a été extraite avec la méthode « one step ». Un seul extrait a été préparé pour chaque condition testée. Les résultats présentés en **Figure 50** indiquent que l'aire correspondant aux signaux des protons aromatiques, utilisés pour la quantification de

la tryptamine, varie en fonction des teneurs en humidité du bois. Les signaux deviennent par ailleurs difficilement perceptibles, et donc mesurables lorsque la poudre de bois est anhydre (séchage à 103 °C). En effet, les teneurs en tryptamine mesurées dans les extraits passent de 3,6 mg/ g de bois pour un taux d'humidité à 50 % à 0,7 mg/g de bois dans le cas du bois anhydre, soit une perte de la teneur en tryptamine de plus de 80 %.

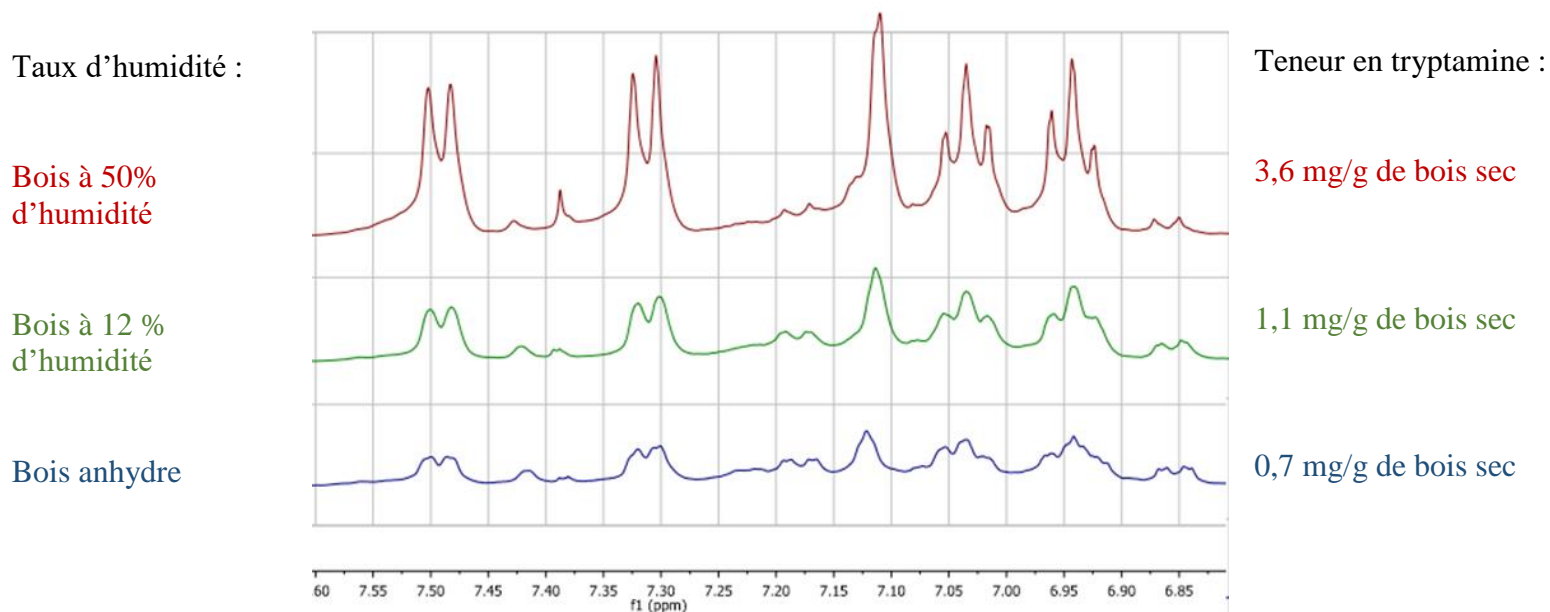
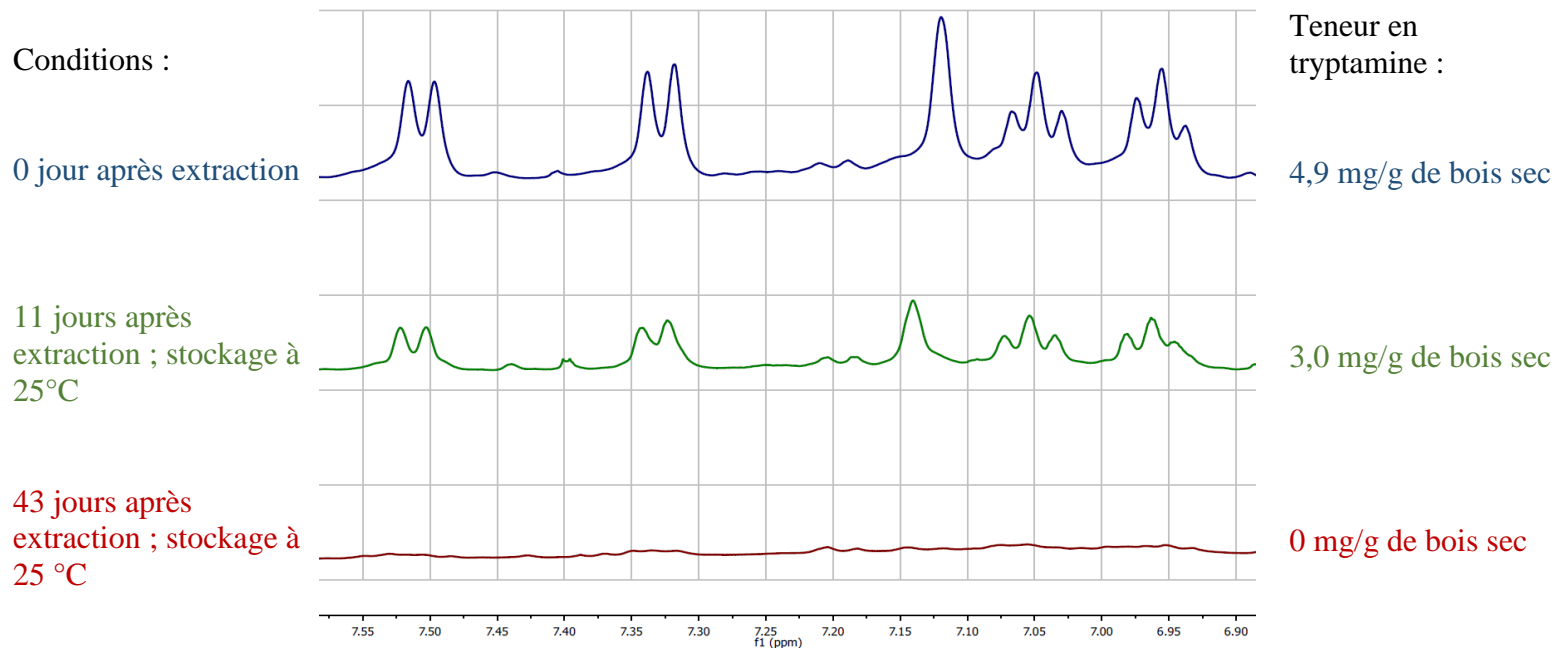


Figure 50: Spectres RMN  $^1\text{H}$  des extraits alcaloïdiques totaux préparés à partir de duramen externe de l'individu A4 à différents taux d'humidité

Afin d'évaluer l'influence de la durée de stockage des extraits avant analyse sur les teneurs en tryptamine, des extraits en alcaloïdes totaux préparés à partir de l'individu A1 (représentatif de l'échantillonnage) ont été solubilisés dans du DMSO- $d_6$ . Ces extraits ont été conditionnés à température ambiante (25°C) pendant 11 jours et 43 jours avant leur analyse par qRMN. À l'issue de ces durées de conservation, les teneurs en tryptamine, mesurées à partir des spectres RMN  $^1\text{H}$ , ont été comparées avec celle d'un extrait de référence n'ayant pas subi de conditionnement. Le spectre de référence choisi correspond à un extrait en alcaloïdes totaux qui a été préparé et analysé sur la même journée. Un unique extrait alcaloïdique total a été préparé pour chacune des conditions testées, soit un total de 3 extraits.

Les résultats présentés en Figure 51 montrent clairement une variabilité de l'aire correspondant aux signaux des protons aromatiques de la tryptamine en fonction des durées de stockage. Par comparaison à la teneur en tryptamine mesurée dans l'extrait de référence qui s'élève à 4,9 mg/g de bois sec, la teneur mesurée après 11 jours de stockage à 25 °C passe à 3,0 mg/g de bois

sec et après 43 jours de durée de stockage, il n'est plus possible de quantifier la tryptamine dans l'extrait.



L'ensemble de ces résultats met en avant la nécessité de contrôler les paramètres de séchage du bois ainsi que le conditionnement de l'extrait alcaloïdique afin de réaliser une quantification significative et réaliste de la tryptamine.

Après avoir identifié les facteurs qui influencent les teneurs en tryptamine, la méthode d'extraction retenue « one step » a été appliquée pour 9 individus de l'échantillonnage à savoir : 3 individus normaux (A0, A1 et A5), 3 individus sénescents (A3, A9 et HP3) et 3 individus de plantation (A2, A7 et A8). Ces individus sont caractérisés par des critères architecturaux propres à chaque groupe, qui reflèteraient des stades différents de développement :

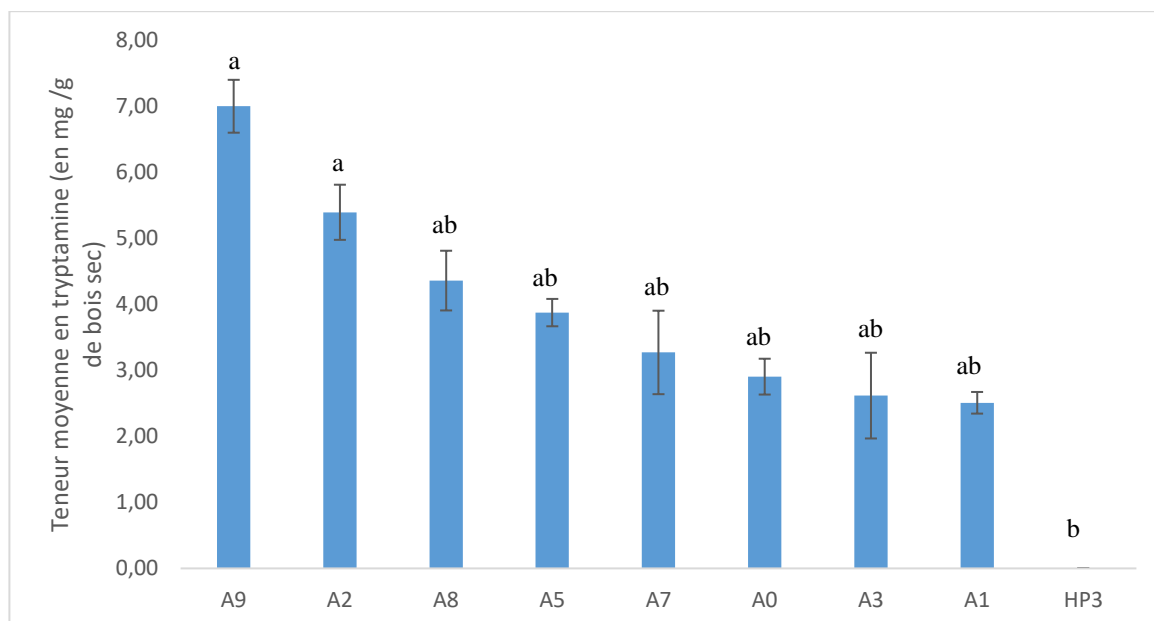
- Les arbres normaux sont des arbres adultes qui ne portent aucun traumatisme particuliers et possèdent une couronne intacte
- Les arbres sénescents sont des arbres généralement âgés, qui présentent un degré particulier de fragmentation de leur couronne
- Les arbres de plantations

Pour les 9 individus sélectionnés, les extraits alcaloïdiques totaux ont été réalisés en 3 exemplaires. La quantification de la tryptamine par qRMN a été effectuée à partir des 27 extraits alcaloïdiques totaux précédemment préparés.

Les résultats des teneurs moyennes en tryptamine mesurées par qRMN sont présentés en **Figure 52**. Les teneurs varient entre  $7,00 \pm 0,40$  mg/ g de bois de sec pour l'individu A9 et 0 mg/ g de bois sec pour l'individu HP3. L'analyse statistique de Kruskal Wallis met en avant 3 groupes significativement différents en fonction des teneurs moyennes en tryptamine mesurées chez les 9 individus sélectionnés. La composition des groupes significatifs n'est pas liée à celle des groupes architecturaux. Le groupe A est formé par deux individus, A2 individu de plantation et A9 individu sénéscent qui présentent les plus fortes teneurs en tryptamine (5,40 et 7,00 mg/ g de bois sec respectivement). Le second groupe AB, est représenté par individus issus de plantations, sénéscent et des individus normaux, avec des teneurs en tryptamines qui varient entre 4,36 et 2,51 mg/g de bois sec pour les individus A8 et A1. Le groupe B est composé uniquement de l'individu sénéscent HP3, pour lequel aucune teneur en tryptamine n'a pu être mesurée par qRMN.

La variabilité des teneurs en tryptamine n'est donc pas liée au type architectural. De plus, l'individu HP3 attire la curiosité par la singularité de ses résultats car aucune teneur en tryptamine n'a pu être mesurée. Ce résultat est-il dû à l'absence de tryptamine dans l'extrait, et donc dans le bois de HP3 ou bien les teneurs présentes dans l'extrait sont-elles trop faibles pour être quantifiables avec cette technique analytique ?

Aussi, une seconde technique analytique a été utilisée pour la quantification de la tryptamine dans l'extrait alcaloïdique total, à savoir l'HPLC-DAD.



\*Les individus avec des lettres différentes sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) selon le test non paramétrique de Kruskal Wallis.

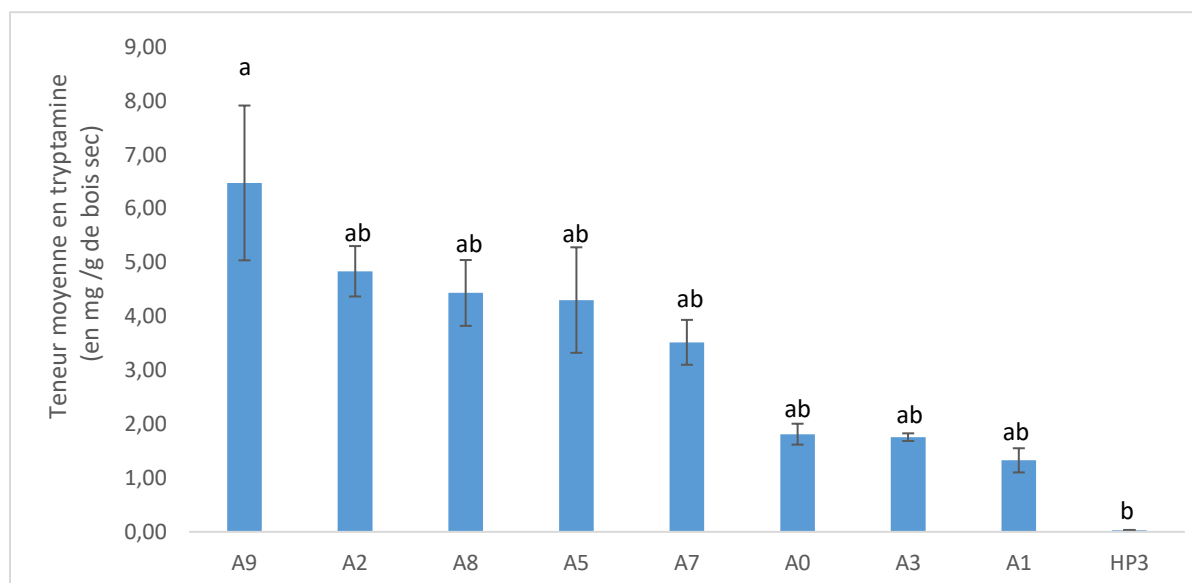
Figure 52: Teneur moyenne de la tryptamine mesurée pour 9 individus par qRMN

### 3. Quantification de la tryptamine en HPLC-DAD : comparaison avec la méthode de qRMN

La technique analytique de l'HPLC-DAD a été utilisée pour l'analyse des mêmes extraits précédemment analysés par qRMN. La tryptamine est un composé qui absorbe dans l'UV, par conséquent sa détection est possible avec le détecteur DAD. Afin de quantifier la tryptamine de l'extrait, une courbe de calibration préparée à partir de la tryptamine commerciale dans des concentrations différentes a été réalisée. Les résultats des teneurs moyennes en tryptamine sont présentés en Figure 53. Les teneurs en tryptamine varient entre  $6,47 \pm 1,44$  mg/g de bois sec pour l'individu A9 et  $0,03 \pm 0$  mg/g de bois sec pour HP3. De même, l'analyse statistique de Kruskal Wallis met en avant 3 groupes significativement différents en fonction des teneurs en tryptamines mais la composition des groupes A et AB diffère de celle des groupes obtenus avec la qRMN. Le groupe A est cette fois-ci composé uniquement de l'individu sénescant A9 chez lequel la plus forte teneur en tryptamine a été observée ( $6,47$  mg/g de bois sec). L'individu de plantation A2 se retrouve dans le groupe AB, avec les teneurs moyennes en tryptamine qui varient entre  $4,84$  mg/g de bois sec pour A2 et  $1,33$  mg/g de bois sec pour l'individu normal A1. De très faibles teneurs en tryptamine ( $0,03$  mg/g de bois sec) ont pu être mesurées chez



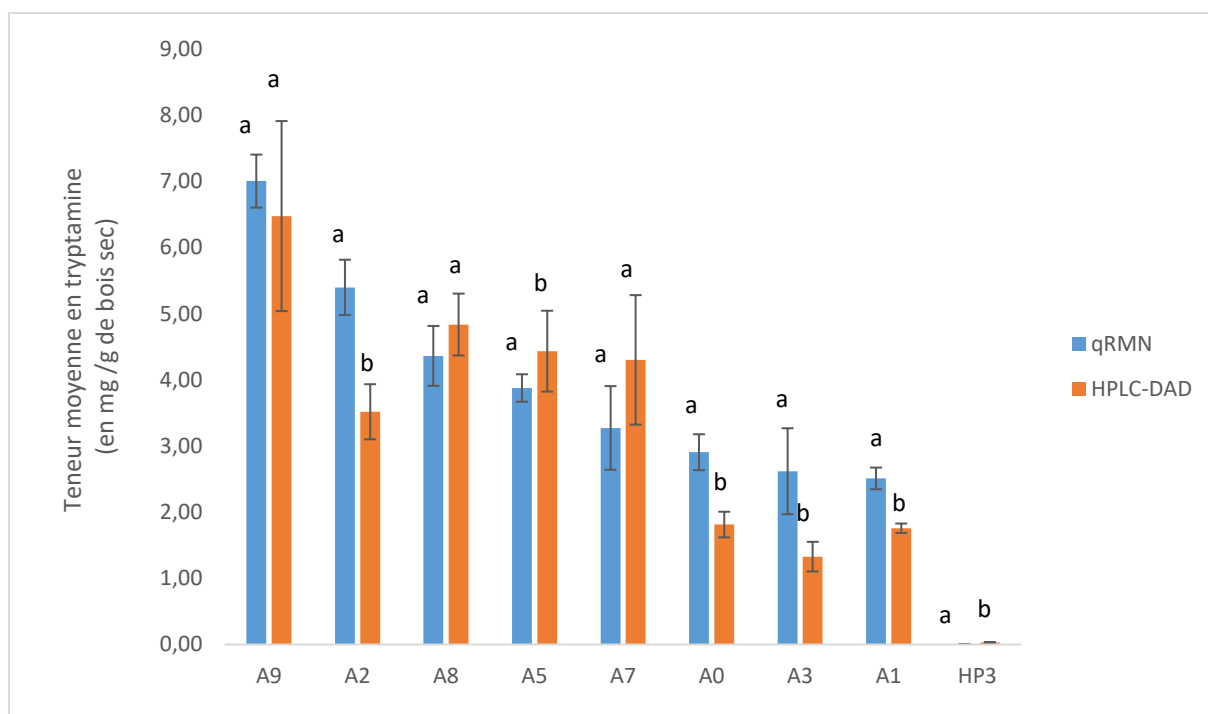
l'individu sénescant HP3 qui constitue le groupe B. Par conséquent, l'outil HPLC-DAD possède une sensibilité beaucoup plus grande que la qRMN, ce qui donne accès à la quantification de teneur de l'ordre du  $\mu\text{g}$  dans les extraits. La quantification par qRMN et par HPLC-DAD de la tryptamine dans les extraits alcaloïdiques montrent que les teneurs moyennes en tryptamines ne sont pas liées au type architectural de l'individu.



\*Pour chaque individu, les teneurs avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test non paramétrique de Kruskal Wallis

**Figure 53: Teneur moyenne en tryptamine mesurée pour 9 individus par HPLC-DAD**

Les teneurs moyennes en tryptamine mesurées pour un même extrait avec les deux techniques analytiques, qRMN et HPLC-DAD ont été comparées entre elles. Les résultats présentés en **Figure 54**, révèlent des différences significatives pour les teneurs mesurées dans les extraits de tous les individus sauf pour les individus A7, A8 et A9. Par conséquent, en fonction de l'outil analytique employé, des teneurs en tryptamine mesurées à partir d'un même extrait peuvent être significativement différentes, ce qui met en avant l'importance du choix de l'outil de mesure. De manière globale, les mesures effectuées en qRMN sont plus importantes que celles réalisées en HPLC-DAD. Les deux techniques analytiques, qRMN et HPLC-DAD utilisées en tant qu'outil de mesure sont toutes les deux fiables et reproductibles, comme en atteste leurs courbes de calibrations présentées en **Figure 31** et **Figure 30**.



\*Pour chaque individu, les teneurs avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) selon le test non paramétrique de Kruskal Wallis

Figure 54: Comparaison des teneurs moyennes en tryptamine mesurées par qRMN et HPLC-DAD pour les 9 individus de l'échantillonnage

#### 4. Recherche de corrélation entre la durabilité naturelle et les teneurs en tryptamine

Une recherche de corrélation entre les teneurs moyennes en tryptamine, mesurées avec les 2 outils analytiques, et les moyennes des pertes de masse pour les duramens externes des 9 individus a été réalisée. Les pertes de masse reflètent la durabilité naturelle du duramen des individus à l'égard des champignons de la microflore du sol. L'analyse des résultats (Figure 55) révèle que les corrélations entre les teneurs en tryptamine et les moyennes des pertes de masse pour les deux outils utilisés ne sont pas significatives. Ces résultats apportent des premiers éléments de réponse sur le rôle de la tryptamine qui ne semble pas être un biomarqueur de durabilité naturelle du bois de l'Angélique.

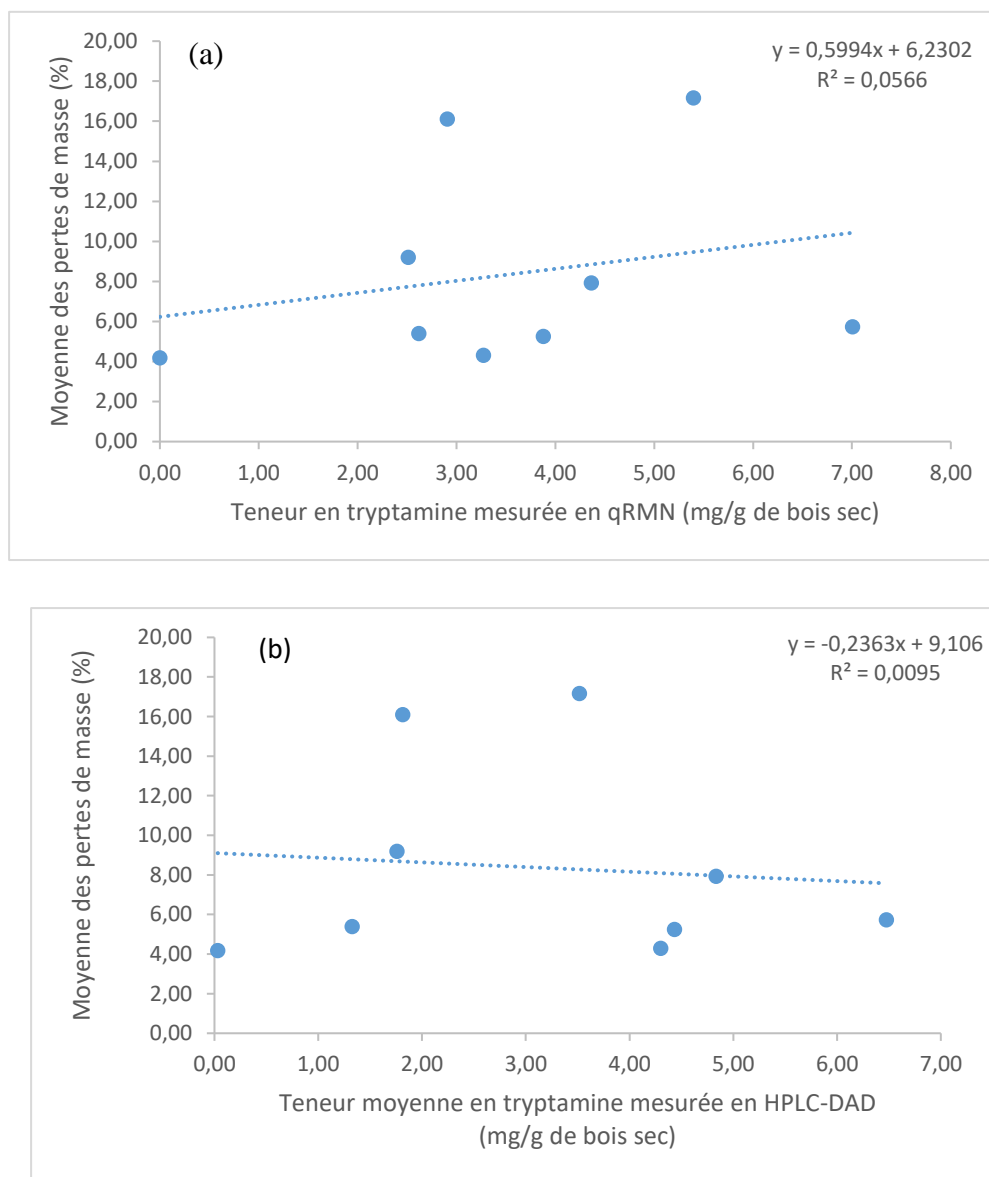


Figure 55: Représentation graphique des corrélations entre les teneurs moyennes en tryptamine mesurées par qRMN (a) et l'HPLC-DAD (b) pour les moyennes des pertes de masse mesurées chez 9 individus de l'échantillonnage

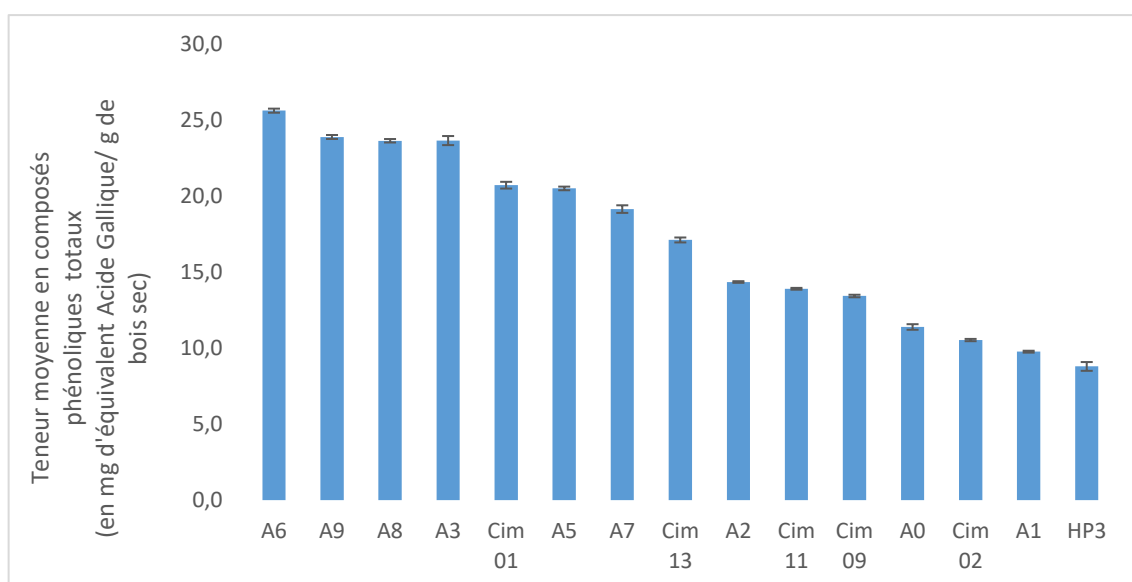
## II. Quantification des composés phénoliques totaux et mesure de leurs activités antiradicalaire

Dans la partie précédente, la tryptamine a été quantifiée afin d'évaluer son rôle en tant que biomarqueur de durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores. Néanmoins, la présence de la tryptamine ne semble pas être corrélée à la propriété de durabilité naturelle du bois de l'Angélique. Aussi, nous nous sommes intéressés aux composés phénoliques connus pour influencer la durabilité naturelle à l'égard de certains champignons lignivores notamment

parce qu'ils possèdent une activité antiradicalaire. Les composés phénoliques totaux du duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage ont été quantifiés. Pour chaque individu, 3 extraits en composés phénoliques totaux ont été préparés par la méthode de Folin-Ciocalteu et la mesure de l'activité antiradicalaire a été réalisée pour chaque extrait.

### 1. Mesure des teneurs en composés phénoliques totaux

Les résultats des teneurs moyenne en composés phénoliques totaux, mesurée pour les 15 individus de l'échantillonnage sont présentés en **Figure 56**. L'analyse de ces résultats indiquent que les teneurs varient entre  $8,80 \pm 0,29$  et  $25,64 \pm 0,13$  éq. acide gallique/g de bois sec pour les individus HP3 et A6 respectivement. L'individu sénescant HP3 est aussi celui qui présente les plus faibles teneurs en tryptamine.



**Figure 56: Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux mesurées dans le duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage par la méthode de Folin Ciocalteu**

### 2. Mesure de l'activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire a été mesurée à partir du radical libre DPPH. D'après les résultats, tous les extraits en composés phénoliques totaux présentent une activité antiradicalaire, variant entre  $0,89 \pm 0,33$  et  $8,57 \pm 1,54$  mM éq. Trolox/g de bois sec. La plus forte activité antiradicalaire a été relevée pour l'individu A6 qui présente par la même occasion la plus forte teneur en composés phénoliques totaux (de  $25,64 \pm 0,13$  éq. Acide gallique/g de bois sec). De plus, l'intensité de l'activité antiradicalaire est positivement corrélée à la teneur en composés phénoliques ( $p < 0,05$ ) (**Figure 57**) comme en témoigne le coefficient de corrélation de Pearson

de 0,82.

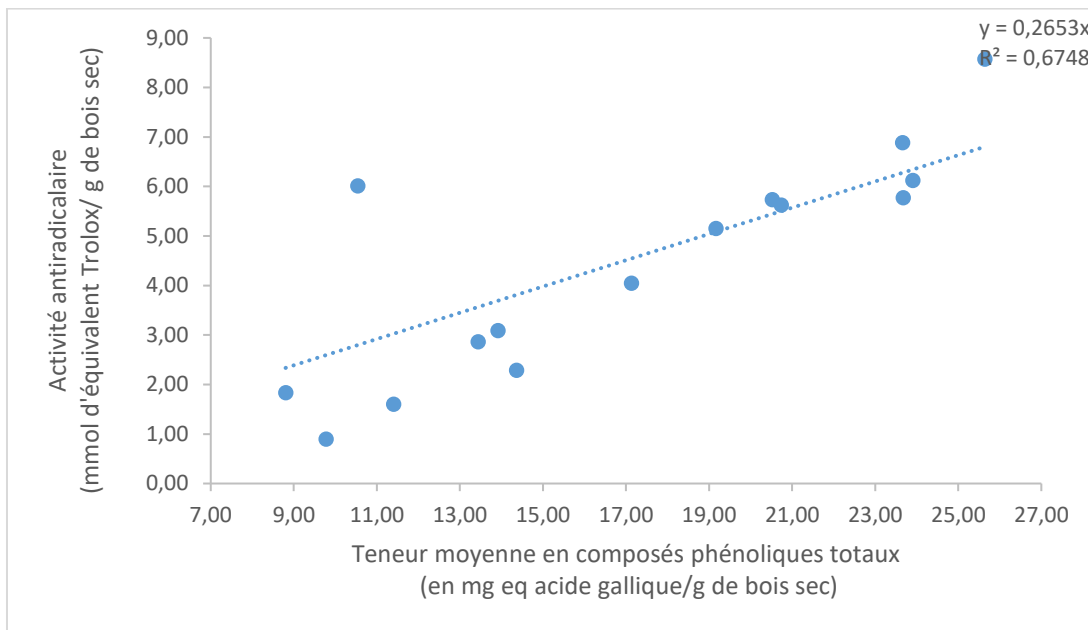


Figure 57: Représentation graphique de la corrélation significative ( $p < 0,05$ ) entre les teneurs moyenne en composés phénoliques totaux et l'activité antiradicalaire pour les 15 individus de l'échantillonnage

### 3. Recherche de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques, l'activité antiradicalaire et les pertes de masse

Une recherche de corrélation a été réalisée entre les teneurs moyennes en composés phénoliques totaux et l'activité antiradicalaire de ces extraits avec la moyenne des pertes de masse mesurées chez les duramens externes des 15 individus de l'échantillonnage. Mais aucune de ces corrélations n'est significative (Figure 58).

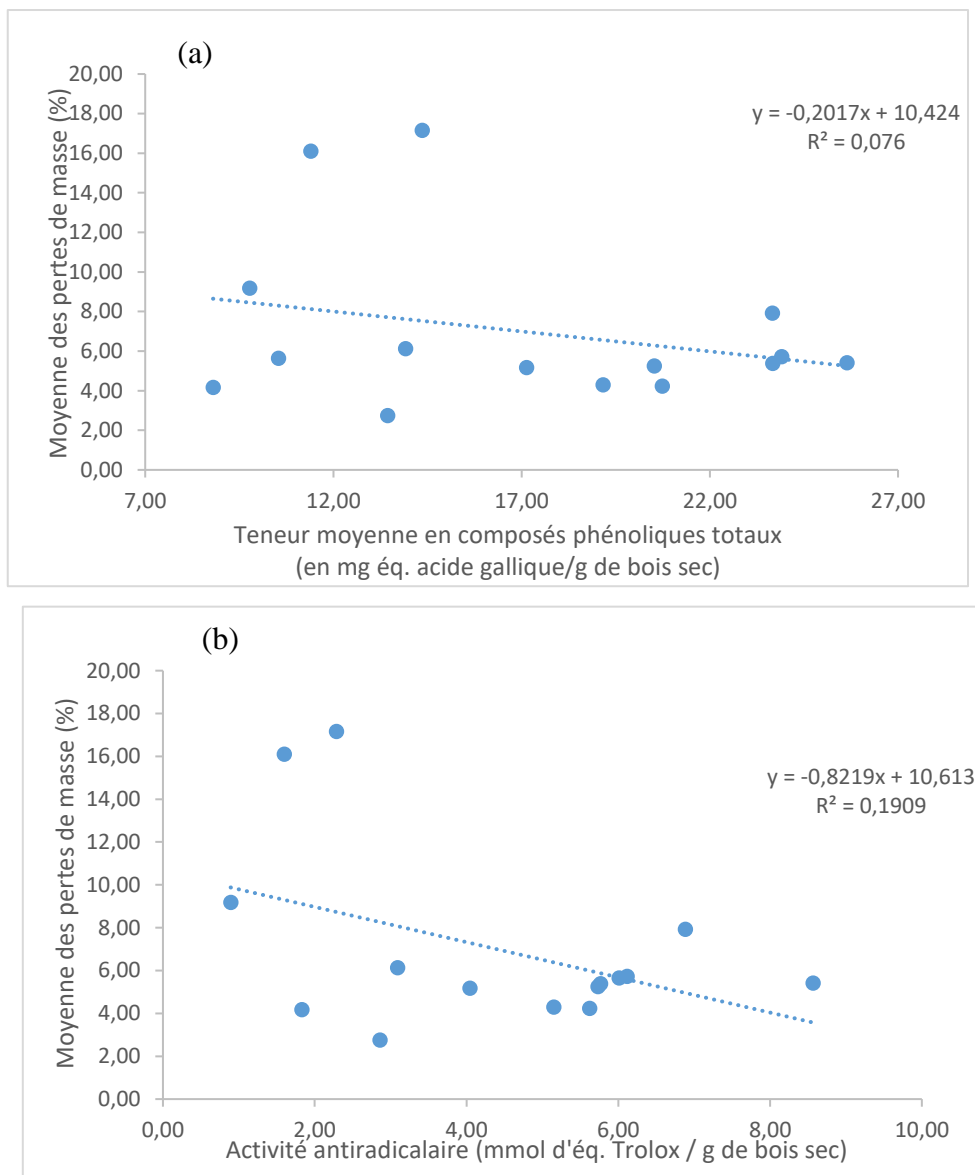


Figure 58: Représentation graphique de la corrélation entre le composés phénoliques (a) et l'activité antiradicalaire (b) avec la moyenne des pertes de masse mesurées chez les 15 individus de l'échantillonnage

### III. Rôle des extractibles dans la durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores

#### 1. Activité antifongique des extractibles du duramen

L'activité antifongique a été mesurée par la méthode de « broth microdilution » chez 4 extraits préparés à partir de l'individu normal A5, représentatif de l'échantillonnage : (P1) un extrait total d'ubier externe et (P2) de duramen externe, (P3) un extrait alcaloïdique total ainsi qu'un (P4) extrait en composés phénoliques totaux. Tous ces extraits ont été préparés en un seul

exemplaire. L'activité antifongique de la tryptamine commerciale a aussi été testée. De plus, les extraits en composés phénoliques totaux et en alcaloïdes totaux ont été testés en combinaison, afin de mettre en évidence un éventuel effet de synergie. Les tests biologiques se sont déroulés en microplaque de 96 puits, avec des échantillons (extraits secs et molécule pure) testés à différentes concentrations en présence d'une souche de pourriture cubique (*Gloeophyllum trabeum*) et une seconde de pourriture fibreuse (*Pycnoporus sanguineus*) en suspension.

Aucun extrait testé n'a présenté une activité antifongique à l'égard des souches de pourriture cubique et fibreuses sélectionnées. Après un délai de 72 heures, le développement du mycélium était visible au fond du culot, quelles que soient les différentes concentrations des extraits, à l'exception des témoins négatifs. Le même constat a été fait pour les extraits testés en combinaison, pour lesquels aucune activité antifongique n'a été mise en évidence.

## 2. Mise en évidence de l'influence des extractibles sur le taux de dégradation des éprouvettes d'essais

Afin de mesurer l'influence des extractibles sur les pertes de masse, reflétant la durabilité naturelle, des lots d'éprouvettes extraites (lot 4) et non extraites (lot 2) ont été exposés au champignon *Antrodia vaillantii* pendant 10 semaines. Toutes les éprouvettes ont été préparées à partir de l'individu A5, individu représentatif de l'échantillonnage. Pour évaluer les pertes de masse qui ne sont pas liées à l'activité du champignon, des lots d'éprouvettes 1 et 3 ont été testés sans champignon. L'espèce *Virola michelii* qui est une espèce tropicale non durable a été utilisée pour contrôler la virulence de la souche d'essai.

Après 10 semaines d'exposition, la moyenne des pertes de masse obtenues pour les éprouvettes de référence est de 0,03% ce qui ne permet pas de valider l'essai. De plus, les éprouvettes testées en l'absence de mycélium (lots 1 et 3) ont toutes été contaminées. Les éprouvettes d'essai extraites (lot 4) et non extraites (lot 2) ont toutes été recouvertes de manière homogène par le champignon et aucune contamination n'a été observée. Néanmoins, aucune perte de masse n'a été observée pour ces lots. Ce test biologique n'a pas permis mettre en évidence l'influence des extractibles sur le taux de dégradation des éprouvettes avec le champignon d'essai.

## *Partie 2 : Autres facteurs de durabilité naturelle du bois de l'Angélique*

Les résultats de la partie précédente montrent que les extractibles sélectionnés ne jouent pas un rôle flagrant dans le cas de la durabilité naturelle de l'Angélique. La tryptamine seule, les extraits en alcaloïdes totaux et en composés phénoliques totaux ne possèdent pas d'activités antifongiques. De plus, aucune corrélation significative n'a pu être établie avec les moyennes des pertes de masse qui reflètent la durabilité naturelle du bois de l'Angélique à l'égard de la microflore du sol. D'autres facteurs ont donc été pris en compte pour mieux comprendre l'origine de la durabilité naturelle de l'Angélique, à savoir la lignine et l'infradensité.

### *I. Les macromolécules du bois*

Les biopolymères du bois, en particulier la lignine, confèrent une certaine rigidité à la cellule et constituent une barrière physique pour les agents de dégradation du bois. Par conséquent, ils peuvent être un autre facteur à l'origine de la durabilité naturelle du bois de l'Angélique. L' $\alpha$ -cellulose (partie insoluble de la cellulose), l'holocellulose (cellulose et hémicelluloses) et la lignine (Klason et acide-soluble) ont été quantifiés à partir du duramen externe issu des 15 individus de l'échantillonnage. Les extractibles totaux ont été extraits de la poudre de bois avant chaque dosage pour éviter les biais lors de l'analyse de données. Chaque dosage a été effectué en un exemplaire. Les teneurs en lignine, holocellulose et  $\alpha$ -cellulose ont été corrigées par rapport à la teneur en extractible totaux pour éviter tout biais des mesures. Toutes les quantités mesurées sont exprimées en pourcentage de bois sec.

#### *1. Résultats des dosages*

L'analyse des résultats (**Tableau 12**) révèle que les teneurs en extraits totaux varient de 6,7% pour l'individu normal A0 à 13,8 % pour l'individu sénescant A9. L'individu Cim 13, arbre normal, est celui qui présente les plus fortes teneurs en holocellulose et en  $\alpha$ -cellulose comparativement à l'individu sénescant A3. Au contraire, dans le cas de la lignine totale (Klason et acide-soluble), l'individu A3 est celui qui présente les plus fortes teneurs comparativement à l'individu Cim 13, dont les teneurs sont plus faibles. Concernant les teneurs en lignine Klason, l'individu normal Cim 02 est celui qui en renferme le plus, par rapport à l'individu sénescant A9. La plus forte teneur en lignine acide-soluble a été observée chez l'individu normal Cim 11 et la plus faible chez l'individu A3.



Tableau12:Teneurs en extractibles totaux, lignine Klason, lignine acide-soluble, lignine totale (Klason et acide-soluble), l'holocellulose et  $\alpha$ -cellulose pour le duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage

Individu	Extractibles totaux (% MS)	Lignine Klason (% MS)	Lignine acide-soluble (% MS)	Lignine totale (%MS)	Holocellulose (% MS)	$\alpha$ -cellulose (% MS)
A0	6,70	37,9	1,7	39,6	60,4	38,5
A1	7,00	38,1	1,5	39,6	60,4	38,4
A2	10,50	36,4	1,9	38,3	61,6	35,7
A3	9,9	40,9	1,3	42,2	57,8	32,5
A5	9,10	37,4	1,3	38,7	61,3	37,7
A6	12,80	36,9	1,6	38,5	61,6	39,8
A7	10,30	37,4	1,3	38,7	61,3	36,7
A8	8,90	38,4	1,4	39,8	60,2	35,6
A9	13,80	37,0	1,6	38,6	61,4	38,0
HP3	6,90	35,5	1,4	36,9	63,1	41,9
Cim 01	10,30	37,3	1,5	38,8	61,1	37,7
Cim 02	8,00	40,1	2,0	42,1	57,9	35,8
Cim 09	7,10	37,9	1,4	39,3	60,8	39,3
Cim 11	7,60	36,6	2,3	38,9	61,1	39,1
Cim 13	7,50	36,0	1,5	37,5	62,5	40,0
Moyenne	7,0	37,6	1,6	39,2	60,8	37,8

## 2. Variabilité en fonction du type architectural

Par la suite, les teneurs de chaque paramètres mesurés (lignine Klason, lignine acide-soluble, lignine totale, holocellulose et  $\alpha$ -cellulose) pour le duramen des 15 individus ont été regroupées en fonction du type architectural de l'individu (normal, plantation ou sénescents). Le test statistique de Mann Whitney a été réalisé pour chaque type architectural. L'analyse de ce test révèle des différences significatives pour les teneurs en lignine Klason entre les individus normaux et les individus sénescents ainsi que les individus normaux et ceux de plantation, avec des p-values de 0,039 respectivement (Tableau 13). La teneur en lignine Klason moyenne pour les individus normaux est significativement supérieure à celle des individus de plantations et significativement inférieure à la teneur moyenne des individus sénescents.

Tableau 13: Résultats des p-values obtenues après comparaison des groupes architecturaux en fonction des teneurs en lignine

	Plantation	Normal	Sénescent
Plantation	1	0,039	1
Normal	0,039	1	0,039
Sénescent	1	0,039	1
Moyenne	37,58	37,77	37,41

Le même constat a été relevé pour les teneurs en  $\alpha$ -cellulose, avec des p-values de 0,004 entre les individus normaux et de plantations et de 0,039 entre les individus normaux et sénescents (Tableau 14). La teneur moyenne en  $\alpha$ -cellulose des individus normaux est significativement plus importante que celles des individus de plantation et sénescent.

Ces résultats traduisent que les teneurs en lignine Klason et en  $\alpha$ -cellulose permettent de différencier les individus normaux des individus de plantation et des individus sénescents.

Tableau 14: Résultats des p-values par comparaison des groupes d'individus classés par type architectural en fonction des teneurs en  $\alpha$ -cellulose

	Plantation	Normal	Sénescent
Plantation	1	0,004	1
Normal	0,004	1	0,039
Sénescent	1	0,039	1
Moyenne	35,98	38,46	37,45

### 3. Variabilité en fonction des classes de durabilité naturelle des différents individus

De même, les teneurs de ces paramètres ont été regroupés en fonction des classes de durabilité des individus chez lesquels elles ont été mesurées : classe 1 (très durable), classe 2 (durable) et classe 3 (moyennement durable). Aucune différence significative n'a été observée entre les classes de durabilités naturelles quel que soit le paramètre mesuré. Les teneurs en lignine Klason, lignine acide-soluble, lignine totale, en holocellulose et  $\alpha$ -cellulose ne permettent donc pas de différencier les individus en fonction de leurs classes de durabilité naturelle.

### 4. Recherche de corrélations avec les pertes de masse

Afin de mieux comprendre le rôle des lignines Klason et acide-soluble, de l'holocellulose ainsi que de l' $\alpha$ -cellulose dans la durabilité naturelle du bois de l'Angélique, une recherche de corrélation a été faite entre les pertes de masse et chacun des paramètres quantifiés. L'analyse des résultats (Figure 59) révèle qu'il n'existe aucune corrélation significative entre les teneurs

en lignines (Klason et acide-soluble), en holocellulose, en  $\alpha$ -cellulose et enfin en extractibles totaux avec les moyennes des pertes de masse.

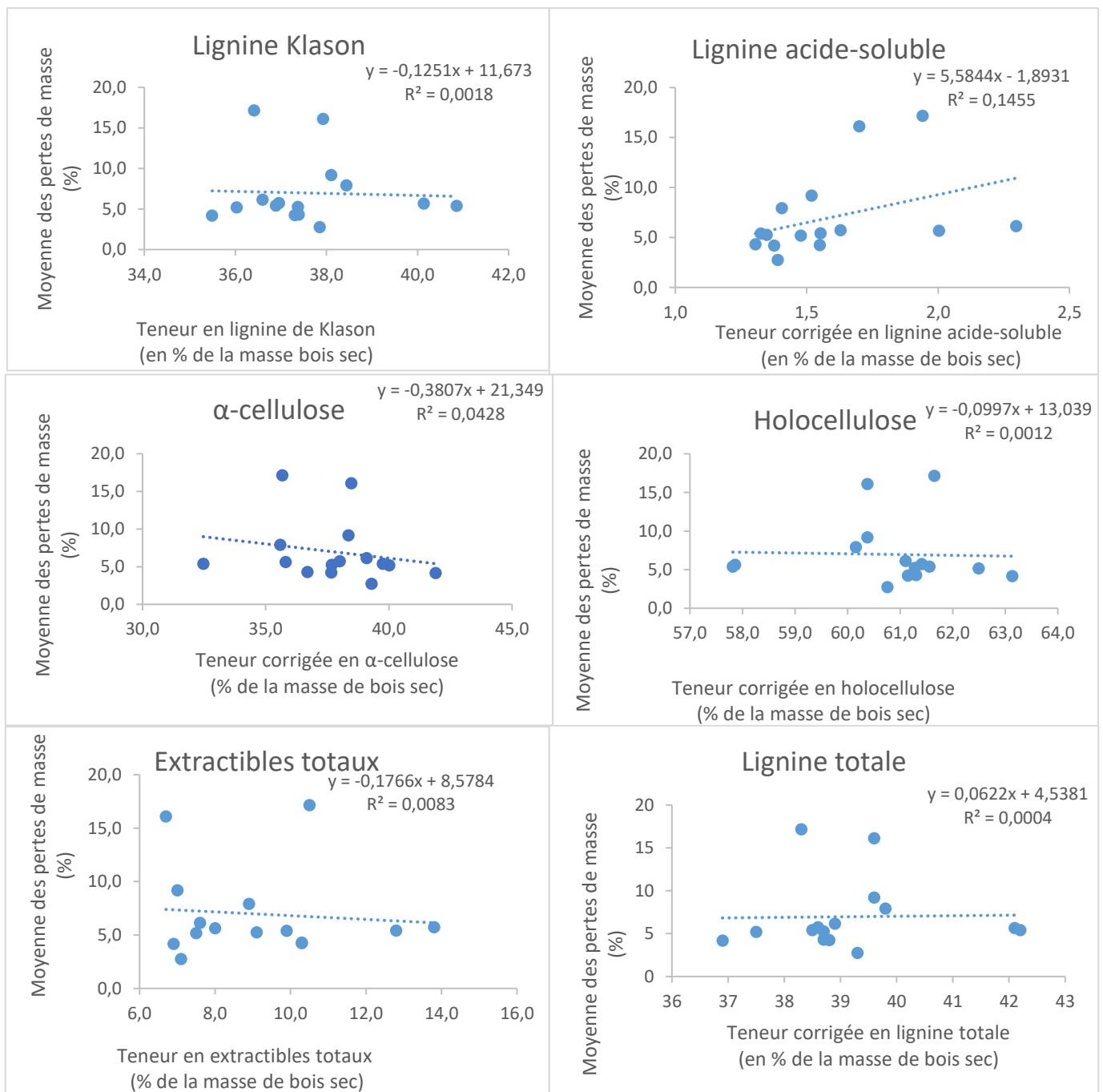


Figure 59: Représentation graphique des corrélations réalisées entre teneurs mesurées en lignines (Klason et acide-soluble), en  $\alpha$ -cellulose, en holocellulose et en extractibles totaux, avec les moyennes de pertes de masse pour 15 individus de l'échantillonnage

## II. La propriété d'infradensité

L'infradensité est un autre facteur susceptible de jouer un rôle dans la durabilité naturelle. Cette propriété permet de rendre compte de la matière lignocellulosique du bois. Dans le cas de cette thèse, la mesure a été réalisée par la méthode du déplacement d'eau. Les mesures ont été

réalisées à partir d'une éprouvette de bois, issue du duramen externe pour les 15 individus de l'échantillonnage.

### 1. Résultats des mesures en infradensité

Les résultats des mesures d'infradensité sont présentés dans le **Tableau 15**. Les valeurs mesurées varient de 0,52 pour l'individu de plantation A8 à 0,75 pour l'individu normal Cim 01.

**Tableau 15: Mesures d'infradensité pour les 15 individus de l'échantillonnage**

Individu	Infradensité
A0	0,64
A1	0,65
A2	0,63
A3	0,73
A5	0,65
A6	0,65
A7	0,66
A8	0,52
A9	0,72
HP3	0,73
Cim 01	0,75
Cim 02	0,66
Cim 09	0,64
Cim 11	0,67
Cim 13	0,60
Moyenne	0,66

### 2. Variabilité de l'infradensité en fonction du type architectural des individus

Les valeurs d'infradensité ont été évaluées au regard du type architectural avec le test statistique de Mann Whitney. L'analyse des résultats montre une différence significative uniquement entre les individus normaux et les individus de plantations, avec une p-value de 0,039 (**Tableau 16**). La teneur moyenne en infradensité pour les individus de plantation (0,60) est inférieure à celle des individus normaux (0,66). Les individus de plantations sont tous âgés de 30 ans et sont beaucoup plus jeunes que les individus normaux, bien qu'il ne soit pas possible de déterminer avec exactitude leur âge.

Tableau 16: Résultats des p-values obtenues après comparaison des groupes architecturaux en fonction des valeurs d'infradensité

	Plantation	Normal	Sénescent
Plantation	1	0,039	0,250
Normal	0,039	1	0,508
Sénescent	0,250	0,508	1
Moyenne	0,60	0,66	0,73

### 3. Variabilité de l'infradensité en fonction des classes de durabilité naturelle des individus

Les mesures d'infradensité ont aussi été soumises au test statistique de Mann Whitney, en fonction des 3 classes de durabilités naturelle des 15 individus échantillonnés. Les résultats révèlent une différence significative entre les classes de durabilités naturelle 2 (durable) et 3 (moyennement durable), avec une p-value de 0,039 (

Tableau 17). L'infradensité moyenne des individus durables est significativement supérieure à celles des individus moyennement durables. De même, les individus durables (classe 1) ont un infradensité moyenne significativement supérieure à celle des individus moyennement durables. Il semblerait qu'une forte durabilité naturelle soit associée à une importante infradensité du bois de l'Angélique.

Tableau 17: Résultats des p-values obtenues après comparaison des groupes d'individus par classe de durabilité en fonction des valeurs d'infradensité

	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Classe 1	1	1	0,063
Classe 2	1	1	0,039
Classe 3	0,063	0,039	1
Moyenne	0,67	0,66	0,64

### 4. Recherche de corrélation entre les pertes de masse et les mesures d'infradensité

Une recherche de corrélation entre les mesures d'infradensité et les moyennes des pertes de

masse pour les 15 individus de l'échantillonnage a été réalisée. L'analyse des résultats révèle l'absence de corrélation significative (Figure 60).

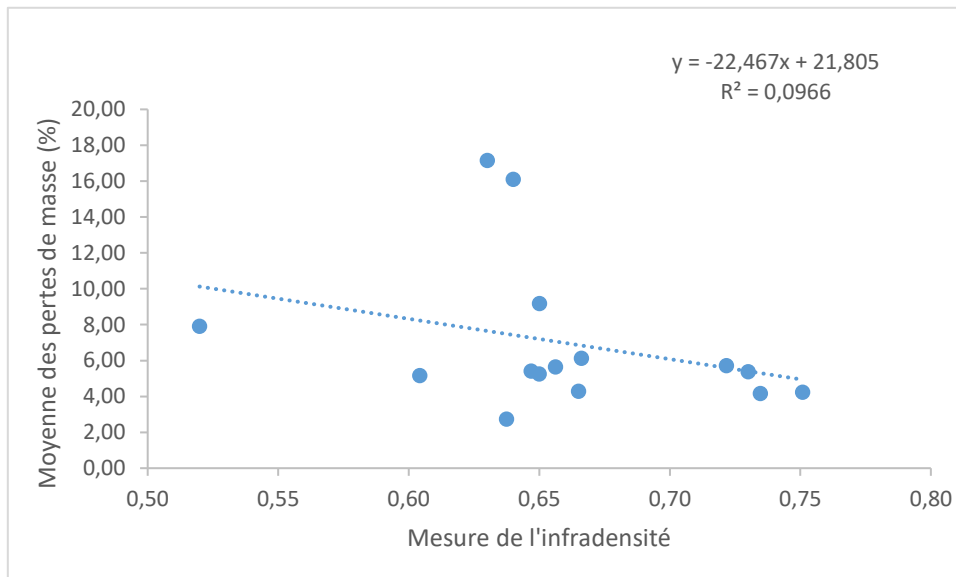


Figure 60: Représentation graphique de la corrélation entre les mesures en infradensité et la moyenne des pertes de masse

En conclusion, dans les parties 1 et 2 du chapitre 2, nous avons identifié plusieurs facteurs potentiels de durabilité naturelle qui ont été mesurés à l'échelle du bois (les extractibles, la lignine Klason et la densité). Pour chacun de ces facteurs, une recherche de corrélation a été réalisée avec les pertes de masse moyenne pour le duramen externe des individus de l'échantillonnage. Nos résultats semblent indiquer que les facteurs intrinsèques au bois ne sont pas suffisant pour appréhender la durabilité naturelle des 15 individus de notre échantillonnage, à l'égard de la microflore du sol. En effet, parmi l'ensemble des corrélations que nous avons pu effectuer, aucun des facteurs sélectionnés n'étaient corrélés à la durabilité naturelle. Ces résultats indiquent également la nécessité de prendre en compte d'autres facteurs de durabilité naturelle, notamment ceux mesurés à l'échelle de l'arbre, en intégrant des descripteurs qui reflètent au mieux son développement (la hauteur H, le diamètre à hauteur de poitrine DBH, le ratio H/DBH et les proportions en aubier et en duramen).

### ***Partie 3 : Modèle linéaire explicatif de durabilité naturelle***

Cette dernière partie permet d'évaluer le ou les facteurs qui sont impliqués dans la durabilité

naturelle du bois de l'Angélique. Pour cela, les facteurs intrinsèques au duramen externe (teneurs en extractibles et activité biologiques associées, teneurs en macromolécules et infradensité) ainsi que ceux propres à l'arbre (hauteur, diamètre, rapport H/DBH, proportion d'aubier et de duramen) ont été utilisés comme covariables pour établir le modèle explicatif de durabilité naturelle de l'Angélique. Les facteurs ont été mesurés pour les individus de l'échantillonnage, en un seul exemplaire sauf pour les teneurs en composés phénoliques totaux et les activités antiradicalaires, mesurés en 3 exemplaires par individu. Les teneurs en tryptamine et alcaloïdes, ayant été mesurées pour 9 individus uniquement n'ont pas été incluses au modèle.

### I. Réduction du nombre de covariables

La matrice de corrélation est présentée en Figure 61. L'analyse de cette matrice met en évidence une corrélation significative ( $p$ -value < 0,05) entre plusieurs covariables. En effet, les variables PT (polyphénols totaux) ET (extractibles totaux) et AA (activité antiradicalaire) sont positivement corrélées entre elles, de même que les covariables H (hauteur) et DBH. La Lignine est négativement corrélée à LAS (lignine acide soluble) et AC ( $\alpha$ -cellulose) ce qui est aussi le cas de l'Aubier et Duramen qui sont négativement corrélés entre elles.

À partir de cette matrice, il est possible d'établir une première sélection de 7 covariables : **ET** (très corrélé avec AA et PT), **Lignine** (très corrélé avec AC ou LAS), **DBH** (corrélé avec H), **Duramen** (très corrélé avec Aubier), **H.D** (rapport H/DBH), **HL** (holocellulose) et **ID** (infradensité).

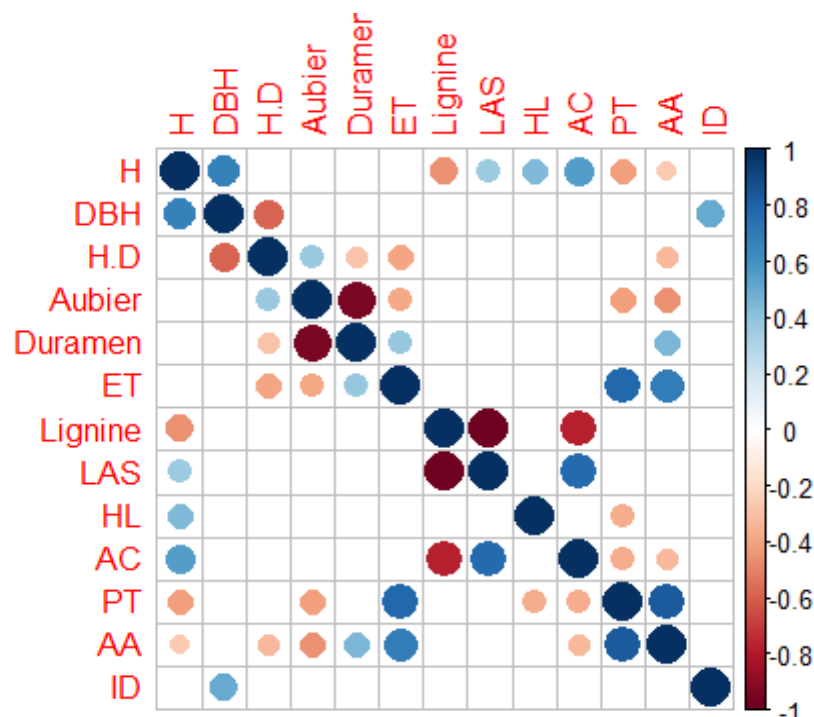


Figure 61: Matrice de corrélations pour les 13 covariables quantitatives mesurées chez 15 individus de l'échantillonnage ; H :hauteur, DBH : diamètre à hauteur de poitrine ;H.D : rapport H/D, ET :extractibles totaux, Lignine :lignine Klason, LAS :lignine acide-soluble, HL :holocellulose ; AC : $\alpha$ -cellulose, PT :polyphénols totaux, AA :activité antiradicalaire et ID : infradensité.

Le cercle de corrélation (Figure 62) permet de visualiser les relations entre toutes les covariables en simultanée, et non pas deux à deux comme une matrice de corrélation. Les PC1 et PC2 représentent près de 56% de la variance totale. L'analyse des résultats indiquent que la PC1 est portée par les covariables AA et PT et la PC2 par le DBH et le Duramen. Au contraire, les variables les moins contributives sont HL, ID, H.D et LAS de couleurs bleues foncées. Suivants ces deux axes, les variables ET, PT et AA sont positivement corrélées entre elles. De même, AC et H sont positivement corrélées entre elles mais sont toutes deux négativement corrélées à la lignine. Enfin, le Duramen et l'Aubier sont négativement corrélés. Les résultats du cercle de corrélation de l'ACP sont cohérents avec ceux obtenus avec la matrice de corrélation, notamment pour les covariables ET, PT et AA, Aubier et Duramen et les covariables Lignine et AC. Par conséquent, les covariables qui seront retenues pour le modèle sont les suivantes : **DBH**, **Duramen** (ou Aubier), **ET** (interchangeable avec PT ou AA) et **Lignine** (interchangeable avec AC).

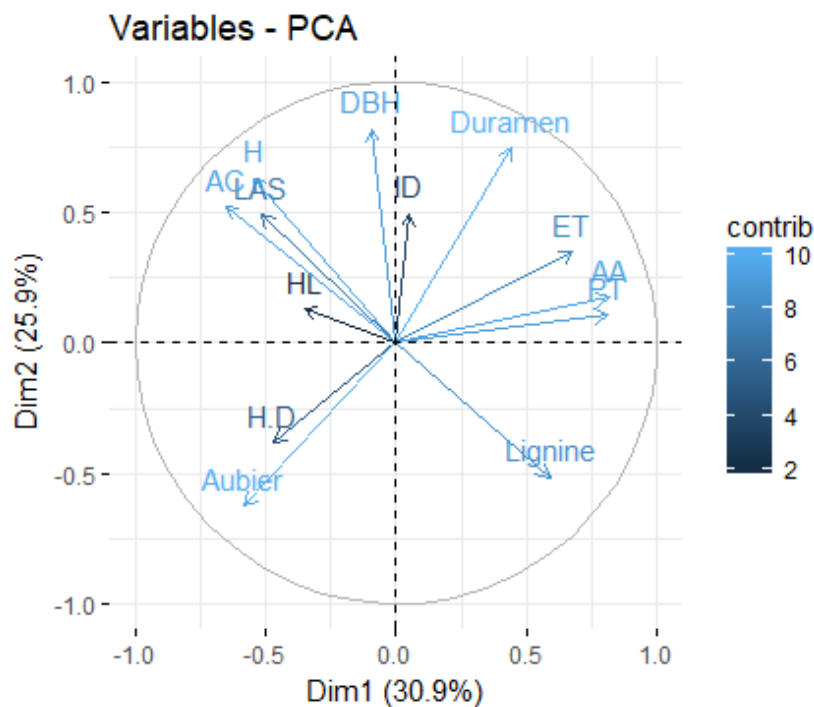


Figure 62:Cercle de corrélation des variables de l'ACP sur les axes PC1 et PC2 ;les couleurs des variables indiquent la part de contribution dans la variance expliquée (bleu foncé : variable la moins contributive et bleu clair : variable la plus contributive)



## II. Construction du modèle linéaire explicatif de durabilité naturelle

Plusieurs modèles linéaires ont été construits à partir des covariables précédemment sélectionnées par la matrice de corrélation et l'ACP. Le modèle le plus performant a ensuite été sélectionné selon le critère AIC. Les covariables AA et PT ont fait l'objet de trois mesures par individus. Pour tenir compte de cela, un effet aléatoire a été ajouté sur les individus dans les modèles faisant intervenir ces covariables.

### 1. Modèle linéaire sans effet aléatoire

La significativité des covariables ET, Lignine, DBH et Duramen a d'abord été évaluée. Les résultats révèlent que seul la covariable Duramen est significative, avec une p-value de 0,0137. Si la covariable Lignine est remplacée par AC, la valeur de la p-value du Duramen augmente et passe à 0,0451. Aussi dans le modèle linéaire ET, Lignine, DBH et Aubier, l'Aubier qui remplace le Duramen est la seule covariable significative (p-value de 0,0173). Pour s'assurer de ce résultat, le modèle ET, Lignine, DBH et Duramen (dont la covariable est la plus significative) a été soumis à la méthode de sélection selon le critère AIC. Le modèle le plus performant est composé uniquement par la covariable Duramen. Avec ce modèle, 51 % de la variance de la perte de masse est expliquée par la proportion en duramen.

### 2. Modèle linéaire avec effet aléatoire

La significativité des covariables PT, Lignine, DBH et Duramen a été évaluée. De nouveau, seule la covariable Duramen est significative, avec un p-value de 0,0354. En remplaçant la covariable Lignine par AC dans le modèle, aucune variable n'est significative. Avec l'Aubier à la place du Duramen, la valeur du p-value passe à 0,0449. De même, dans le modèle PT, AC, DBH et Aubier, seul l'Aubier est significatif, avec une p-value de 0,0451. Néanmoins, dans le cas du modèle AA, Lignine, DBH et Duramen, aucune des variables n'est significative. Le même constat a été réalisé en remplaçant la variable Duramen par l'Aubier dans le modèle. Le modèle PT, Lignine, DBH et Duramen dont la significativité est la plus faible, a été soumis à la méthode de sélection basée sur le critère AIC. Comme pour le modèle sans effet aléatoire, le modèle le plus performant a été obtenu uniquement avec le Duramen.

En conclusion, la proportion en duramen ou en aubier est le seul facteur qui est significativement corrélé à la durabilité naturelle du bois de l'Angélique. Par conséquent, il est possible d'expliquer la durabilité naturelle et donc, sa variabilité à l'égard des champignons lignivores par la proportion en aubier externe ou en duramen externe. Ce résultat est surprenant, car aucun facteur intrinsèque du duramen de l'Angélique, notamment la chimie du bois n'a été retenu par le modèle explicatif.

### Chapitre 3: Proposition d'outils spectroscopiques pour la prédiction de la durabilité naturelle

Le chapitre 1 a confirmé l'existence de la variabilité de la durabilité naturelle du duramen de l'Angélique à l'égard des champignons lignivores. Cette variabilité implique la prédiction de la propriété de durabilité naturelle. Dans ce chapitre, la spectroscopie infrarouge, précisément le moyen et proche infrarouge (PIR et MIR), ont été choisis en tant que méthodes alternatives aux essais de durabilité naturelle très chronophages. Le but de ces travaux est de montrer la faisabilité de la spectroscopie infrarouge en tant que méthodes prédictives dans le cas de *D. guianensis*. Bien que la PIR ait largement été sollicité comme méthode de prédiction pour de nombreuses propriétés du bois dont la durabilité naturelle, le MIR a été utilisé pour la première fois à cet effet dans cette thèse. La prédiction par ces deux méthodes repose sur la recherche de corrélation entre les spectres infrarouges (PIR, MIR et PIR/MIR combinés) et les pertes de masse pour le duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage. La performance de ces deux méthodologies, basée sur l'intensité de la corrélation entre les spectres et les pertes de masse, permettront de mettre en évidence la méthode la plus adéquate pour prédire la durabilité de l'Angélique.

Le chapitre 3 correspond à une publication scientifique prête à soumission. Il est par conséquent rédigé en anglais dans ce manuscrit de thèse.

Comparison of near infrared (NIR) and mid infrared (MIR) spectroscopy to study the decay resistance of Amazonian wood species *Dicorynia guianensis*  
Amsh.

Claudiane Flora<sup>1</sup>, Yannick Estevez<sup>1</sup>, Marie-France Thevenon<sup>2,3</sup>, Christophe Duplais<sup>1</sup>, Nadine Amusant<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR8172 EcoFoG, AgroParisTech, Cirad, CNRS, INRA, Université des Antilles, Université de Guyane, Campus agronomique, Avenue de France, 97310 Kourou, France

<sup>2</sup>CIRAD, UR BioWooEB, TA B 114/16, 73 rue Jean-François Breton, F34398, Montpellier Cedex 5, France

<sup>3</sup>BioWooEB, Univ. Montpellier, CIRAD, Montpellier, France

## Abstract

Near infrared spectroscopy is one of the most efficient method for predicting wood decay resistance. In the context of developing novel spectroscopic tools for forestry research and management, the present study compares near infrared (NIR) and mid infrared (MIR) spectroscopy for studying the wood decay resistance of *Dicorynia guianensis*, an Amazonian tree species, which has variable decay resistance properties. MIR spectroscopy was employed for the first time for this purpose in wood science. Three optimal NIR-, MIR-, and NIR/MIR-Partial Least Squares regression models (PLS) were tested. All PLS models provide high coefficients of determination using NIR ( $R^2_{cv} = 0.93$ ), MIR ( $R^2_{cv} = 0.89$ ) and combined NIR/MIR ( $R^2_{cv} = 0.89$ ) spectral data. Overall our results show that NIR and MIR spectroscopy provide reliable analyses in our model thus suggesting that, in future, all three models (NIR-, MIR- and NIR/MIR-PLS) should be used when testing wood decay resistance of other species in order to provide the best predictive tools in forestry.

Keywords: *Dicorynia guianensis*, IR spectroscopy, decay resistance, predictive model

## Introduction

Near infrared spectroscopy (NIR) is one of the most useful methods for predicting a wide array of wood properties in biomaterials science. NIR spectroscopy provides chemical fingerprinting of wood samples by measuring the vibration of chemical bonds of wood molecular components. Applying chemometrics in wood science using NIR spectroscopic chemical data is a straightforward, cost-effective and non-destructive approach to assess and predict wood properties (Tsuchikawa and Kobori 2015). NIR spectroscopy has been successfully used for evaluating wood density (Santos et al. 2012), extractive contents (Alves *et al.* 2012; Gierlinger *et al.* 2002; Niamké *et al.* 2014; Taylor *et al.* 2011), decay resistance (Chaix *et al.* 2008), quality control and for classification assessment (Tsuchikawa and Kobori 2015). NIR spectrum region ( $13400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) provides information about molecular overtone and combination vibration mainly associated with C-H, N-H and O-H bonds which are correlated to some extent to various wood properties (Schwanninger *et al.* 2011; Stuart 2004). Although NIR spectroscopy generates spectra of broad, overlapping and low intensities bands that do not allow the structural determination of wood components, this analytical method is broadly used in materials science to develop novel predictive models.

On the other hand, mid infrared spectroscopy (MIR) is generally used to monitor specific processes by comparing the chemical profiles of woods before and after modifications induced

by heat, photo or biodegradation (Nuopponen *et al.* 2005; Tondi *et al.* 2013). MIR spectroscopy provides structural information that contributes to characterizing the structure of macromolecules and extractives as well as measuring wood density (Chen *et al.* 2010; Nuopponen *et al.* 2006; Rana *et al.* 2009; Schwanninger *et al.* 2004; Tondi and Petutschnigg 2015). Although methods combining MIR spectroscopy and chemometrics seem relevant to studying wood decay resistance, it is surprising that only one study has reported this approach for the prediction of *Quercus agrifolia* individuals trees susceptibility to pathogen infection (Conrad and Bonello 2016; Conrad *et al.* 2014).

Unlike NIR spectroscopy, MIR analysis measures fundamental bond vibrations (stretching, bending and deformation) in the spectral region of 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  with the major disadvantage of having strong water absorption (Conrad and Bonello 2016; Stuart 2004). MIR spectroscopy is considered as very informative for fingerprinting wood macromolecules and extractives and can therefore be used in decay resistance prediction.

In order to compare NIR and MIR spectroscopy for the prediction of wood decay resistance, we selected the Amazonian *Dicorynia guianensis* tree species which has variable decay resistance properties, from very to moderately durable and is resistant to fungal pathogens (Amusant *et al.* 2004; Bonjour 1996; Déon 1980). *D. guianensis*, is a relevant model as it represents 55% of the wood production in French Guiana. As far as the chemical composition of *D. guianensis* wood is concerned, several alkaloids including tryptamine and monoterpene indole alkaloids have been isolated in heartwood (Anouhé *et al.* 2015). Since many alkaloids have antifungal activities, these wood extractives could be considered as putative biomarkers of decay resistance (Marinho *et al.* 2016).

In this study, we performed correlations of NIR or/and MIR spectral data with mass loss values obtained from decay resistance bioassays using soil microflora as a wood biodegrading agent. Separated or combined NIR and MIR spectroscopic data were tested in chemometrics to identify the best predictive model. Additionally, a pure tryptamine compound was added to the wood sawdust to better understand the influence of alkaloids in *D. guianensis* heartwood decay resistance using IR spectroscopy analysis. Overall, this work tackles the problem of inter-individual variabilities in *D. guianensis* decay resistance with the aim of investigating the development of a useful predictive method for the wood industry in French Guiana.

## **Material and methods**

### Plant material

Wood samples were collected between 2011 and 2016 from 12 *Dicorynia guianensis* Amsh. tree individuals (N=12) in the natural forest of the Paracou experimental station (5°18'N, 52°23' W; Kourou, French Guiana). The selected trees have contrasted architectural characteristics that reflect variations in crown position, structure and fragmentation degree, height, section diameter at Diameter at Breast Height (DBH: from 30.5 to 62.1 cm) and branch mortality (according to the model used by Rutishauser et al. 2011). Based on these architectural characters, the selected individuals can be grouped into 2 categories: normal trees (A0, A1, A5, A6, Cim 01, Cim 02, Cim 09, Cim 11 and Cim 13) and mature trees (A3, A9 and HP3). Normal trees are representative trees of the species (adult, without damage and with an intact crown) and mature trees are old individuals with high level of crown fragmentation.

### Sampling

From each logged tree, two boards of outermost heartwood (dimension 60 x 50 x 620 mm T, R, L) were longitudinally cut at diameter breast for the decay bioassay (board A) and the chemical analysis (board B) respectively. A boards were cut longitudinally to obtain three replicates of wood block samples (5 × 10 × 100 mm, T, R, L) that were conditioned in a climatic room set at 20 °C and 65 % relative humidity. B boards were ground into powder (200 µm particle size) using an ultra-centrifugal mill (Retsch ZM 200) and also stocked in a climatic room set at 20 °C and 65 % relative humidity.

### Wood decay tests

Decay resistance tests of wood block samples were carried out according to XP CEN/TS 15083-2 (2006) guidelines. A total of 36 wood samples from 12 trees were used (three replicates per tree). Before decay resistance bioassays, the wood block samples were dried at 103°C. The natural durability was then evaluated by measuring the dry mass at 103°C of wood blocks before and after 6 months of exposure to the soil collected in Paracou forest. This soil has a microflora composed of soil inhabiting micro-organisms, including soft rots. Nine wood block samples of *Virola michelii*, a nondurable tropical wood species, were used to control the virulence of the soil microflora (Amusant *et al.* 2014). Mass losses were between 48.0 % and 55.6 % concerning the wood block samples of *Virola michelii* in our soil bed test. Mass losses were expressed as the median of 3 measurements for each tree and were divided by the median mass loss of the wood reference, resulting in a ratio referred to as “x value” (Gierlinger *et al.* 2003). The classification of the wood’s natural durability was determined according to the EN 350 standard (2016): very durable ( $x \leq 0.10$ ), durable ( $0.10 < x \leq 0.20$ ) and moderately durable

( $0.20 < x \leq 0.45$ ).

#### Preparation of tryptamine impregnated samples

To characterize *D. guianensis* extractives using infrared spectroscopy, we compared IR spectra of treated samples impregnated with different quantities of tryptamine and untreated samples. Heartwood sawdust (1.0 g, 200  $\mu\text{m}$  particle size) of normal tree A5 was soaked into 10 mL of different ethanolic solutions of tryptamine (CAS: 61-54-1; Sigma-Aldrich) of 0.5, 1 and 2 % w/w concentrations respectively. The impregnated sawdust samples were kept for one week at room temperature (25°C) with daily manual stirring (2 min) until the solvent had completely evaporated.

#### Near infrared spectroscopy (NIRS)

NIR spectra of outermost heartwood from the 12 *D. guianensis* tree individuals were recorded on a Bruker Multi-Purpose Analyzer FT-NIR spectrometer. Spectral acquisitions were performed from a 12,500  $\text{cm}^{-1}$  to 3500  $\text{cm}^{-1}$  range with an 8  $\text{cm}^{-1}$  resolution. Approximately 2 g of sawdust were placed in a glass vial and 20 scans were collected using integrating spheres (measurement of diffuse reflection). For each tree, three sawdust samples were measured three times and the mean spectra was used in chemometric analysis.

#### Attenuated total reflectance - Fourier transform- mid infrared spectroscopy (ATR-FT-IR)

The same samples were used for NIR and MIR spectroscopic analysis. MIR range spectra were collected on a Tensor 27 FT-IR spectrometer (Bruker) equipped with diamond lens Attenuated Total Reflectance module (ATR) from 4000  $\text{cm}^{-1}$  to 400  $\text{cm}^{-1}$  at 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution. Thirty-six scans were recorded and averaged for each spectrum. Each wood sawdust sample was measured three times with three samples per tree and the mean spectra was used in chemometric analysis.

#### Chemometric analysis

NIR and MIR spectra were analyzed with Unscrambler software package version 9.8 (Camo AS, Oslo, Norway) to perform a partial least squares (PLS) calibration model. PLS regressions were generated using mass losses as variables to reflect the decay resistance of *D. guianensis* wood samples. Spectral pretreatment was carried out before chemometric analysis in order to eliminate uncontrolled effects and to improve model accuracy: data reduction, standard normal variate (SNV), multiplicative scatter correction (MSC), Savitzky-Golay first derivative, etc. Pretreatments were compared to select the optimal one. NIR and MIR spectra were processed separately but were also combined so that three data matrices were generated for the

chemometric analyses. The cross-validation approach was used to develop a PLS calibration model and to test the predictive performance of this model. No outliers were excluded in the model construction. The optimal number of latent variables (LVs) was determined during the cross-validation procedure by comparison between curves of SEC and SECV with number of latent values. A selection of variables was also performed in combination with the VIP (Variable Importance in the Projection) scores to eliminate non-informative variables and simplify the calibration PLS model. VIP scores indicated the importance of the variables in the PLS model. Overall, the overfitting or underfitting of the model was avoided. The selection of variables based on VIP score was implemented in Tanagra 1.4.24 software.

To assess the cross-validation results, the following statistical parameters were used: coefficient of determination for calibration ( $R^2_{cal}$ ), coefficient of determination for cross-validation ( $R^2_{cv}$ ), standard error of calibration (SEC), standard error of cross validation (SECV) and ratio of performance to deviation (RPD) based on SECV. A higher RPD value indicate a good probability of the model to accurately predict the wood decay resistance (Aleixandre-Tudo et al. 2018).

## Results

### Decay resistance variability of *D. guianensis* heartwood

According to the natural durability classification defined by the EN 350 European standard (2016), 33 % of *D. guianensis* heartwood samples were classified as very durable ( $x \leq 0.10$ ), 50 % of were durable ( $0.10 < x \leq 0.20$ ) and 17 % were moderately durable ( $0.20 < x \leq 0.45$ ) (Table 1). These results confirmed the high variability of wood decay resistance of *D. guianensis* individuals collected in the same geographical area as previously observed (Amusant *et al.*, 2004).

**Table 1:** Natural durability assessment of *D. guianensis* heartwood

Tree reference	Mean mass losses (%)	Standard deviation (%)	$x$ value <sup>a</sup>	Classification <sup>b</sup>
A0	16.1	0.70	0.41	Moderately durable
A1	9.19	0.60	0.23	Moderately durable
A5	5.25	0.16	0.11	Durable
A6	5.41	0.25	0.11	Durable
A3	5.39	0.40	0.14	Durable

HP3	4.18	0.81	0.12	Durable
Cim 02	5.65	0.65	0.11	Durable
Cim 11	6.14	1.06	0.12	Durable
Cim 01	4.24	0.16	0.08	Very durable
Cim 09	2.75	0.21	0.05	Very durable
Cim 13	5.18	0.11	0.10	Very durable
A9	5.73	0.73	0.10	Very durable

<sup>a</sup> Median mass losses of the three wood blocks test divided by the median mass losses of the reference wood blocks

<sup>b</sup> According to the norm EN 350 (2016)

#### PLS regression models to estimate wood decay resistance

Table 2 shows the results of the PLS calibration and validation models using NIR, MIR and combined NIR/MIR spectral data. The best NIR-PLS model was obtained using no pretreatment in the spectral region of 9993  $\text{cm}^{-1}$  to 7250  $\text{cm}^{-1}$  and 6500  $\text{cm}^{-1}$  to 5700  $\text{cm}^{-1}$ . The vibrational bands between 9993  $\text{cm}^{-1}$  to 7250  $\text{cm}^{-1}$ , which are often used for multivariate calibration, are related to first and second overtones of O-H and N-H bonds, first overtones of C-H combinations bands and second and third overtones of C-H, C<sub>ar</sub>-H and N-H bonds. The NIR spectral region at 6500-5700  $\text{cm}^{-1}$  is attributed to aromatic compounds, from extractives and/or lignin (Aleixandre-Tudo *et al.* 2018; Alves *et al.* 2012; Schwanninger *et al.* 2011). The high coefficient of determination of the cross-validated model ( $R^2_{cv} = 0.93$ ) has a RPD value of 4.02 (Figure 1a).

The optimal MIR-PLS model has a lower coefficient of determination ( $R^2_{cv} = 0.89$ ) and RPD value (Table 2, Figure 1b). It was obtained using the SNV pre-treatment for the spectral range of 1500  $\text{cm}^{-1}$  to 399  $\text{cm}^{-1}$ . The MIR spectra range from 1500  $\text{cm}^{-1}$  to 399  $\text{cm}^{-1}$  represents the spectral region that is the most correlated to wood decay resistance. The spectrum region is representative of complex deformations of wood molecular components such as cellulose, lignin and extractives. Detailed bands and bond vibrational assignments are listed in Table 2: PLS regression models for the estimation of decay resistance using NIR, MIR and NIR/MIR spectral data

Calibration	Cross -validation
-------------	-------------------



Spectral data	Pre-treatment	N samples	LVs <sup>a</sup>	SEC <sup>b</sup> (%)	R <sup>2</sup> <sub>cal</sub> <sup>c</sup>	SECV <sup>d</sup> (%)	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub> <sup>e</sup>	RPD <sup>f</sup>
NIR	None	36	10	0.16	0.99	0.86	0.93	4.02
MIR	SNV	36	8	0.52	0.97	1.08	0.89	3.17
NIR/MIR	None	36	8	0.67	0.95	1.10	0.89	3.12

<sup>a</sup>Latent variables. <sup>b</sup>Standard error of calibration. <sup>c</sup>Coefficient of determination for calibration. <sup>d</sup>Standard error of cross validation. <sup>e</sup>Coefficient of determination for cross validation. <sup>f</sup>Ratio of performance to deviation.

**Table 3** (Aleixandre-Tudo *et al.* 2018 ; Chen *et al.* 2010 ; Nuopponen *et al.* 2006; Stuart 2004; Tondi and Petutschnigg 2015). Regions containing strong water absorption bands (1717-1543 cm<sup>-1</sup>; 3742- 2971cm<sup>-1</sup>) and information not relevant for the MIR-PLS model performance (2701-1813 cm<sup>-1</sup>) have been removed in this study (Romera-Fernández *et al.* 2012).

The best combined NIR/MIR PLS model was obtained without pretreatment and has the same coefficient of determination as obtained for MIR-PLS model (R<sup>2</sup><sub>cv</sub> = 0.89) and a RPD value of 3.12 (Table 2, Figure 1c). The variables that improve the predictive performance of the model are bands in the spectrum regions of 9993-7250 cm<sup>-1</sup>, 1459-1434 cm<sup>-1</sup>, 1294-1251 cm<sup>-1</sup>, 1219-1174 cm<sup>-1</sup>, 1089-927 cm<sup>-1</sup>, 449-443 cm<sup>-1</sup> and 408-399 cm<sup>-1</sup>.

**Table 2:** PLS regression models for the estimation of decay resistance using NIR, MIR and NIR/MIR spectral data

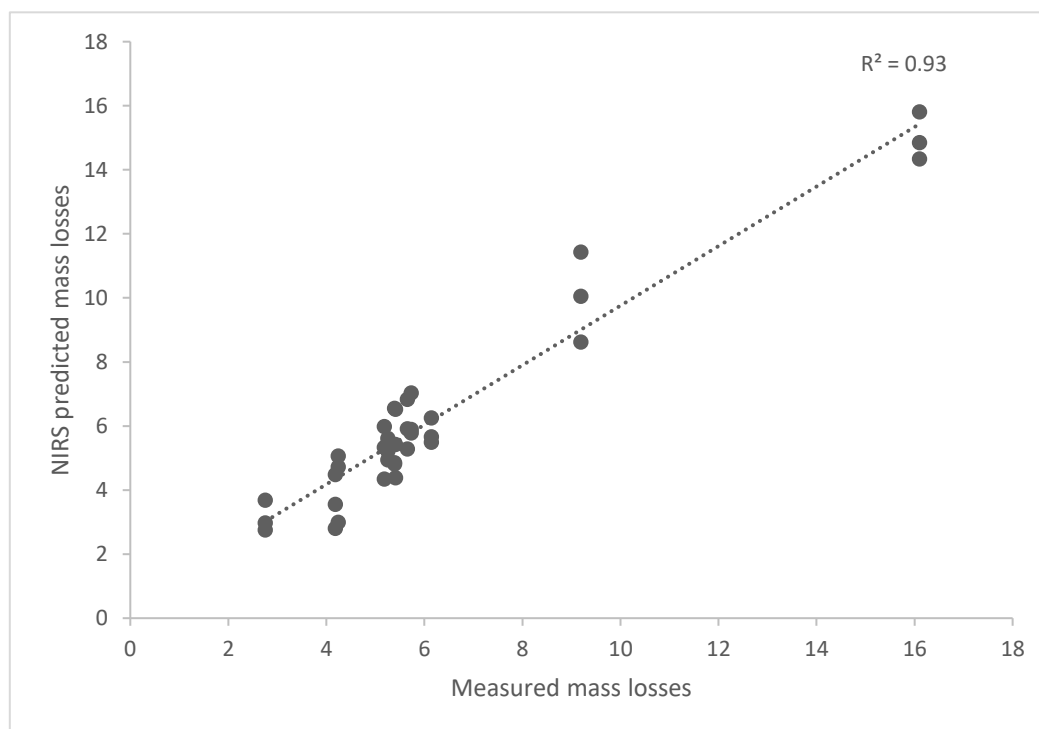
Spectral data	Pre-treatment	N samples	LVs <sup>a</sup>	Calibration		Cross -validation		RPD <sup>f</sup>
				SEC <sup>b</sup> (%)	R <sup>2</sup> <sub>cal</sub> <sup>c</sup>	SECV <sup>d</sup> (%)	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub> <sup>e</sup>	
NIR	None	36	10	0.16	0.99	0.86	0.93	4.02
MIR	SNV	36	8	0.52	0.97	1.08	0.89	3.17
NIR/MIR	None	36	8	0.67	0.95	1.10	0.89	3.12

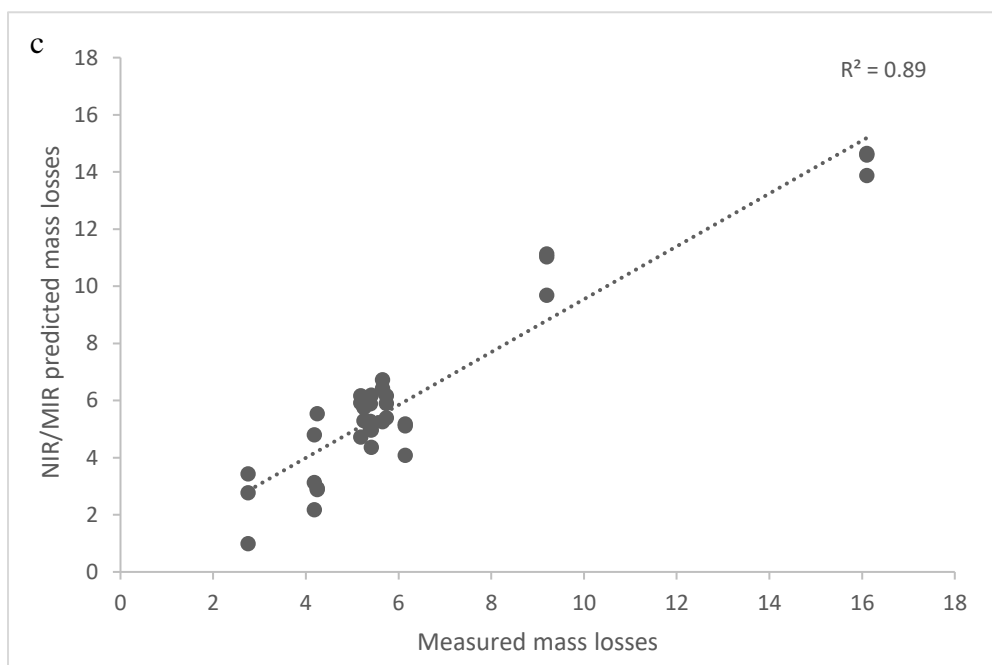
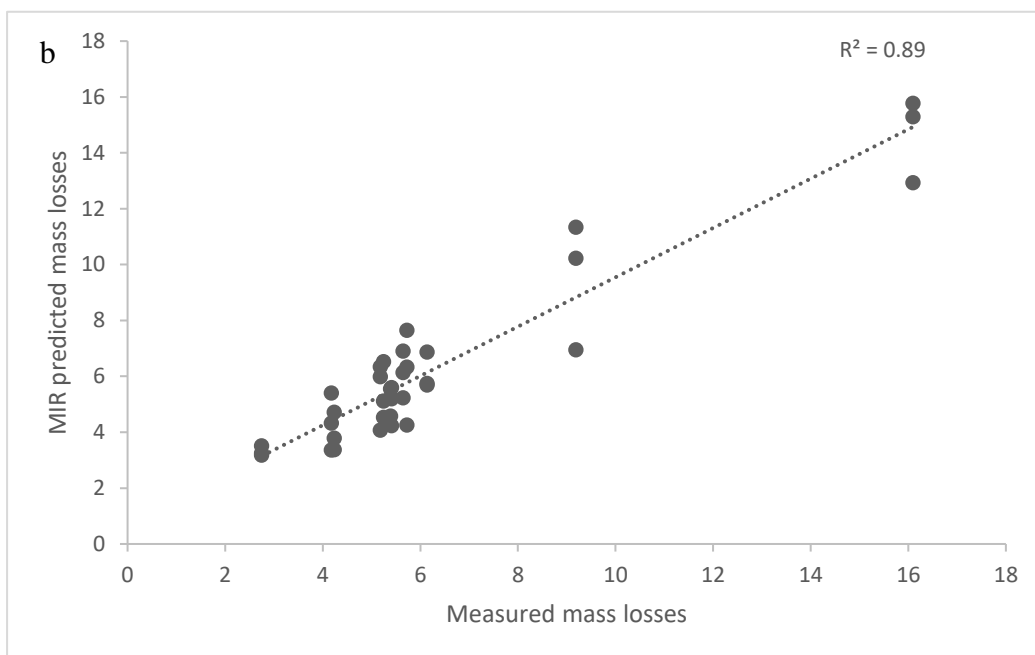
<sup>a</sup>Latent variables. <sup>b</sup>Standard error of calibration. <sup>c</sup>Coefficient of determination for calibration. <sup>d</sup>Standard error of cross validation. <sup>e</sup>Coefficient of determination for cross validation. <sup>f</sup>Ratio of performance to deviation.

**Table 3:** Assignment of MIR bands correlated with wood decay resistance

Bands (cm <sup>-1</sup> )	Functional groups and vibration mode	Wood component
1461	CH <sub>2</sub> deformation	Lignin and cellulose
1452	C-H bending asymmetric, C-C stretching of ring B and C-O stretching	Extractives
1422	C-H in plane deforming and stretching	Aromatic skeletal
1370	C-H bending symmetric and O-H bending	Extractives
1262	C-O stretching	Extractives
1233	C-C, C-O and C=O stretching	Lignin
1099	C-H bending	Extractives
1028	C-O deformation, C=O stretching and C-H in plane deformation	Lignin and cellulose
897	C-H stretching out of plane of aromatic ring	Lignin
670	C-O bending out of plane, C-C-C-O bending	Extractives

a





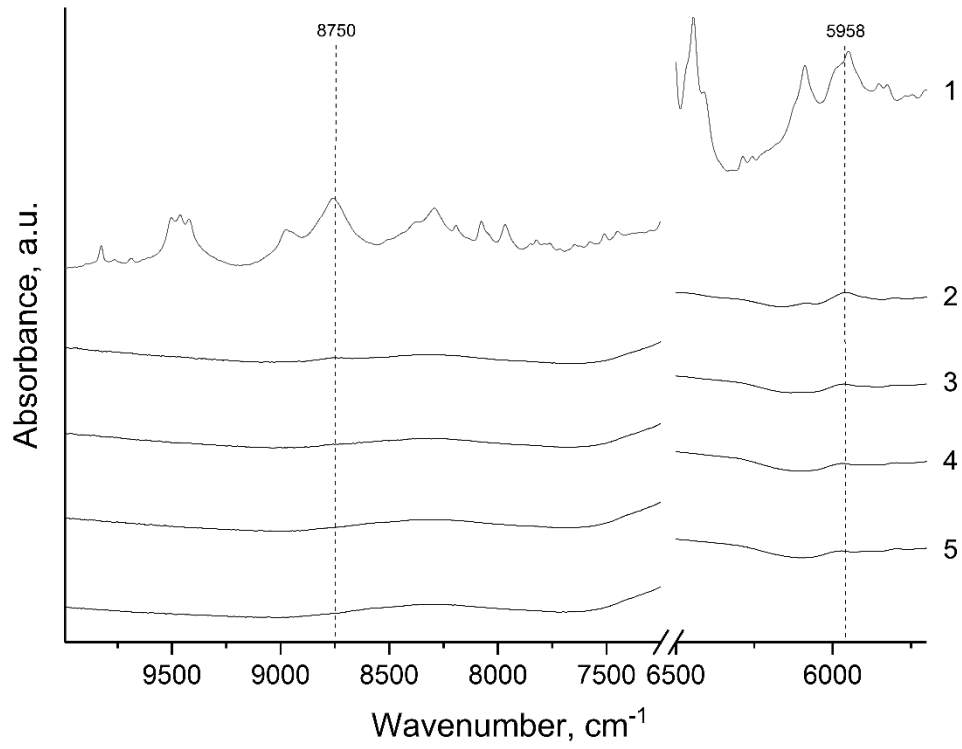
Correlations between mean mass losses from decay test and mass losses predicted by NIR (a) and MIR (b) spectroscopy and combined NIR/MIR spectral data (c)

## Role of extractives: the case of tryptamine

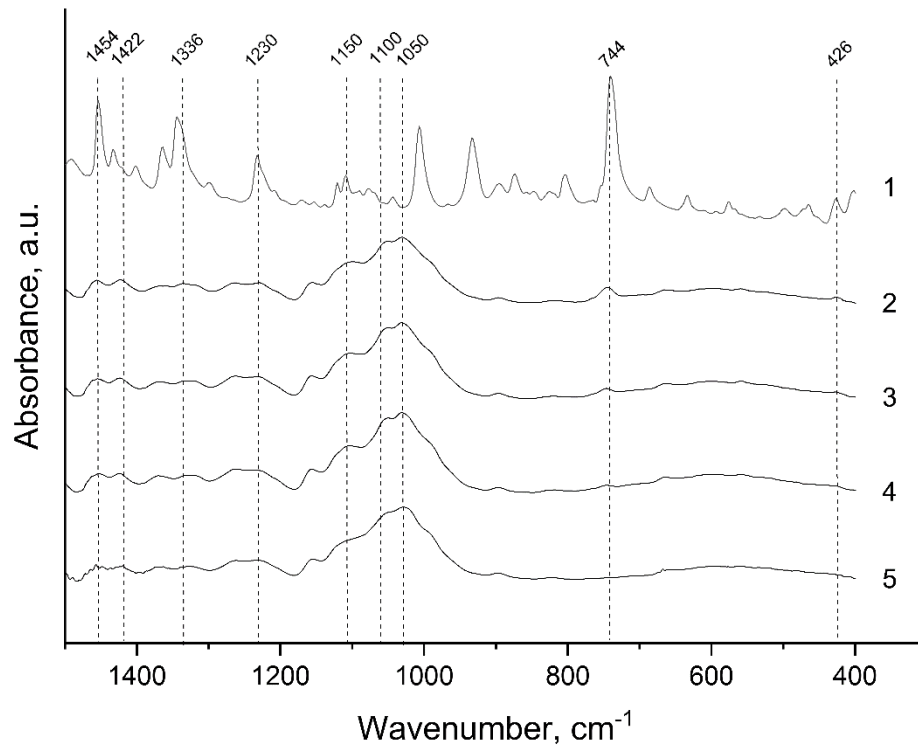
Tryptamine is the major indole alkaloid isolated in *D. guianensis* heartwood (Vanbellinggen et al. 2016) and this metabolite could play a role in *D. guianensis* wood decay resistance. The impregnation of heartwood from the A5 individual with different concentrations of tryptamine produced detectable differences in NIR spectra (Figure 2a). With higher amounts of tryptamine, two peaks of intensity increase significantly at  $5958\text{ cm}^{-1}$  and slightly at  $8750\text{ cm}^{-1}$ , which correspond respectively to the first overtone of aliphatic and aromatic C-H stretching vibrations and to the second overtone of aromatic C-H stretching (Schwanninger *et al.* 2011; Stuart 2004). Interestingly, these two bands have VIP scores greater than one in both NIR-PLS and MIR/NIR-PLS models.

Comparison of MIR spectra (Figure 2b) from sawdust samples treated with higher concentrations of tryptamine show the increase of several bands at  $1454\text{ cm}^{-1}$ ,  $1422\text{ cm}^{-1}$ ,  $1336\text{ cm}^{-1}$ ,  $1230\text{ cm}^{-1}$ ,  $1150\text{ cm}^{-1}$ ,  $1100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $744\text{ cm}^{-1}$  and  $426\text{ cm}^{-1}$ . These mid infrared bands are the N-H stretching bond in the  $1600\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  region and the out-of-plane C-H bending bond in the  $800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  region for heterocyclic compounds characteristics of nitrogen-containing compound. Bands of aromatic and aliphatic C-N stretching amines bonds appear in the  $1360\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  and  $1220\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$  region respectively.  $\text{NH}_2$  wagging and twisting band is found in  $850\text{-}750\text{ cm}^{-1}$  range whereas the band at  $426\text{ cm}^{-1}$  corresponds to C-C bond stretching (Pretsch *et al.* 2000; Schmitt *et al.* 2016; Stuart 2004). Notably four bands at  $1100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $744\text{ cm}^{-1}$  and  $426\text{ cm}^{-1}$  have VIP scores greater than one in the MIR-PLS model only.

a



b



NIR spectra (a) and MIR spectra (b) and MIR spectra of tryptamine (1), tryptamine impregnated wood samples (2: 20 mg.ml<sup>-1</sup>; 3: 10 mg.ml<sup>-1</sup> and 4: 5 mg.ml<sup>-1</sup>; 5: untreated) of *D. guianensis* heartwood at wavelength range selected by PLS models (9993 cm<sup>-1</sup> to 7250 cm<sup>-1</sup>; 6500 cm<sup>-1</sup> to 5700 cm<sup>-1</sup>; 1500 cm<sup>-1</sup> to 399 cm<sup>-1</sup>)

## Discussion

Wood decay resistance is acquired during heartwood formation in which the production of extractives provides a chemical defense for the biomaterial (Taylor *et al.* 2002). In teak wood it has been demonstrated that quinone metabolites play a key role in the natural durability of this species (Niamké *et al.* 2013). In North America, western redcedar (*Thuja plicata* Donn) exhibit high decay resistance related to the presence of thujaplicins, lignans and terpenes in heartwood (Stirling and Morris 2011). Wood density as well as the type and the amount of lignin also contribute to decay resistance property (Gierlinger *et al.* 2003). In this context, inter- and intra-individual variabilities in the decay resistance of temperate and tropical wood species have been reported for *Larix.sp* (Gierlinger *et al.* 2003), *Tectona grandis*, (Chaix *et al.* 2008 ; Moya *et al.* 2014 ; Niamké *et al.* 2014) and *Dicorynia guianensis* (Amusant *et al.* 2004). Since natural durability is one of the main properties that is required for woods and wood based products, it is relevant to develop predictive models for estimating their service life (Brischke *et al.* 2006). As IR spectroscopy is an excellent analytical method that provides information on the vibrational properties of chemical bonds for both extractives and macromolecule components of wood material, this spectroscopic tool combined with chemometrics provide a very useful approach to developing robust predictive models of wood decay resistance.

In the case of *D. guianensis*, the highest coefficient of determination and RPD values ( $R^2_{cv} = 0.93$ ; RPD = 4.02) to predict heartwood decay resistance were observed with the NIR-PLS model. Our results suggest that NIR spectroscopy provides the best PLS model for predicting the decay resistance of *D. guianensis* heartwood against soil microflora. For comparison, NIR-PLS models for other tree species like *Larix.sp* decay resistance against *Poria placenta* ( $R^2_{cv} = 0.85$ ) and *Coniophora puteana* ( $R^2_{cv} = 0.94$ ) (Gierlinger *et al.* 2003), or *Tectona grandis* ( $R^2_{cv} = 0.79$ ) (Chaix *et al.* 2008) give similar results. Whereas, in the case of *Eucalyptus cladocalyx*, the NIR-PLS model was not adapted for evaluating decay resistance after exposure to wood degrading fungi *Fomitopsis lilacino-gilva*, *Perenniporia tephropora* and *Gloeophyllum abietinum* ( $R^2_{cv} = 0.07$ , 0.28 and 0.32 respectively) (Bush *et al.* 2011).

For the first time, here we demonstrate that the MIR-PLS model can provide satisfying results

for predicting wood decay resistance. Indeed, until now, MIR spectroscopy has been mostly used to evaluate wood density and wood chemical composition (Nuopponen et al. 2006). It should be noted that in the case of *D. guianensis*, the NIR-PLS model performed better than the MIR-PLS model. This improved NIR-PLS model can be explained by the larger wavelength range in NIR spectroscopy which holds more chemical information from both macromolecular and extractive wood components. On the other hand, the difference in performance could be due to intrinsic characteristics of NIR and MIR spectroscopic bands in the wavelength spectra, corresponding to overtones/composition bands and vibration bands respectively (Stuart 2004). Overall, NIR- and MIR-PLS models are reliable to estimate *D. guianensis* wood decay resistance but larger sampling remains necessary in order to validate these models.

As NIR and MIR spectroscopy give satisfactory results separately, we attempted to generate a better performing PLS model by combining NIR and MIR spectral data. This strategy was successfully used in the food industry to predict water and oil content in olive fruit samples (Dupuy *et al.* 2010) and for evaluating phenolic acid content in dried ripe fruits of the *Gardenia jasminoides* plant ((Tao *et al.* 2017). Unfortunately, in our study, no improvement was obtained since NIR/MIR-PLS models give similar results as the less performing model (i.e. MIR-PLS model).

The intraspecific decay resistance variability of *D. guianensis* heartwood can be explained by the qualitative or quantitative variation of extractives in the wood, and this variability is inherent to tree age, light environment, genetics (Curnel *et al.* 2008 ; Venäläinen *et al.* 2005) and environmental conditions (Kokutse *et al.* 2010) including those encountered in silviculture (Moya *et al.* 2014). We can assume that the decay resistance of *D. guianensis* heartwood can be correlated to bioactive wood alkaloids, especially tryptamine (Anouhé *et al.* 2015). To demonstrate this assumption, we attempted to identify spectroscopic bands of tryptamine by comparing NIR and MIR spectra of wood samples impregnated with different loading of tryptamine. Interestingly, amongst the eleven bands likely to correspond to tryptamine signal, two NIR bands ( $5958\text{ cm}^{-1}$  and  $8750\text{ cm}^{-1}$ ) and four MIR bands ( $1100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $744\text{ cm}^{-1}$  and  $426\text{ cm}^{-1}$ ) are highly informative spectral variables selected to establish the best band, mainly for NIR- and MIR-PLS models. Although these results demonstrate that tryptamine has a qualitative effect on *D. guianensis* wood decay resistance, it is difficult to evaluate how significant the contribution of this indole alkaloid is without quantitative data. It is likely that other NIR and MIR spectral bands with VIP scores higher than those in PLS models could be attributed to lignin and phenolic compounds especially in these spectral regions (Pretsch *et al.*

2000; Stuart 2004; Tondi and Petutschnigg 2015). However, band assignment and annotation remain tricky because of the overlapping between the spectroscopic bands of lignin, phenolic compounds and indole alkaloids.

## **Conclusion**

In this study, we have investigated the feasibility of using IR spectroscopy to assess the wood decay resistance of *D. guianensis*. Our strategy was to use a chemometrics approach of either NIR or MIR or combined spectral data to develop a predictive PLS model. All models were performed with parameter optimization including spectra preprocessing and VIP variables selection. Overall the highest RPD value and coefficient of determination was obtained using NIR-based models and supports the need of additional experiments to validate the robustness of this predictive model. For the first time, MIR and combined NIR/MIR spectra were used in combination with chemometrics to study wood decay resistance. Although these models did not perform as well as the NIR-PLS model in the case of the *D. guianensis* tree species, the results encourage more systematic investigation of MIR spectroscopy in wood science in comparison or in combination with NIR spectroscopy. In the future, we plan to extend this study to a larger number of samples for external validation of the predictive models and to adapt this method to make it suitable and easy to use in forestry, from wood blocks or increment core samples collected directly from standing trees.

## **Acknowledgements**

The authors are extremely grateful to the “Investissement d’Avenir” grant managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA: ANR-10-LABX-25-01, Center for the study of biodiversity in Amazonia) and to the University of French Guiana for a Ph.D. fellowship for C. Flora. We would also like to thank Koese Soepe (Cirad), Cyrielle Sophie (CNRS) and Max Sarrazin (IRD).

## **References**

Aleixandre-Tudo, J.L., Nieuwoudt, H., Aleixandre, J.L., and du Toit, W. 2018. Chemometric compositional analysis of phenolic compounds in fermenting samples and wines using different infrared spectroscopy techniques. *Talanta*, **176**: 526–536.

Alves, A.M.M., Simões, R.F.S., Santos, C.A., Potts, B.M., Rodrigues, J., and Schwanninger, M. (2012). Determination of *Eucalyptus Globulus* Wood Extractives Content by near Infrared-



Based Partial Least Squares Regression Models: Comparison between Extraction Procedures. *J. Near Infrared Spectrosc.* **20**: 275–285.

Amusant, N., Beauchene, J., Fournier, M., Janin, G., and Thevenon, M.-F. 2004. Decay resistance in *Dicorynia guianensis* Amsh.: analysis of inter-tree and intra-tree variability and relations with wood colour. *Ann. For. Sci.* **61**: 373–380.

Amusant, N., Nigg, M., Thibaut, B., and Beauchene, J. 2014. Diversity of decay resistance strategies of durable tropical woods species: *Bocoa prouacensis* Aublet, *Vouacapoua americana* Aublet, *Inga alba* (Sw.) Wild. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **94**: 103–108.

Anouhé, J.-B.S., Adima, A., Niamke, F.B., Stien, D., Amian, B.K., Blandinières, P.-A., Virieux, D.N., Kati-Coulibaly, S., Pirat, J.-L., and Amusant, N. 2015. Two new beta carboline type alkaloids from *Dicorynia guianensis* heartwood. *Phytochem. Lett.* **12**: 158-163.

Brischke, C., Bayerbach, R., and Rapp, A.O. 2006. Decay-influencing factors: A basis for service life prediction of wood and wood-based products. *Wood Mater. Sci. Eng.* **1**: 91–107.

Bush, D., McCarthy, K., and Meder, R. 2011. Genetic variation of natural durability traits in *Eucalyptus cladocalyx* (sugar gum). *Ann. For. Sci.* **68**: 1057-1066.

Chaix, G., Monteuis, O., Goh, D.K.S., Kokutse, A.D., Derkyi, N.S.A., Kadio, A.A., Boutahar, N., and Baillères, H. 2008. Rapid prediction of teak wood natural durability using near-infrared spectroscopy. *Processing and Marketing of Teak Wood Products of Planted Forests*, p. 264-266

Chen, H., Ferrari, C., Angiuli, M., Yao, J., Raspi, C., and Bramanti, E. 2010. Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Carbohydr. Polym.* **82**: 772–778.

Conrad, A.O., and Bonello, P. 2016. Application of Infrared and Raman Spectroscopy for the Identification of Disease Resistant Trees. *Front. Plant Sci.* **6**:1152.

Conrad, A.O., Rodriguez-Saona, L.E., McPherson, B.A., Wood, D.L., and Bonello, P. 2014. Identification of *Quercus agrifolia* (coast live oak) resistant to the invasive pathogen *Phytophthora ramorum* in native stands using Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Front. Plant Sci.* **5**: 521.

Curnel, Y., Jacques, D., Gierlinger, N., and Pâques, L.E. 2008. Variation in the decay resistance of larch to fungi. *Ann. For. Sci.* **65**: 810–810.

- Dupuy, N., Galtier, O., Le Dréau, Y., Pinatel, C., Kister, J., and Artaud, J. 2010. Chemometric analysis of combined NIR and MIR spectra to characterize French olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**: 463–475.
- EN 350 2016. Durability of wood and wood based products – Testing and classification of the durability to biological agents of wood and wood based products, AFNOR.
- Gierlinger, N., Jacques, D., Schwanninger, M., Wimmer, R., Hinterstoisser, B., and Pâques, L.E. 2003. Rapid prediction of natural durability of larch heartwood using Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Can. J. For. Res.* **33**: 1727–1736.
- Kokutse, A.D., Stokes, A., Kokutse, N.K., and Kokou, K. 2010. Which factors most influence heartwood distribution and radial growth in plantation teak? *Ann. For. Sci.* **67**: 407–407.
- Marinho, F.F., Simões, A.O., Barcellos, T., and Moura, S. 2016. Brazilian *Tabernaemontana* genus: Indole alkaloids and phytochemical activities. *Fitoterapia.* **114**: 127–137.
- Moya, R., Bond, B., and Quesada, H. 2014. A review of heartwood properties of *Tectona grandis* trees from fast-growth plantations. *Wood Sci. Technol.* **48**: 411–433.
- Niamké, F.B., Amusant, N., Kadio, A.A., Thevenon, M.-F., Nourissier, S., Adima, A., Jay-Allemand, C., and Chaix, G. 2013. Rapid prediction of phenolic compounds as chemical markers for the natural durability of teak (*Tectona grandis* Linn f.) heartwood by near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* **22** (1): 35-44
- Nuopponen, M., Vuorinen, T., Jämsä, S., and Viitaniemi, P. 2005. Thermal Modifications in Softwood Studied by FT-IR and UV Resonance Raman Spectroscopies. *J. Wood Chem. Technol.* **24**: 13–26.
- Nuopponen, M.H., Birch, G.M., Sykes, R.J., Lee, S.J., and Stewart, D. 2006. Estimation of wood density and chemical composition by means of diffuse reflectance mid-infrared Fourier transform (DRIFT-MIR) spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 34–40.
- Pretsch, E., Bhuhlmann, P., and Affolter, C. 2000. Structure determination of organic compounds. Springer, p. 245-312.
- Romera-Fernández, M., Berrueta, L.A., Garmón-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F., and Moreda, J.M. 2012. Feasibility study of FT-MIR spectroscopy and PLS-R for the fast determination of anthocyanins in wine. *Talanta*, **88**: 303–310.

- Rana, R., Langenfeld-Heyser, R., Finkeldey, R., and Polle, A. 2010. FTIR spectroscopy, chemical and histochemical characterisation of wood and lignin of five tropical timber wood species of the family of Dipterocarpaceae. *Wood Sci. Technol.* **44**: 225–242.
- Rutishauser, E., Barthélémy, D., Blanc, L., and Eric-André, N. 2011. Crown fragmentation assessment in tropical trees: Method, insights and perspectives. *For. Ecol. Manage.* **261**: 400–407.
- Santos, A.J.A., Alves, A.M.M., Simões, R.M.S., Pereira, H., Rodrigues, J., and Schwanninger, M. 2012. Estimation of Wood Basic Density of *Acacia Melanoxylon* (R. Br.) by near Infrared Spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* **20**: 267–274.
- Schmitt, M., Spiering, F., Zhaunerchyk, V., Jongma, R.T., Jaeqx, S., Rijs, A.M., and van der Zande, W.J. 2016. Far-infrared spectra of the tryptamine A conformer by IR-UV ion gain spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**: 32116–32124.
- Schwanninger, M., Rodrigues, J.C., Pereira, H., and Hinterstoisser, B. 2004. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vib. Spectrosc.* **36**: 23–40.
- Schwanninger, M., Rodrigues, J., Carlos, and Fackler, K. 2011. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. *J. Near Infrared Spectrosc.* **19**: 287–308.
- Stirling, R., and Morris, P.I. 2011. New perspectives on the role of extractives in the durability of western redcedar. Canadian Wood Preservation Association, Halifax (Nova Scotia).
- Stuart, B.H. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons. p. 45-93.
- Tao, L., Lin, Z., Chen, J., Wu, Y., and Liu, X. 2017. Mid-infrared and near-infrared spectroscopy for rapid detection of Gardeniae Fructus by a liquid-liquid extraction process. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **145**: 1-9.
- Taylor, A.M., Gartner, B.L., and Morrell, J.J. 2002. Heartwood formation and natural durability—a review. *Wood Fiber Sci.* **34**: 587–611.
- Tondi, G., and Petutschnigg, A. 2015. Middle infrared (ATR FT-MIR) characterization of industrial tannin extracts. *Ind. Crops Prod.* **65**: 422–428.

Tondi, G., Schnabel, T., Wieland, S., and Petutschnigg, A. 2013. Surface properties of tannin treated wood during natural and artificial weathering. *International Wood Products Journal*, **4**: 150–157.

Tsuchikawa, S., and Kobori, H. 2015. A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. *J Wood Sci.* **61**: 213–220.

Vanbellingen, Q.P., Fu, T., Bich, C., Amusant, N., Stien, D., Della-Negra, S., Touboul, D., and Brunelle, A. 2016. Mapping *Dicorynia guianensis* Amsh. wood constituents by submicron resolution cluster-TOF-SIMS imaging. *Eur. J. Mass Spectrom.* **51**: 412–423.

XP CEN/TS 15083-2, 2006. Durability of wood and wood-based products – Determination of the natural durability of solid wood against wood-destroying fungi – Test methods – Part 2: Soft rotting micro-fungi, AFNOR.

## Discussion et conclusion générale

L'Angélique fait partie des essences les plus exploitées en Guyane française pour son bois, très utilisé en tant que bois d'œuvre. Mais ce dernier est également connu pour présenter une variabilité de sa durabilité naturelle à l'échelle intra et inter individuelle (Amusant *et al.* 2004; Bonjour 1996; Déon 1980; EN 350 2016), ce qui a été confirmé par nos résultats au cours des essais biologiques menés à l'égard de la microflore active du sol. Cette variabilité s'illustre d'abord à l'échelle intra-individuelle avec une durabilité naturelle qui augmente progressivement le long du profil radial, entre les tissus situés sous l'écorce et la moelle interne : l'aubier externe, l'aubier coloré, l'aubier interne, la zone de transition, le duramen externe et le duramen interne. Les tissus de l'aubier sont les moins résistants avec des pertes de masse moyenne de 22,5 % pour l'aubier externe, de 17,5 % pour l'aubier coloré et 15,3 % pour l'aubier interne, car leur cellules de parenchyme contiennent beaucoup de matériel de réserve, nécessaires à la croissance et à la défense active au sein de l'arbre (Taylor *et al.* 2002). Un aubier coloré a été relevé dans le bois de certains Angélique, ce tissu étant plus durable que l'aubier externe et moins durable que l'aubier interne. Sa couleur caractéristique nous interpelle car elle nous laisse supposer la présence d'extractibles dans ce tissu à l'origine de la couleur observée. La zone de transition, observée entre les tissus de l'aubier et du duramen, présente une durabilité naturelle intermédiaire à ces tissus, avec une valeur de perte de masse moyenne de 12,2 % après exposition à la microflore du sol. Ce tissu serait le siège du processus de duraminisation, à l'origine de certaines propriétés du duramen, notamment sa couleur et sa durabilité naturelle (Taylor *et al.* 2002). Plusieurs évènements sont associés à la mise en place du processus, la perte de la fonction de conduction, la mobilisation des substances de réserve pour la synthèse d'extractibles (imprégnant les parois, lumens et espaces interstitiels des cellules du duramen) et à terme la mort des cellules de parenchyme (Kampe and Magel 2013; Taylor *et al.* 2002). En effet, les tissus duraminisés sont beaucoup plus durables et colorés que les tissus non duraminisés, avec des pertes de masse moyennes de 7 % et 5,7 %. Dans le bois de l'Angélique, ce processus physiologique serait à l'origine du gradient de durabilité naturelle à l'égard de la microflore du sol, ce qui confirme les travaux de Amusant *et al.* (2004). D'autres facteurs peuvent expliquer la variabilité à l'échelle intra-individu, notamment l'âge de certains tissus (Niamké 2010). Ainsi, la durabilité naturelle du bois de Teck diminue du duramen externe vers le duramen interne, avec le bois le plus proche de la moelle qui est moins durable (Kokutse *et al.* 2006).

Cependant, à l'échelle inter individuelle une variabilité de la durabilité naturelle du bois de

l'Angélique a également été observée lors de nos essais à l'égard de la microflore du sol. Nous nous sommes focalisés sur la variabilité de la durabilité naturelle du duramen externe de l'Angélique, tissu nouvellement formé. Pour appréhender au mieux cette variabilité, une stratégie d'échantillonnage, basée en partie sur la description architecturale de la couronne des individus (Rutishauser *et al.* 2011) a été mise en œuvre. Sur la base du degré de fragmentation de la couronne, nous avons établi 3 groupes architecturaux à savoir les individus normaux (développement du houppier avec un accès variable à la lumière), de plantation (développement du houppier conséquent avec un important accès à la lumière) et les individus sénescents ayant subi d'importantes pertes de charpentières dans leur houppier. Nous avons supposé que cette approche permettrait d'avoir accès à un échantillonnage présentant une variabilité de la durabilité naturelle en fonction du type architectural. En effet, la description de la couronne des individus est susceptible de refléter leur vitalité, leur trait de vie (Rutishauser *et al.* 2011). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que les individus de plantations seraient les moins durables, caractérisés par un fort taux de croissance au détriment de la pérennité de leur bois, suivi des individus normaux qui allient à la fois croissance et défense et enfin des individus sénescents beaucoup plus durables car ils sont caractérisés par une stratégie de défense passive de leur bois par rapport à leur croissance en phase de sénescence.

La stratégie d'échantillonnage nous a permis d'avoir accès à des individus dont la durabilité naturelle est significativement différente. Toutefois, nous n'avons pu établir aucune corrélation entre leur durabilité naturelle et leur type architectural. L'analyse de nos résultats révèle dans un premier temps que les duramens externes des 15 individus de l'échantillonnage se répartissent dans 3 groupes significativement différents : (i) le groupe le plus durable constitué par l'individu Cim 09, avec des pertes de masse moyenne de 2,75 %, (ii) le groupe le moins durable comprenant les individus A0 et A2 avec des pertes de masse moyennes respectives de 16,10 % et 17,16 %, et (iii) le dernier groupe présentant une durabilité intermédiaire formé de tous les autres individus dont les pertes de masse moyennes varient de 9,19 % à 4,18 %. Mais les individus se répartissent dans ces 3 groupes architecturaux de manière aléatoire, ce qui remet en cause notre hypothèse de départ : l'individu le plus significativement durable est un individu normal et non pas un individu sénescence comme nous l'avions précédemment suggéré. Cette variabilité de la durabilité naturelle à l'égard de champignons lignivores peut être observée à l'échelle intra-spécifique chez d'autres espèces telles que le Teck ou encore *Quercus sp.* (Humar *et al.* 2008) mais peut également s'observer à l'échelle interspécifique, notamment chez les espèces ligneuses tropicales (Beauchêne 2012). Elle s'explique par des facteurs qui relèvent

du patrimoine génétique de l'arbre, de son âge ainsi que des paramètres environnementaux ou bien des traitements sylvicoles. Kokutse *et al.* (2010) a notamment mis en évidence que les individus du Teck les plus âgés sont également ceux dont le duramen est le plus durable. De même, les individus du Teck issus de plantations présentent un duramen moins durable que les individus issus de forêts naturelles (Moya *et al.* 2014). Dans le cas de l'Angélique, la variabilité de la durabilité naturelle à l'égard de la microflore active reste complexe d'autant plus que l'appréhension de cette variabilité sur la base d'une étude architecturale, laquelle n'a, à notre connaissance, jamais été employée auparavant. Nos résultats ont révélé la nécessité de déterminer l'origine de la durabilité naturelle du bois de l'Angélique afin de pouvoir expliquer sa variabilité. Nous avons souhaité répondre à la question suivante : sur quels facteurs repose la durabilité naturelle de l'Angélique ?

L'un des premiers facteurs étudié est la composition chimique du duramen externe. En effet, le rôle des extractibles dans la durabilité naturelle à l'égard des agents de dégradation du bois a été mis en évidence chez de nombreuses espèces tempérées (*Larix sp.*, (Gierlinger *et al.* 2004) ; *Pinus sylvestris* (Venäläinen *et al.* 2004) ; *Robinia pseudoacacia*, (Latorraca *et al.* 2011) ) et tropicales (*Tectona grandis*, (Niamké *et al.* 2014) ; *Sextonia rubra*, (Rodrigues *et al.* 2010)). De ce fait, nos travaux se sont tout d'abord centrés sur le rôle des extractibles du bois de l'Angélique par une approche métabolomique non ciblée qui a consisté à sélectionner des biomarqueurs de durabilité naturelle en utilisant des analyses chimiques (LC-MS) couplées à des analyses statistiques. Cette approche nécessite dans un deuxième temps d'identifier ces biomarqueurs sélectionnés par le modèle de PLS-DA par une stratégie de déréplication afin de caractériser la structure moléculaire des métabolites connus ou nouveaux et de mieux représenter la diversité chimique des extraits. Nous avons employé deux stratégies de déréplication dans cette thèse, dont une basée sur l'isolement et la caractérisation par spectroscopie RMN et une seconde qui nécessite la construction de réseaux moléculaires. Cette approche non ciblée n'a pas permis de sélectionner de potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle à partir du duramen externe des 15 individus de l'échantillonnage. Néanmoins, la tryptamine, déjà identifiée chez cette espèce, ainsi que 9 autres potentiels biomarqueurs non identifiés ont pu être sélectionnés avec le modèle de PLS-DA défini à partir des tissus de l'aubier externe et du duramen externe des 15 individus de l'échantillon. Ces résultats indiquent que la variabilité à l'échelle des tissus du duramen externe est beaucoup trop faible pour expliquer les différentes durabilités naturelles au sein de l'échantillonnage bien qu'il soit possible de distinguer les tissus d'aubier et de duramen sur la base de leur profil chimique.

Ainsi, la tryptamine, métabolite présent dans les duramens, constitue à la fois un biomarqueur de duraminisation et également un potentiel biomarqueur de durabilité naturelle, comme c'est aussi le cas pour les 9 autres potentiels biomarqueurs détectés uniquement dans les duramens externes et absents des aubiers externes.

Ces stratégies de déréplication mises en place durant cette thèse n'ont pas permis d'identifier de nouveaux biomarqueurs de durabilité naturelle sélectionnés par le modèle de PLS-DA autre que la tryptamine. La stratégie de déréplication par isolement et caractérisation par spectroscopie RMN, a permis l'identification de 3 alcaloïdes indoliques, dont deux composés qui n'avaient jamais été décrits à l'état naturel. Un des métabolites possède une potentielle activité antiparasitaire contre la leishmaniose (Gupta *et al.* 2007), ce qui met en avant l'intérêt pharmacologique de ces extractibles du bois (Marinho *et al.* 2016). De même, avec cette stratégie, Anouhé *et al.* (2015) ont isolé et caractérisé 4 composés alcaloïdiques à noyau indole dans le duramen de l'Angélique. Ces métabolites étaient d'ailleurs présents dans la fraction alcaloïdique qui possédait des activités antifongiques et anti adicalaires (Anouhé 2017). Dans le cas de cette thèse, beaucoup d'alcaloïdes ont été détectés au cours de nos analyses LC-MS, mais peu ont pu être isolés et caractérisés car leurs quantités étaient trop faibles. De même, il n'a pas été possible de mesurer leurs activités biologiques. La stratégie de déréplication couplée à la construction de réseau moléculaire présente l'avantage d'être plus rapide que la stratégie qui implique l'isolement et la caractérisation des métabolites. En effet, elle permet d'identifier les composés déjà connus grâce à la comparaison de leurs spectres de masse avec ceux disponibles dans les bases de données en plus d'identifier de nouvelles structures moléculaires grâce aux réseaux moléculaires (Yang *et al.* 2013). Cette stratégie a permis de détecter en LC-MS un total de 4 flavonoïdes en plus de la tryptamine dans les extraits de duramen externe, mais aucun de ces métabolites n'a été identifié dans un réseau moléculaire. Par conséquent, il se peut que ces composés ne partagent aucune similarité structurale avec d'autres métabolites présents dans les extraits de duramen. Il est également possible que les paramètres requis pour les analyses et l'acquisition des spectres de masses n'ont pas permis l'ionisation de certains métabolites alors absents des réseaux moléculaires.

Nos résultats mettent en évidence les limites des méthodes de déréplication pour l'identification des métabolites du bois de l'Angélique, et donc de potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle par l'approche métabolomique non ciblée. En effet, de nombreux spectres de masse ne sont pas toujours disponibles dans les bibliothèques spectrales ce qui limite l'identification des ions détectés au cours de l'analyse métabolomique et ne permet pas leur



annotation dans les réseaux moléculaires. Bien qu'elle soit chronophage, l'approche par isolement et caractérisation est nécessaire pour identifier le plus grand nombre de métabolites et de ce fait, augmenter le nombre de données spectrales disponibles dans les bibliothèques. Il existe une autre approche pour augmenter le nombre de spectres de masse dans les bases de données à savoir l'approche par fragmentation *in silico*. Elle permet de fournir des données spectrales basées sur la prédiction des patrons de fragmentation de certains métabolites. Ainsi, il est possible d'augmenter le nombre d'identification de métabolites grâce aux bases de données *in silico* (Zhou *et al.* 2014; Allard *et al.* 2016).

Face à la difficulté de sélectionner et d'identifier nos potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle du bois de l'Angélique par approche non ciblée, nous avons utilisé une seconde approche ciblée au cours de cette thèse. Cette approche repose sur la quantification de potentiels biomarqueurs identifiés par des travaux précédents : la tryptamine à noyau indole, composé alcaloïdique majoritaire et les composés phénoliques généralement impliqués dans la durabilité naturelle du bois de certaines essences (Niamké *et al.* 2014 ; Wong *et al.* 1984; Yamamoto and Hong 1994). Tout d'abord, la tryptamine a été quantifiée en HPLC-DAD et par RMN  $^1\text{H}$  afin de sélectionner la méthode la plus adaptée. Nos résultats indiquent que les outils HPLC-DAD et qRMN sont tous deux adéquats pour la quantification de la tryptamine, étant fiables et reproductibles. De ce fait, ils peuvent être tous deux employés pour quantifier la tryptamine à partir des extraits en alcaloïdes totaux. Néanmoins, le seuil de sensibilité est différent pour ces deux outils, ce qui peut être source de biais dans les mesures : les individus dont les teneurs moyennes en tryptamine sont inférieures à 1 mg/g de bois sec ne peuvent pas être quantifiés par qRMN dans notre cas. Il convient d'utiliser l'outil HPLC-DAD dont la sensibilité est beaucoup plus grande. Les analyses par qRMN devraient être privilégiées dans le cas où le métabolite à doser est présent en plus grande quantité, avec un spectre RMN  $^1\text{H}$  dont les signaux sont facilement interprétables (Simmler *et al.* 2014).

Bien que la tryptamine ait été identifiée comme potentiel biomarqueur de durabilité naturelle par l'approche non ciblée, nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence son rôle au sein du bois de l'Angélique, quel que soit l'outil analytique utilisé. La tryptamine est plutôt un biomarqueur de duraminisation, comme le confirme l'approche métabolomique non ciblée : elle est présente en très grande proportion dans les duramens externes, par comparaison à l'aubier externe où elle n'est détectée qu'à l'état de trace. De même, Vanbellinghen *et al.* (2016), mettent en évidence une faible teneur de la tryptamine dans l'aubier, avec une augmentation des teneurs dans la zone de transition et une diffusion de la tryptamine dans toutes les parois

des cellules du duramen. Présente dans certaines famille de végétaux (Agaricaceae, Myristicaceae, Fabaceae, etc ; (Bruneton 2016)), elle possède surtout des propriétés hallucinogènes chez l'homme (Araújo *et al.* 2015), elle est toxique à l'encontre des cyanobactéries et inhibe la croissance des microalgues (Churro *et al.* 2010). Déon (1980) a mis en avant une propriété antifongique de la tryptamine à 0,1 %, ce qui n'a pas été montré par nos résultats. Aussi, quel pourrait être le rôle de la tryptamine au sein du bois de l'Angélique ? Elle aurait plutôt un rôle en tant que précurseur de métabolites secondaires dans le bois, à l'origine d'alcaloïdes indoliques qui posséderaient une activité biologique (Facchini 2001). Chez certains individus, les teneurs en tryptamines extraites sont quasi-nulles dans le duramen externe. Est-il possible que la totalité de la tryptamine ait été transformée en alcaloïde indolique chez ces individus ? Cette première hypothèse pourrait être confirmée par de plus fortes teneurs en alcaloïdes totaux observées pour ces individus. Une seconde hypothèse peut également être émise à savoir celle d'une pseudo-lignification (Taylor *et al.* 2002) impliquant une liaison de la tryptamine avec les macromolécules du bois. Ce résultat pourrait expliquer les faibles teneurs extraites en tryptamine.

Les composés phénoliques ont ensuite été quantifiés par la méthode de Folin-Ciocalteu et une recherche d'activité antiradicalaire a été réalisée pour chaque extrait en composés phénoliques totaux. Nos résultats indiquent l'absence de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les pertes de masse moyenne des éprouvettes d'essais après exposition à la microflore du sol. De plus, tous les extraits présentent une activité antiradicalaire, qui est significativement corrélée à la teneur en composés phénoliques totaux : de manière générale, l'activité antiradicalaire augmente en fonction des teneurs en composés phénoliques totaux dans les extraits, ce que confirment les travaux de Anouhé *et al.* (2018). Cette corrélation a également été observée pour d'autre espèces ligneuses tropicales (Huang *et al.* 2009 ; Mounquengui *et al.* 2016). Dans le cas de cette thèse, il n'a pas été possible d'identifier les métabolites qui supportent l'activité antiradicalaire. Néanmoins les travaux de Anouhé *et al.* (2018) indiquent que cette activité antiradicalaire serait liée à la présence de catéchine, d'épicatéchine de néoastilbine et astilbine, après purification des extraits en composés phénoliques totaux.

Enfin, nos résultats indiquent que les teneurs en extraits totaux du duramen de l'Angélique ne sont pas corrélées avec la durabilité naturelle de l'Angélique. De plus, aucune activité biologique des extraits totaux n'a été détectée au cours de nos essais. Toutefois, nos résultats ne sont pas en accord avec la littérature (Aloui *et al.* 2004 ; Amusant *et al.* 2014 ; Guilley *et al.* 2004 ; Kirker *et al.* 2013). L'espèce tropicale *Cylicodiscus gabunensis* (Okan), très durable à

l'égard des champignons lignivores, présente notamment de fortes teneurs en extractibles dans son duramen qui sont associées à une importante activité antiradicalaire (Mounguengui *et al.* 2016). Nous avons également évalué la potentielle activité synergique de certains extraits (extraits en alcaloïdes totaux et en composés phénoliques) car le bois est une matrice lignocellulosique, imprégnée par les extractibles. Mais aucune activité biologique n'a été mise en évidence, ce qui laisse supposer la difficulté d'appréhender la durabilité naturelle hors matrice lignocellulosique. De ce fait, nous avons réalisé des essais *in situ*, par comparaison des pertes de masse moyennes d'éprouvettes du duramen de l'Angélique avant et après extraction. Ces éprouvettes ont été exposées au champignon de pourriture cubique, *Antrodia vaillantii* pendant 10 semaines. Néanmoins, l'essai n'a pas pu être validé, les éprouvettes de référence n'ayant pas été dégradées. Les travaux de Kirker *et al.* (2013) indiquent une légère influence des extractibles sur la durabilité naturelle des espèces ligneuses telles que *Thuja plicata*, ou *Callitropsis nootkanensis*. Après extractions de leurs éprouvettes, les pertes de masse s'élèvent à plus de 15 % après exposition au champignon *Gloeophyllum trabeum* alors que les pertes de masse sont inférieures à 10 % pour les éprouvettes non extraites. Une autre approche pour évaluer le rôle des extractibles aurait pu être utilisée dans cette thèse, par imprégnation d'éprouvettes non durables et d'Angélique préalablement extraites avec différentes concentrations en tryptamine, en composés phénoliques ou en extraits testés en synergie avant leur exposition à l'agent de dégradation. En fonction des pertes de masse obtenues, il aurait été possible de discuter de l'effet des extractibles sur la durabilité naturelle de l'Angélique et de l'espèce non durable.

Avec l'approche métabolomique non ciblée, il n'a pas été possible de mettre en évidence le rôle des extractibles dans la durabilité naturelle de l'Angélique. Le constat est le même avec l'approche métabolomique ciblée, par la quantification de la tryptamine et des composés phénoliques. Il serait intéressant de considérer d'autres potentiels biomarqueurs de durabilité naturelle tels que les flavonoïdes par exemple. Nous avons donc pris en compte dans nos travaux d'autres facteurs pour expliquer cette durabilité naturelle, à savoir la teneur en lignine Klason ainsi que la densité. En effet, Rana *et al.* (2009) a mis en évidence que la différence de durabilités naturelles de 5 espèces de la famille des Dipterocarpaceae repose sur la densité du bois, la lignine Klason ainsi que les teneurs en extractibles. Leurs travaux indiquent que la durabilité naturelle peut aussi être multifactorielle. D'autres auteurs ont fait le même constat notamment Mounguengui *et al.* (2016) dont les travaux montrent que les espèces les plus durables aux champignons lignivores possèdent à la fois de fortes teneurs en lignine Klason et en extractibles. De même, Wong *et al.* (1983) a mis en évidence une forte corrélation entre la

densité, les teneurs en extractibles et la durabilité naturelle de l'espèce *Eucalyptus delegatensis*. Une recherche de corrélation a été réalisée entre la teneur en lignine et les valeurs en infradensité mesurée chez l'Angélique, avec les moyennes de pertes de masse, mais aucune corrélation n'a été observée. Pourtant, il semble difficile d'écarter la teneur en lignine Klason, les valeurs d'infradensité au même titre que les extractibles comme facteurs de durabilité naturelle à l'égard de la microflore active dans le cas de l'Angélique. En effet, le duramen est biochimiquement constitué de lignine, cellulose et d'hémicelluloses, avec des extractibles qui diffusent dans les parois, espaces interstitiels des vaisseaux, fibres et parenchyme. Nos résultats semblent indiquer que ces facteurs, bien que pertinents à l'échelle interspécifique, ne le sont pas à l'échelle intraspécifique, leur variabilité étant trop faible. Pourtant, Humar *et al.* (2008) ont étudié la variabilité de la durabilité naturelle à l'échelle inter individuelle chez l'espèce *Quercus sp.*. Les densités mesurées pour les individus de son échantillonnage varient de 549 à 748 kg/m<sup>3</sup> et cette variabilité s'illustre également au niveau de leur durabilité naturelle à l'égard des champignons lignivores : un individu qui présente un bois de forte densité est également durable. Dans le cas de cette thèse, les valeurs d'infradensité varient de 0,52 à 0,75 et cette variabilité ne permet pas d'expliquer celle observée pour la durabilité naturelle.

L'ensemble de nos résultats indique que la prise en compte de facteurs intrinsèques au duramen ne suffit pas pour appréhender la durabilité naturelle du bois de l'Angélique. Il nous faudrait privilégier une étude beaucoup plus générale qui englobe à la fois le bois et toutes ses propriétés et l'arbre dans le cas de l'Angélique, car le bois est avant tout produit pour répondre aux besoins de l'arbre dans l'espace et le temps. De ce fait, nous avons intégré des facteurs qui permettent de décrire l'arbre, plus précisément l'évolution de sa taille et de sa forme au cours de son développement. Nous avons sélectionné des potentiels facteurs de durabilité naturelle qui renvoient aux caractéristiques de l'arbre tels que la hauteur de l'arbre (H), du diamètre à hauteur de poitrine (Diameter at Breast Height), du ratio H/DBH ainsi que la mesure des proportions en aubier et en duramen de chaque individu de l'échantillonnage. Ils n'ont, à notre connaissance, jamais été pris en compte pour comprendre et prédire la durabilité naturelle d'une essence. Nos résultats indiquent une corrélation significativement négative entre la proportion en duramen et les pertes de masse moyennes (Coefficient de Pearson  $r = -0,69$ ,  $p$ -value  $<0,05$ ) et une corrélation positive avec l'aubier (Coefficient de Pearson de  $r = 0,67$ ,  $p$ -value  $<0,05$ ). Ces résultats, entérinés par le modèle linéaire, confirment le lien entre durabilité naturelle et proportion en duramen chez l'Angélique : les bois sont d'autant plus durables que le diamètre du duramen est élevé. Ainsi, nos résultats semblent mettre en avant que la durabilité naturelle

serait fortement influencée par le développement de l'arbre.

La durabilité naturelle, généralement attribuée au duramen des espèces ligneuses, est acquise au cours du processus de duraminisation (Taylor *et al.* 2002). Elle contribue à la pérennité des espèces tolérantes, dont le développement lent et régulier permet la mise en place d'un bois qui présente de meilleures propriétés technologiques requises pour le bois de construction (Bossu 2015). Leur durée de vie est supérieure aux héliophiles, espèces de pleines lumières : elles se caractérisent par un fort taux de croissance, ne duraminisent pas et produisent un bois de faible densité et peu durable. Néanmoins, il existe des espèces héliophiles qui sont qualifiées de paradoxales (Bossu 2015). Ces dernières allient à la fois un développement rapide et une production d'un bois ayant une bonne qualité technologique, notamment parce qu'elles sont sujettes à la duraminisation (Bossu 2015). En ce qui concerne l'Angélique, cette dernière est une espèce qualifiée d'hémi-tolérante avec la capacité de croître très rapidement dans des clairières et de survivre dans les sous-bois en attendant l'apparition d'une éclaircie (Lehnebach 2015). Sa plasticité est à l'origine d'une grande diversité de stratégie de croissance, qui est susceptible d'induire une variation des proportions en aubier/duramen mais aussi de la durabilité naturelle de son bois.

Lehnebach *et al.* (2017) a mis en évidence chez l'Angélique que la variabilité des quantités en aubier/duramen de l'Angélique intègre une variable de nature ontogénique. En effet, dans les jeunes stades de développement de l'arbre, la croissance de l'individu semble se faire au détriment de la formation du duramen. Cette hypothèse se base sur le constat que la largeur en aubier, corrélée avec le taux de croissance radiale, augmentent tout deux jusqu'à ce que les individus atteignent 50 cm de DBH, stade à partir duquel elles se stabilisent. De plus, la proportion en aubier est plus importante que celle du duramen dans le bois des Angélique dont le DBH est inférieur à 50 cm. Par conséquent, l'arbre favorise le stockage du matériel de réserve au niveau des cellules de parenchyme de l'aubier qui prend plus de place dans le tronc et peut ainsi assurer la croissance et la défense active de son bois (Lehnebach *et al.* 2017 ; Magel *et al.* 2000). Une fois que l'Angélique atteint un DBH de 50 cm, le taux de croissance de la couronne augmente drastiquement et la proportion en duramen dans le tronc augmente considérablement au détriment de celle de l'aubier. La couronne, concentrant alors la plus grande fraction de l'aubier de l'arbre devient la majeure réserve de sucres non structuraux (Lehnebach *et al.* 2017). Ainsi, l'arbre, possédant une plus grande performance photosynthétique suite au développement conséquent de sa couronne pourrait être en capacité de produire une plus grande quantité de matériel de réserve mobilisable pour la biosynthèse d'extractibles au cours du

processus de duraminisation. À partir de 50 cm de DBH, il semble privilégier la défense passive de son bois avec une augmentation de la proportion en duramen associée à celle du volume de sa couronne. Les individus dont le DBH est compris entre 50 et 90 cm sont susceptibles d'avoir de fortes proportions en duramen associées à une forte durabilité naturelle.

Fort de ce constat, nous avons analysé le comportement des individus de notre échantillonnage en fonction de leur DBH. Tous les individus ayant un DBH supérieur à 50 cm sont durables, avec d'importantes proportions en duramen par rapport à celles en aubier. Pour les individus dont le DBH est inférieur à 50 cm, les proportions en aubier/duramen mais aussi leurs durabilités naturelles sont beaucoup plus variables. Ce dernier constat atteste de l'existence d'autres facteurs de variabilités des proportions en duramen tels que les facteurs génétiques (Taylor *et al.* 2002) mais aussi l'environnement, l'âge de l'individu (Kokutse *et al.* 2004), la taille, la structure et le développement qui sont aussi déterminants (Hazenbergh and Yang 1991; Nawrot *et al.* 2008). Dans le cas de notre étude, tous les individus ont été prélevés sur une même zone géographique (forêt de Paracou) ce qui en fait des individus potentiellement génétiquement semblables. Cette essence ne présente pas de cernes marqués et par conséquent, nous n'avons aucune information sur leur âge, par comparaison aux 3 individus issus de la plantation âgés de 30 ans (A7, A8 et A2) pour discuter de cet effet.

La variabilité de la durabilité naturelle de l'Angélique à l'échelle inter individuelle se veut complexe, car elle est liée au stade de développement de l'arbre, d'où l'importance d'utiliser de bons descripteurs qui reflètent au mieux son développement. De plus, la plasticité de cette espèce implique plusieurs stratégies de croissance, susceptibles de se refléter sur le développement de l'arbre. Il s'avère primordial d'identifier les critères architecturaux adéquats pour une meilleure appréhension de la variabilité de la durabilité naturelle de l'Angélique. Ces critères peuvent prendre en compte le volume de la couronne de l'arbre (par la mesure de toutes les charpentières) tel que réalisé par Lehnebach *et al.* (2017) ainsi que sa capacité photosynthétique, le volume et la circonférence du tronc. Il nous faut également décrire l'environnement de l'arbre en évaluant, par exemple, la compétition par rapport à ses voisins au regard de l'accès à la lumière. Cet indicateur peut être déterminé par la mesure de la surface terrière des arbres voisins. L'ensemble de ces paramètres est susceptible d'influencer à la fois la croissance de l'arbre et la dynamique de la formation du duramen, en lien avec la qualité du duramen produit. Néanmoins, cette approche architecturale semble assez chronophage et contraignante pour appréhender la variabilité de la durabilité naturelle, notamment celle des individus au DBH de moins de 50 cm.

Dans le cas de cette thèse, nous avons appréhendé la variabilité de la durabilité naturelle de l'Angélique à l'égard de la microflore du sol à l'aide d'outils spectroscopiques à savoir (i) le proche infrarouge (PIR) et (ii) le moyen infrarouge (MIR), à partir de poudre de bois. Bien que nos résultats n'aient pas mis en évidence de lien entre la chimie du bois et la durabilité naturelle, la prédiction de cette dernière a pu être possible avec ces outils spectroscopiques. Ces méthodes constituent de véritables alternatives aux essais de durabilité naturelle classique, généralement chronophages et destructifs. Elles reposent sur les propriétés vibrationnelles des liaisons chimiques des extractibles ainsi que des macromolécules du bois (Stuart 2004). Une recherche de corrélation a ensuite été réalisée entre les spectres infrarouges et les pertes de masse moyenne pour les 15 individus de l'échantillonnage. À l'aide de la chimiométrie, les modèles PLS de prédiction ont été testés afin de sélectionner le plus performant pour prédire la durabilité naturelle de l'Angélique.

Nos résultats indiquent que le meilleur modèle de prédiction de durabilité naturelle est obtenu à partir des spectres PIR ( $R^2_{CV}= 0,93$  et un RPD de 4,02). Dans le cas du *Larix sp.*, les meilleurs modèles de PLS pour prédire la durabilité naturelle à l'égard du champignon *Postia placenta* ( $R^2_{CV}= 0,85$ ) et *Coniophora puteana* ( $R^2_{CV}= 0,94$ ) ont aussi été établis à partir des spectres du PIR (Gierlinger et al., 2003). De même, Chaix *et al.* (2008) ont obtenu un très bon modèle chez l'espèce *Tectona grandis*, avec un  $R^2_{CV}= 0,79$ . Néanmoins pour certaines espèces, notamment *Eucalyptus cladocalyx*, le modèle de PLS établi à partir des spectres du PIR n'était pas adapté pour la prédiction de la durabilité naturelle *Fomitopsis lilacino-gilva*, *Perenniporia tephropora* et *Gloeophyllum abietinum* ( $R^2_{CV}= 0,07, 0,28$  et  $0,32$  respectivement).

Pour la première fois, nous avons montré que le modèle de prédiction PLS basé sur les spectres de MIR permettait d'obtenir des résultats satisfaisants pour prédire la durabilité naturelle de l'Angélique à l'égard de champignon lignivore. Jusqu'à présent, la spectroscopie MIR était surtout utilisée pour évaluer la densité et appréhender la composition chimique du bois (Nuopponen *et al.* 2006). Conrad and Bonello (2016) ainsi que Conrad *et al.* (2014) ont également utilisé cette approche pour prédire la résistance de l'essence *Quercus agrifolia* face à certaines maladies du bois. Cependant, nos résultats indiquent que le modèle prédictif basé sur les spectres du PIR est plus performant que celui basé sur les spectres du MIR. Cette différence de performance peut être expliquée par les larges gammes d'absorption des bandes spectrales du PIR qui donnent accès à la fois aux extractibles et aux macromolécules du bois. Ces bandes d'absorption spectrales du PIR sont sujettes à un fort chevauchement dû à leur faible résolution. De plus, la nature des bandes spectroscopique est différente : les bandes

harmoniques et de combinaisons sont retrouvées dans les spectres du PIR (13000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) alors que dans les spectres du MIR, ces bandes correspondent aux vibrations des liaisons fondamentales (4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ ) (Stuart 2004). Étant donné que les spectres du PIR et MIR ont permis l'obtention de modèles PLS performants, nous avons également combiné ces deux types de données spectrales. Nous nous attendions à obtenir un meilleur modèle de prédiction en combinant les spectres du PIR et du MIR. Mais le modèle obtenu par cette approche fournit des résultats similaires au modèle de prédiction le moins performant (*i.e.* modèle de MIR-PLS), avec un  $R^2_{CV}$  de 0,89 et une valeur de RPD de 3,12. Cette approche, utilisée dans le domaine de l'agro-alimentaire, a permis de prédire la teneur en eau et en huile dans les olives (Dupuy *et al.* 2010) ainsi que l'évaluation de la teneur en acides phénoliques des fruits secs de *Gardenia jasminoides* (Tao *et al.* 2017). Par la spectroscopie de moyen et proche infrarouge, nous avons souhaité mettre en évidence le rôle des extractibles dans la durabilité naturelle de l'Angélique, par une autre approche métabolomique ciblée. Pour cela, nous avons imprégné le duramen externe de tryptamine avant une acquisition des spectres PIR et MIR. Nos résultats ont indiqué que certaines bandes spectrales du PIR (5958  $\text{cm}^{-1}$  et 8750  $\text{cm}^{-1}$ ) mais aussi du MIR (1100  $\text{cm}^{-1}$ , 1050  $\text{cm}^{-1}$ , 744  $\text{cm}^{-1}$  et 426  $\text{cm}^{-1}$ ) coïncident avec celles de la tryptamine et que ces bandes sont également significatives pour les modèles de PLS établis avec les spectres PIR et MIR surtout. Ces résultats indiquent une potentielle influence de la tryptamine dans la durabilité naturelle de l'Angélique, ce qui n'a pas pu être confirmé par les résultats de notre approche métabolomique ciblée. De plus, ces bandes spectrales identifiées peuvent également être attribuées à la lignine ou aux composés phénoliques dont les bandes d'absorption se chevauchent (Pretsch *et al.* 2000; Stuart 2004; Tondi and Petutschnigg 2015).

Ainsi, nos résultats indiquent la fiabilité de ces deux modèles qui peuvent être utilisés pour prédire la durabilité naturelle de l'Angélique. La donnée spectrale permet d'appréhender à la fois la chimie du bois notamment, les extractibles et les macromolécules (Alves *et al.* 2012 ; Meder *et al.* 1999 ; Raikila *et al.* 2007 ; Taylor *et al.* 2011) et elle donne également accès à sa densité (Nuopponen *et al.* 2006; Santos *et al.* 2012). De ce fait, la prédiction de la durabilité naturelle à partir des spectres de PIR et MIR se base sur tous ces facteurs. La notion de synergie de facteur peut être mise en avant pour expliquer la difficulté de prédire la durabilité naturelle avec une approche de cas par cas. Nos résultats sont très encourageants et montrent la potentialité de cette technique analytique pour appréhender la durabilité naturelle et la prédire.

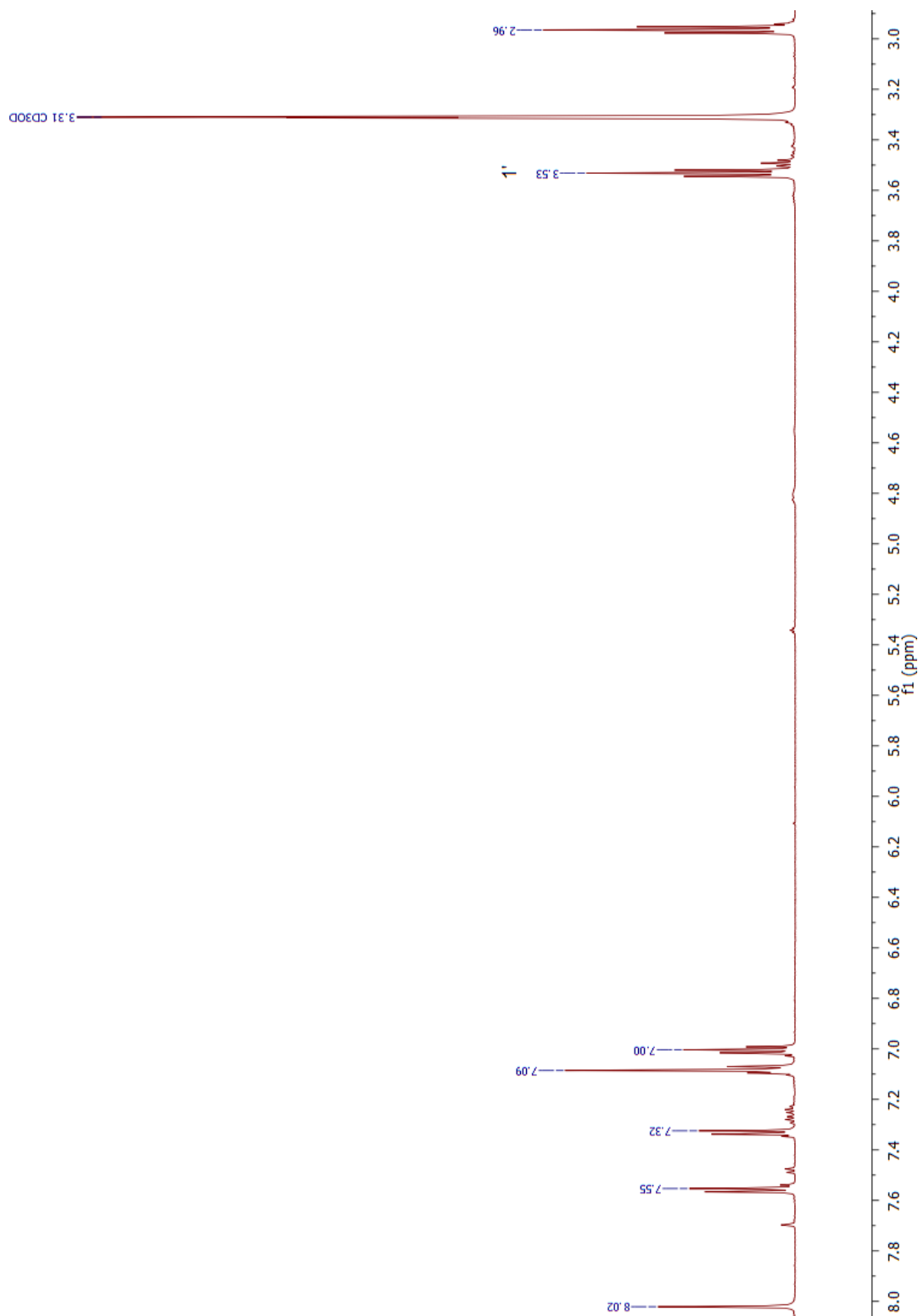
Pour finir, l'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse indique la nécessité d'élargir notre échantillonnage, en sélectionnant des individus sur la base de facteurs liés au



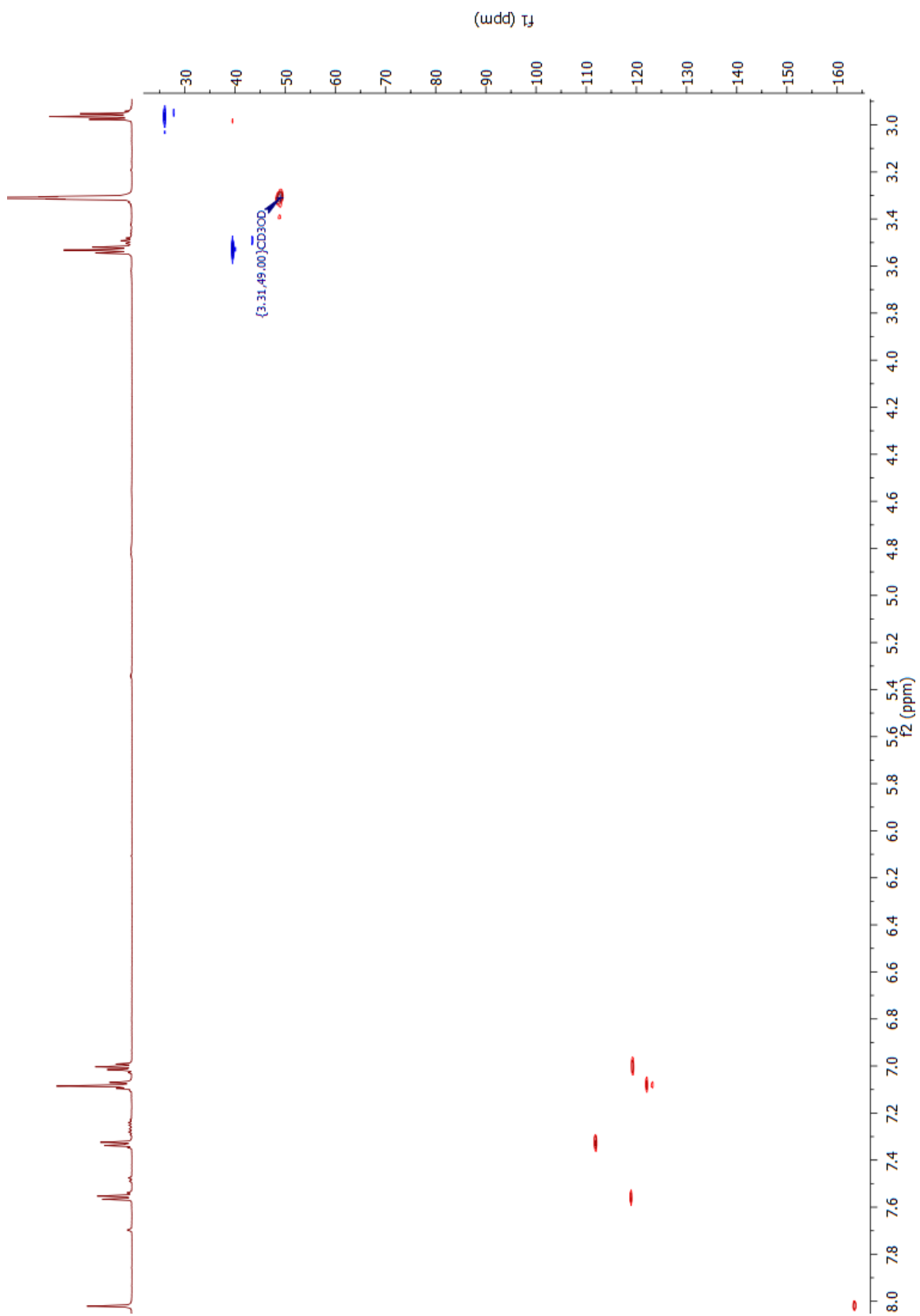
développement et à l'environnement de l'arbre, reflétant au mieux leur durabilité naturelle et ainsi, nous pourrions appréhender leur variabilité. Avec un échantillonnage plus contrasté, il nous sera possible d'identifier plus facilement les biomarqueurs de durabilité naturelle chez l'Angélique, par exemple, en utilisant des approches adaptées en métabolomique.

## Annexes

### Annexe 1: Spectres RMN du composé *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]formamide



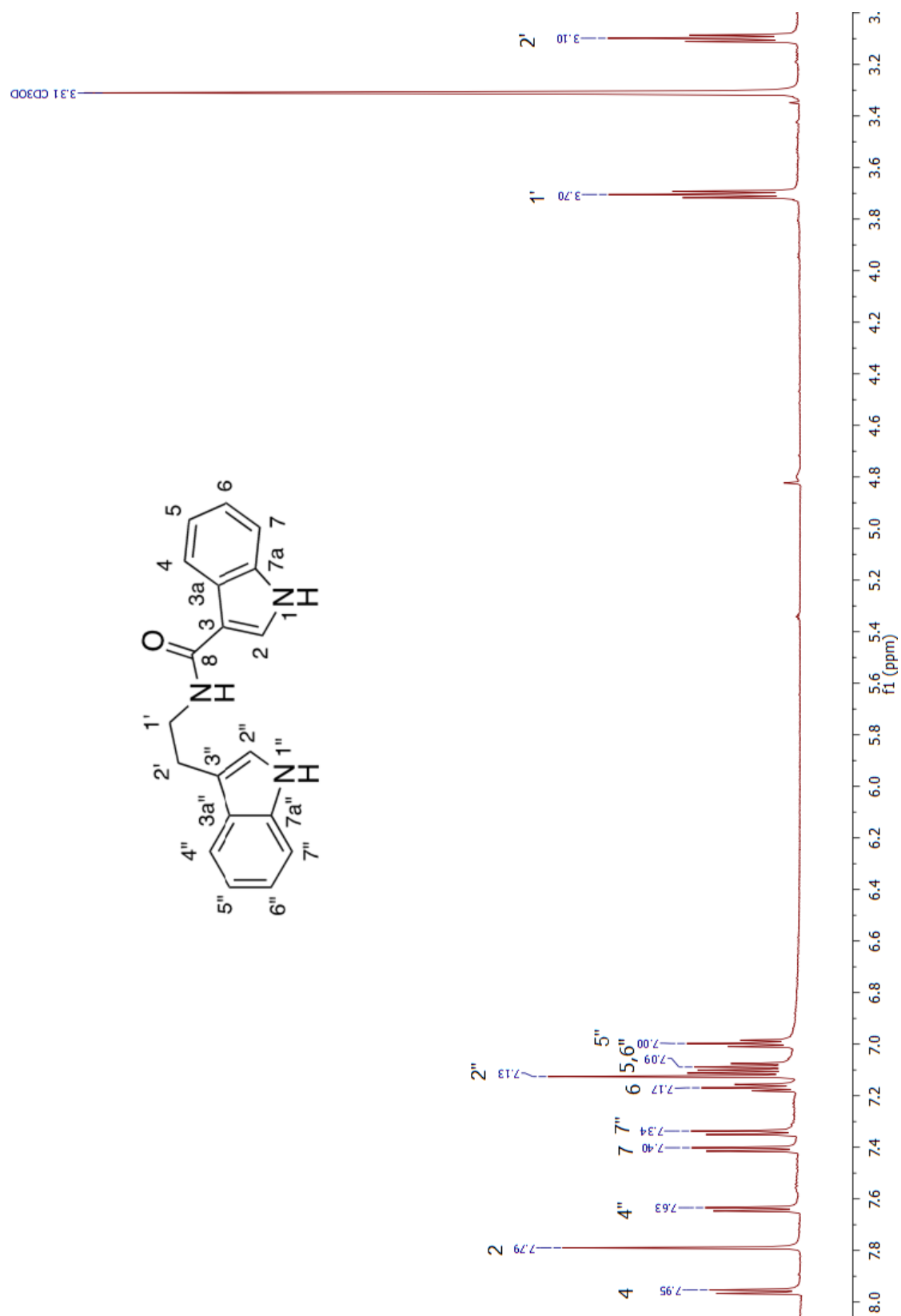
Spectre du proton <sup>1</sup>H du composé *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]formamide



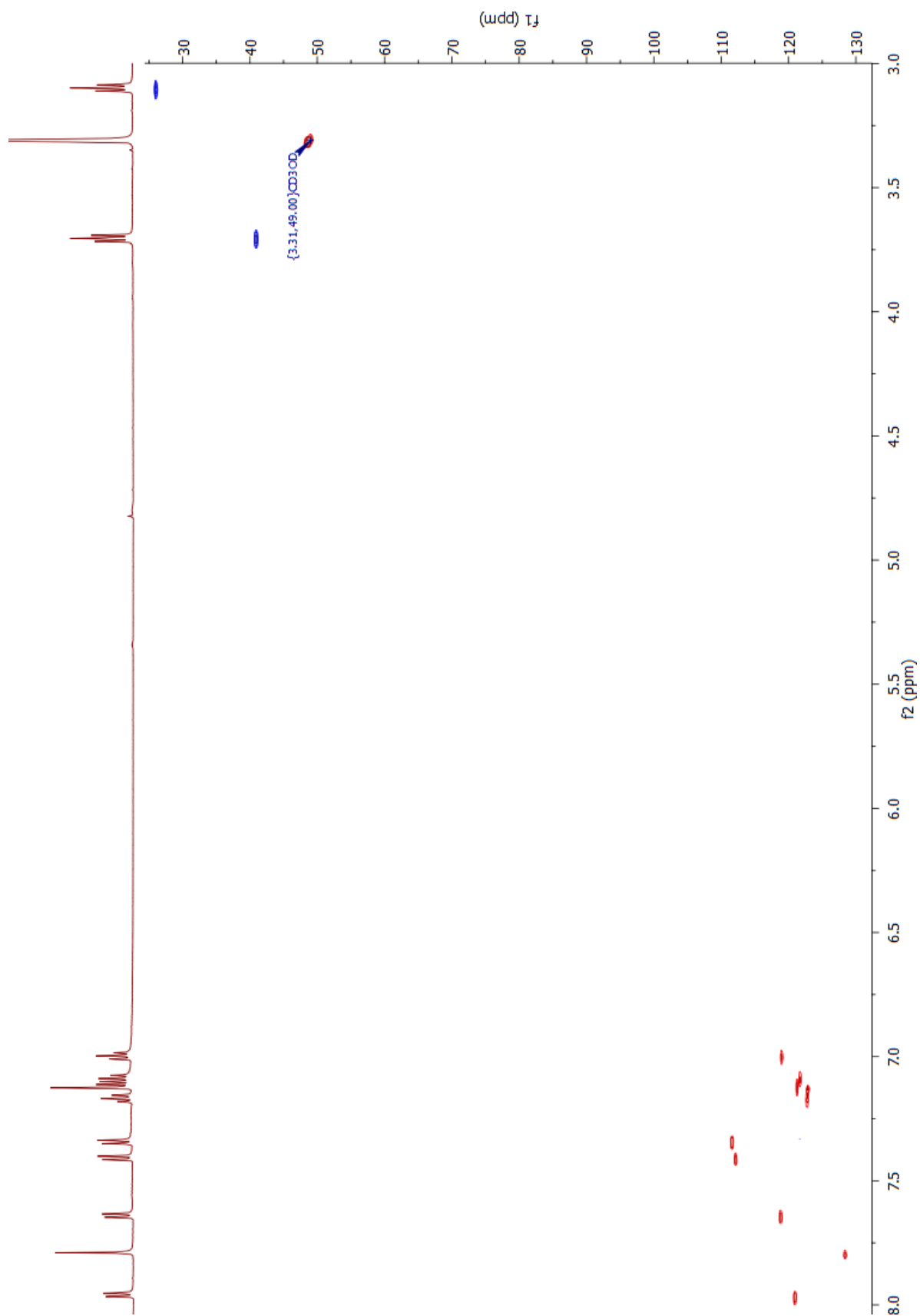
Spectre HSQC du composé *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]formamide



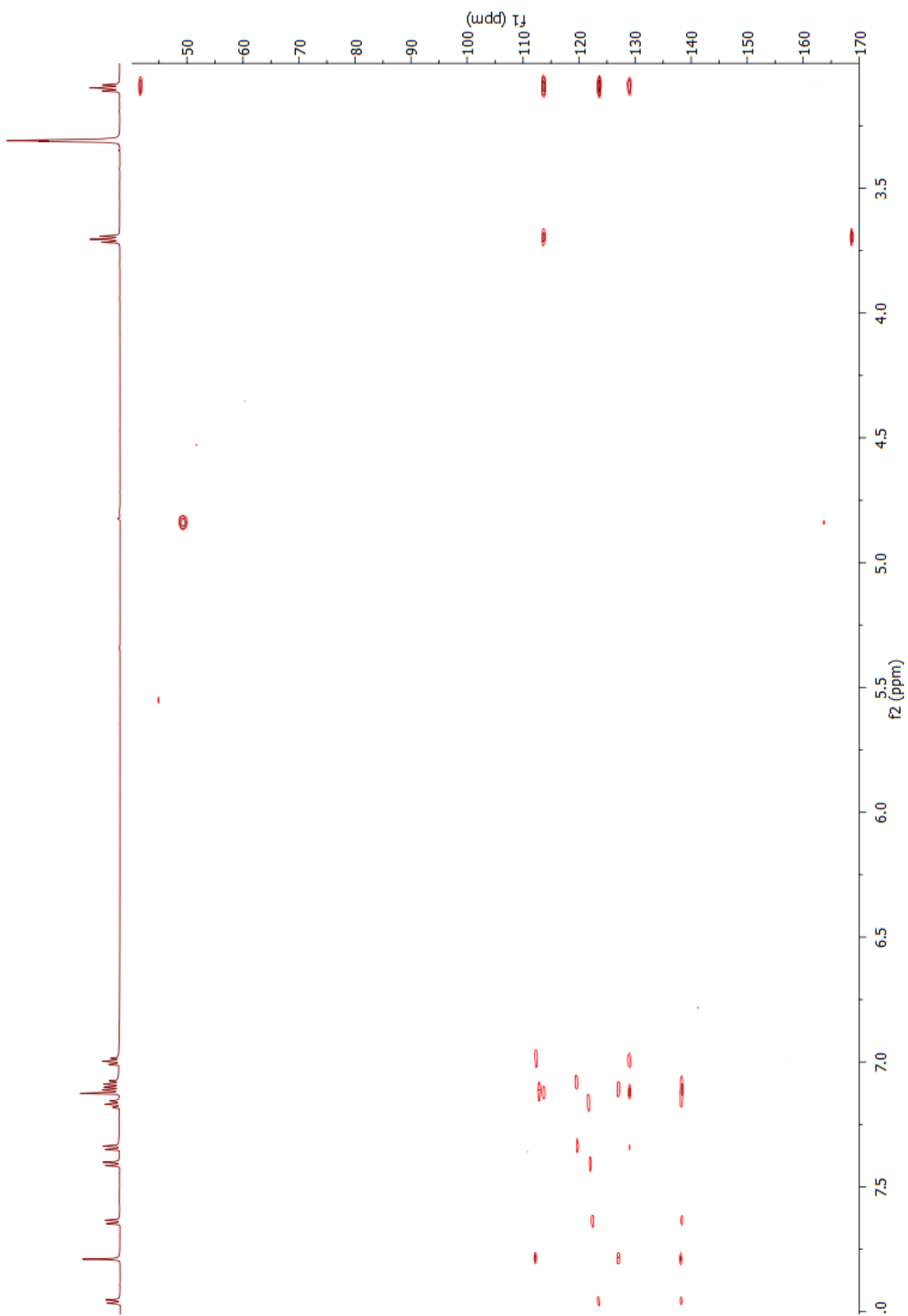
Annexe 2: Spectres RMN du composé *N*-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]- 1H-indole-3-carboxamide



Spectre du proton <sup>1</sup>H du composé *N*-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]- 1H-indole-3-carboxamide

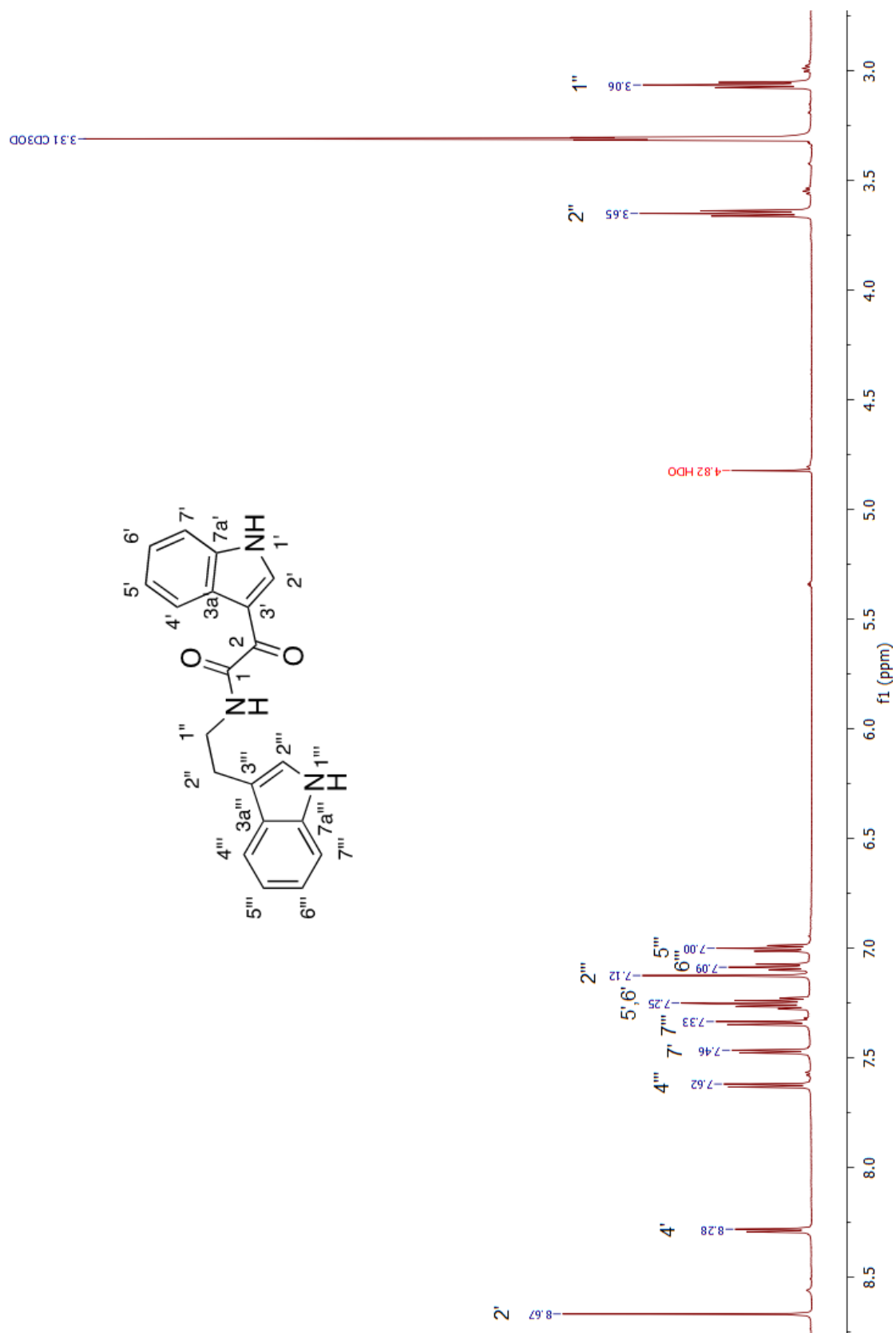


Spectre du proton HSQC du composé *N*-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]- 1H-indole-3-



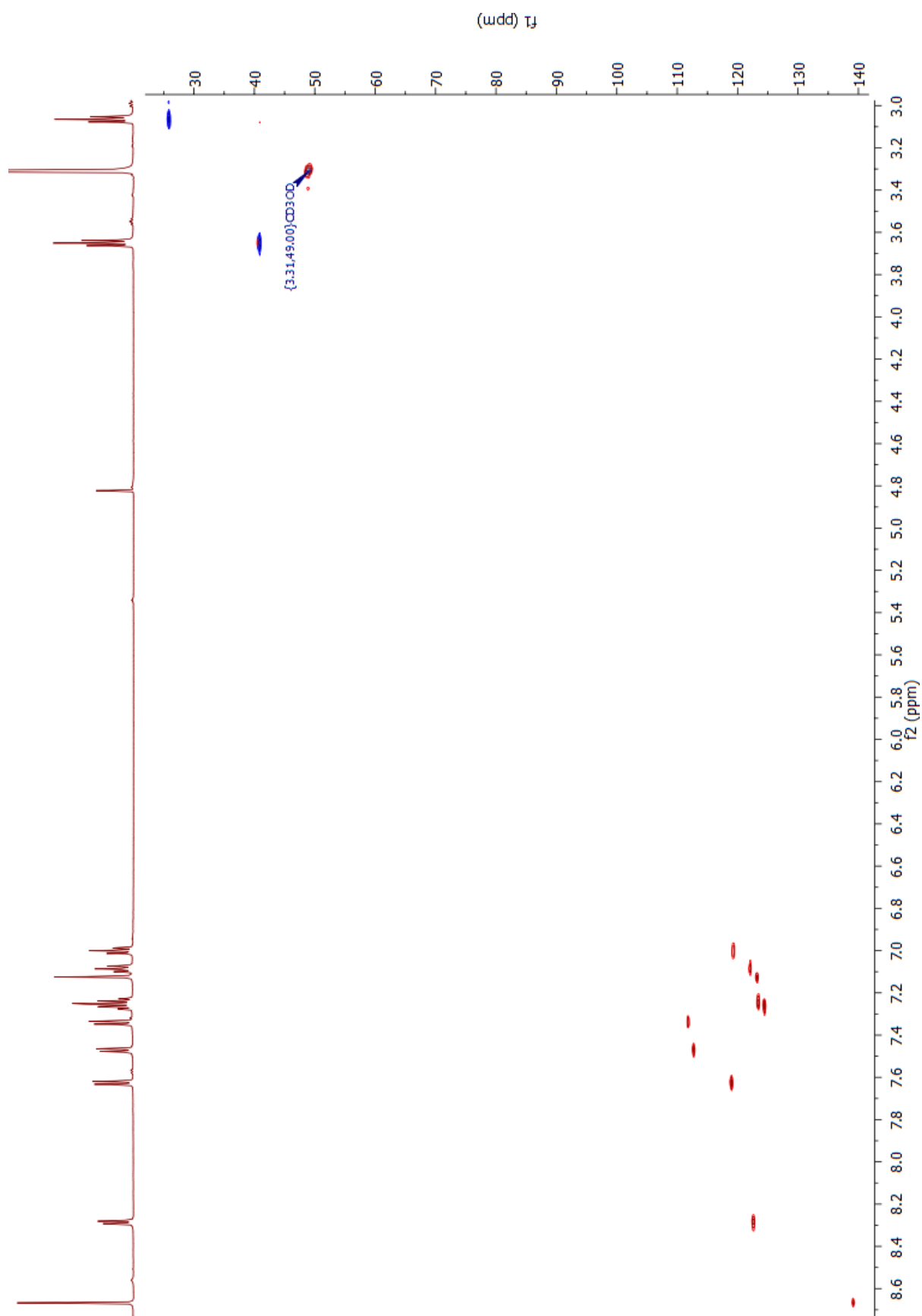
Spectre du proton HMBC du composé *N*-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-1H-indole-3-yl

Annexe 3: Spectres RMN du composé *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-2-(1 *H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamide

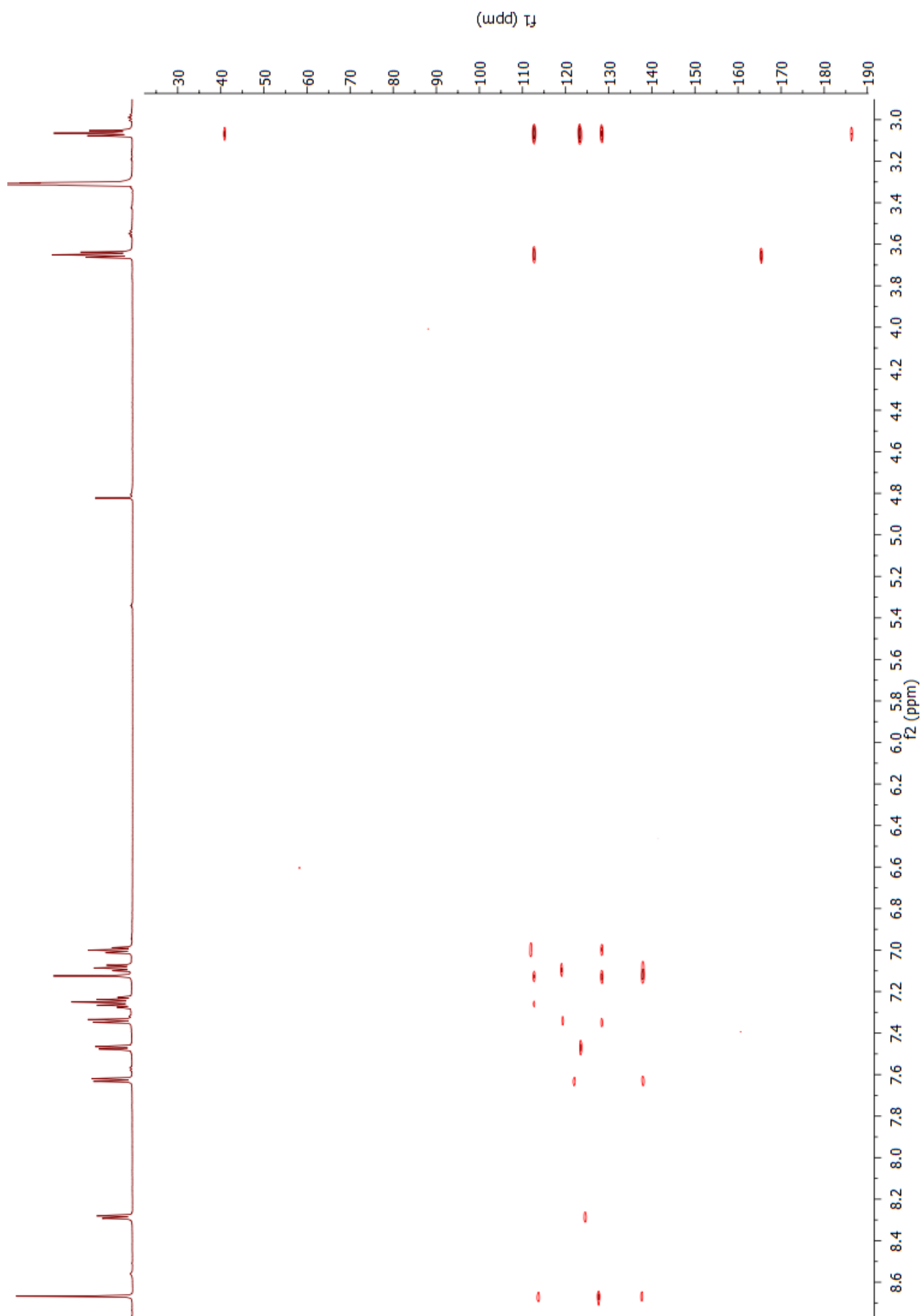


Spectre du proton <sup>1</sup>H du composé *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-2-(1 *H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamide





Spectre du HSQC du composé *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)éthyl]-2-(1 *H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamide



Spectre HMBC du composé *N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-2-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxoacetamide

## Bibliographie

- Aleixandre-Tudo, J.L., Nieuwoudt, H., Aleixandre, J.L., and du Toit, W. (2018). Chemometric compositional analysis of phenolic compounds in fermenting samples and wines using different infrared spectroscopy techniques. *Talanta* 176, 526–536.
- Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., and Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5, 601–611.
- Allard, P.-M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V.C., Roussi, F., Litaudon, M., and Wolfender, J.-L. (2016). Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Anal. Chem.* 88, 3317–3323.
- Almeida, G., Gagné, S., and Hernández, R.E. (2007). A NMR study of water distribution in hardwoods at several equilibrium moisture contents. *Wood Sci. Technol.* 41, 293.
- Almeida, M.R., Fidelis, C.H.V., Barata, L.E.S., and Poppi, R.J. (2013). Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. *Talanta* 117, 305–311.
- Aloui, F., Ayadi, N., Charrier, F., and Charrier, B. (2004). Durability of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) against white rot fungi (*Coriolus versicolor*) : relations with phenol extractives. *Holz Als Roh- Werkst.* 62, 286–290.
- Alves, A., Santos, A., Rozenberg, P., Pâques, L.E., Charpentier, J.-P., Schwanninger, M., and Rodrigues, J. (2012). A common near infrared—based partial least squares regression model for the prediction of wood density of *Pinus pinaster* and *Larix × eurolepis*. *Wood Sci. Technol.* 46, 157–175.
- Alves, A.M.M., Simões, R.F.S., Santos, C.A., Potts, B.M., Rodrigues, J., and Schwanninger, M. (2012). Determination of *Eucalyptus Globulus* wood extractives content by near infrared-based partial least squares regression models : Comparison between extraction procedures. *J. Infrared Spectrosc.* 20, 275–285.
- Amirkia, V., and Heinrich, M. (2014). Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochem. Lett.* 10, xlvi–liii.
- Amusant, N., Beauchêne, J., Fournier, M., Janin, G., and Thevenon, M.-F. (2004). Decay resistance in *Dicorynia guianensis* Amsh. : analysis of inter-tree and intra-tree variability and relations with wood colour. *Ann. For. Sci.* 61, 373–380.
- Amusant, N., Fournier, M., and Beauchêne, J. (2008). Colour and decay resistance and its relationships in *Eperua grandiflora*. *Ann. For. Sci.* 65, 806–806.
- Amusant, N., Nigg, M., Thibaut, B., and Beauchêne, J. (2014). Diversity of decay resistance strategies of durable tropical woods species: *Bocoa prouacensis* Aublet, *Vouacapoua americana* Aublet, *Inga alba* (Sw.) Wild. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 94, 103–108.
- Anagnost, S.E., and Smith, W.B. (1997). Comparative decay of heartwood and sapwood of Red Maple. *Wood Fiber Sci.* 29, 189–194.
- Anouhé, S.J.B. (2017). Recherche bioinspirée de la durabilité du bois de *Dicorynia guianensis* Amsh (Fabaceae), de molécules antifongiques et antioxydantes, isolement et caractérisation de

biomolécules. Nutrition -Pharmacologie. Université de Félix Houphouët-Boigny.

Anouhé, J.-B.S., Adima, A.A., Niamké, F.B., Stien, D., Amian, B.K., Blandinières, P.-A., Virieux, D., Pirat, J.-L., Kati-Coulibaly, S., and Amusant, N. (2015a). Dicorynamine and harmalan-N-oxide, two new  $\beta$ -carboline alkaloids from *Dicorynia guianensis* Amsh. heartwood. *Phytochem. Lett. Complete*, 158–163.

Anouhé, J.-B.S., Niamké, F.B., Faustin, M., Virieux, D., Pirat, J.-L., Adima, A.A., Kati-Coulibaly, S., and Amusant, N. (2018). The role of extractives in the natural durability of the heartwood of *Dicorynia guianensis* Amsh.: new insights in antioxydant and antifungal properties. *Ann. For. Sci.* 75, 15.

Araújo, A.M., Carvalho, F., Bastos, M. de L., Guedes de Pinho, P., and Carvalho, M. (2015). The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Arch. Toxicol.* 89, 1151–1173.

Arpino, P. (2009). Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. III. Techniques de l'ingénieur.

Ballu, J.-M. (2004). Bois de musique: la forêt berceau de l'harmonie (Le gerfaut). 192 p.

Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79.

Bamber, R.K. (1976). Heartwood, its function and formation. *Wood Sci. Technol.* 10, 1–8.

Baqui, S.A., and Shah, J.J. (1986). Histoenzymatic studies in wood of *Acacia auriculiformis* Cunn. during heartwood formation. *Holzforsch. Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 39, 311–320.

Beauchêne, J. (2012). Durabilité naturelle des bois de Guyane (CIRAD).

Ben, R.A.M., Shaaban, K.A., Rebai, I.K., Smaoui, S., Bejar, S., and Mellouli, L. (2009). Five naturally bioactive molecules including two rhamnopyranoside derivatives isolated from the *Streptomyces* sp. strain TN58. *Nat. Prod. Res.* 23, 1095–1107.

Bhat, K.M., and Florence, E.J.M. (2003). Natural Decay Resistance of Juvenile Teak Wood Grown in High Input Plantations. *Holzforschung* 57, 453–455.

Billker, O., Shaw, M.K., Jones, I.W., Ley, S.V., Mordue, A.J., and Sinden, R.E. (2002). Azadirachtin disrupts formation of organised microtubule arrays during microgametogenesis of *Plasmodium berghei*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 489–497.

Blanchette, R.A., Held, B.W., Jurgens, J.A., McNew, D.L., Harrington, T.C., Duncan, S.M., and Farrell, R.L. (2004). Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1328–1335.

Boizot, N., and Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composé phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cah. Tech. INRA Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*, 79–82.

Bokesch, H.R., Pannell, L.K., McKee, T.C., and Boyd, M.R. (2000). Coscinamides A, B and

C, three new bis indole alkaloids from the marine sponge *Coscinoderma* sp. *Tetrahedron Lett.* *41*, 6305–6308.

Bonjour, I. (1996). Variabilité de la qualité des bois d'une essence guyanaise: l'Angélique (*Dicorynia guianensis* Amsh.). ENGREF-CIRAD.

Bonjour, I. (2015). La Filière Forêt Et Bois En Guyane: Etat Des Lieux A Fin 2014 Et Perspectives.

Bossu, J. (2015). Potentiel de *Bagassa guianensis* et *Cordia alliodora* pour la plantation en zone tropicale : Description d'une stratégie de croissance optimale alliant vitesse de croissance et qualité du bois. Guyane.

Bossu, J., Beauchêne, J., Estevez, Y., Duplais, C., and Clair, B. (2016). New insights on wood dimensional stability influenced by secondary metabolites: The case of a fast-growing tropical species *Bagassa guianensis* Aubl. *PLoS ONE* *11*.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* *28*, 25–30.

Breitmaier, E. (1993). Structure elucidation by NMR in organic chemistry : a practical guide / (Chichester ; Wiley,).

Brémaud, I. (2006). Diversité des bois utilisés ou utilisables en facture d'instruments de musique. Étude expérimentale des propriétés vibratoires en direction axiale de types de bois contrastés en majorité tropicaux. Relations à des déterminants de microstructure et de composition chimique secondaire. Université Montpellier II.

Brischke, C., Bayerbach, R., and Rapp, A.O. (2006). Decay-influencing factors: A basis for service life prediction of wood and wood-based products. *Wood Mater. Sci. Eng.* *1*, 91–107.

Brischke, C., Meyer-Veltrup, L., Soetbeer, A., Höpken, M., Melcher, E., and Trautner, J. (2017). Comparative studies on the durability of English oak (*Quercus robur* L.) under in-service, field and laboratory conditions,. *Proc. IRG Annu. Meet. Ghent Belg.* 46-862017.

Brocco, V.F., Paes, J.B., Costa, L.G. da, Brazolin, S., and Arantes, M.D.C. (2017). Potential of teak heartwood extracts as a natural wood preservative. *J. Clean. Prod.* *142*, 2093–2099.

Browning, B.L. (1977). *Analysis of paper* (New York: Marcel Dekker, Inc). 366 p.

Bruneton, J. (2016). *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*, 5ème édition - (Paris: Lavoisier). 1487 p

Büsgen, M., Münch, F., and Thomson, T. (1930). The structure and life of forest trees. *Soil Sci.* *29*, 159.

Bush, D., McCarthy, K., and Meder, R. (2011). Genetic variation of natural durability traits in *Eucalyptus cladocalyx* (sugar gum). *Ann. For. Sci.* *68*, 1057.

Capanema, E.A., Balakshin, M.Y., and Kadla, J.F. (2005). Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 9639–9649.

- Carter, F.L., Garlo, A.M., and Stanley, J.B. (1978). Termiticidal components of wood extracts: 7-methyljuglone from *Diospyros virginiana*. *J. Agric. Food Chem.* 26, 869–873.
- Castro-Puyana, M., Pérez-Míguez, R., Montero, L., and Herrero, M. (2017). Reprint of: Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability. *TrAC Trends Anal. Chem.* 96, 62–78.
- Celedon, J.M., and Bohlmann, J. (2017). An extended model of heartwood secondary metabolism informed by functional genomics. *Tree Physiol.* 1–9.
- Celedon, J.M., Chiang, A., Yuen, M.M.S., Diaz-Chavez, M.L., Madilao, L.L., Finnegan, P.M., Barbour, E.L., and Bohlmann, J. (2016). Heartwood-specific transcriptome and metabolite signatures of tropical sandalwood (*Santalum album*) reveal the final step of (Z)-santalol fragrance biosynthesis. *Plant J.* 86, 289–299.
- Chaix, G., Monteuis, O., Goh, D.K.S., Kokutse, A.D., Derkyi, N.S.A., Kadio, A.A., Boutahar, N., and Baillères, H. (2008). Rapid prediction of teak wood natural durability using near-infrared spectroscopy. *Processing and Marketing of Teak Wood Products of Planted Forests*, 264–266.
- Chambers, J.Q., Higuchi, N., Schimel, J.P., Ferreira, L.V., and Melack, J.M. (2000). Decomposition and carbon cycling of dead trees in tropical forests of the central Amazon. *Oecologia* 122, 380–388.
- Chan, E. (2016). Devenir des carbohydrates non structuraux chez *Dicorynia guianensis* Amsh. au cours de la duraminisation. UMR EcofoG.
- Chapuset, T., Anleu Morales, J.V., Snoeck, D., Palu, S., and Najera, C.A. (2016). Improving rubber tree productivity by reducing tapping frequencies in Guatemala. Association for the Advancement of Industrial Crops International Conference, Rochester, États-Unis.
- Chave, J., Coomes, D., Jansen, S., Lewis, S.L., Swenson, N.G., and Zanne, A.E. (2009). Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecol. Lett.* 12, 351–366.
- Chen, H., Ferrari, C., Angiuli, M., Yao, J., Raspi, C., and Bramanti, E. (2010). Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Carbohydr. Polym.* 82, 772–778.
- Churro, C., Fernandes, A.S., Alverca, E., Sam-Bento, F., Paulino, S., Figueira, V.C., Bento, A.J., Prabhakar, S., Lobo, A.M., Martins, L.L., et al. (2010). Effects of tryptamine on growth, ultrastructure, and oxidative stress of cyanobacteria and microalgae cultures. *Hydrobiologia* 649, 195–206.
- CIRAD-CTFT (1993). Bois des DOM-TOM (Nogent-sur-Marne: CIRAD-CTFT).
- Conrad, A.O., and Bonello, P. (2016). Application of infrared and raman spectroscopy for the identification of disease resistant trees. *Front. Plant Sci.* 6.
- Conrad, A.O., Rodriguez-Saona, L.E., McPherson, B.A., Wood, D.L., and Bonello, P. (2014). Identification of *Quercus agrifolia* (coast live oak) resistant to the invasive pathogen *Phytophthora ramorum* in native stands using Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Front. Plant Sci.* 5, 521.

- Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Allison, S.D., Bauhus, J., Eggleton, P., Preston, C.M., Scarff, F., Weedon, J.T., Wirth, C., and Zanne, A.E. (2009). Plant traits and wood fates across the globe: rotted, burned, or consumed? *Glob. Change Biol.* *15*, 2431–2449.
- Cottet, K., Genta-Jouve, G., Fromentin, Y., Odonne, G., Duplais, C., Lapr evote, O., Michel, S., and Lallemand, M.-C. (2014). Comparative LC–MS-based metabolite profiling of the ancient tropical rainforest tree *Symphonia globulifera*. *Phytochemistry* *108*, 102–108.
- Cotton, J. (2015). Application de l’analyse métabolomique à la détection ciblée et globale de contaminants organiques dans des matrices agroalimentaires et environnementales par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution (Paris 6).
- Cray, J.A., Stevenson, A., Ball, P., Bankar, S.B., Eleutherio, E.C., Ezeji, T.C., Singhal, R.S., Thevelein, J.M., Timson, D.J., and Hallsworth, J.E. (2015). Chaotropicity: a key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* *33*, 228–259.
- Cretin, B. (2016). Recherches sur les déterminants moléculaires contribuant à l’équilibre gustatif des vins secs. Université de Bordeaux.
- Curnel, Y., Jacques, D., Gierlinger, N., and Pâques, L.E. (2008). Variation in the decay resistance of larch to fungi. *Ann. For. Sci.* *65*, 810–810.
- Dawkins, H.C. (1958). The management of natural tropical high-forest with special reference to Uganda (Imperial Forestry Institute, University of Oxford).
- Déjardin, A., Laurans, F., Arnaud, D., Breton, C., Pilate, G., and Lepl e, J.-C. (2010). Wood formation in Angiosperms. *C. R. Biol.* *333*, 325–334.
- Dellus, V., Mila, I., Scalbert, A., Menard, C., Michon, V., and Herve du Penhoat, C.L.M. (1997). Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochemistry* *45*, 1573–1578.
- D eon, G. (1980). A propos de la durabilité naturelle de l’Angélique (*Dicorynia guianensis* Amsh.) (Nogent-sur-Larne: Centre Technique Forestier Tropical).
- Dix, N., and Webster, J. (1995). *Fungal Ecology* (Springer Netherlands).
- Dupuy, N., Galtier, O., Le Dr eau, Y., Pinatel, C., Kister, J., and Artaud, J. (2010). Chemometric analysis of combined NIR and MIR spectra to characterize French olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *112*, 463–475.
- Dyckmans, J., Flessa, H., Brinkmann, K., Mai, C., and Polle, A. (2002). Carbon and nitrogen dynamics in acid detergent fibre lignins of beech (*Fagus sylvatica* L.) during the growth phase. *Plant Cell Environ.* *25*, 469–478.
- EN 335 (2013). Durabilité du bois et des matériaux   base de bois - Classes d’emploi : définitions, application au bois massif et aux matériaux   base de bois, AFNOR.
- EN 350 (2016). Durability of wood and wood based products – Testing and classification of the durability to biological agents of wood and wood based products, AFNOR.
- Ernst, M., Grace, O.M., Saslis-Lagoudakis, C.H., Nilsson, N., Simonsen, H.T., and R onsted, N.

- (2015). Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* *176*, 90–101.
- Estevão, M.S., Carvalho, L.C., Ribeiro, D., Couto, D., Freitas, M., Gomes, A., Ferreira, L.M., Fernandes, E., and Marques, M.M.B. (2010). Antioxidant activity of unexplored indole derivatives: Synthesis and screening. *Eur. J. Med. Chem.* *45*, 4869–4878.
- Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *52*, 29–66.
- Farrell, R.R., Wellinger, M., Gloess, A.N., Nichols, D.S., Breadmore, M.C., Shellie, R.A., and Yeretzyan, C. (2015). Real-Time Mass Spectrometry Monitoring of Oak Wood Toasting: Elucidating Aroma Development Relevant to Oak-aged Wine Quality. *Sci. Rep.* *5*, 17334.
- Fauset, S., Johnson, M.O., Gloor, M., Baker, T.R., M, A.M., Brienen, R.J.W., Feldpausch, T.R., Lopez-Gonzalez, G., Malhi, Y., Steege, H. ter, et al. (2015). Hyperdominance in Amazonian forest carbon cycling. *Nat. Commun.* *6*, 6857.
- Foston, M. (2014). Advances in solid-state NMR of cellulose. *Curr. Opin. Biotechnol.* *27*, 176–184.
- Fouquet, D. (2009). Durabilité naturelle et préservation des bois tropicaux (Versailles: Ed. Quae). 127 p.
- van Geffen, K.G., Poorter, L., Sass-Klaassen, U., van Logtestijn, R.S.P., and Cornelissen, J.H.C. (2010). The trait contribution to wood decomposition rates of 15 Neotropical tree species. *Ecology* *91*, 3686–3697.
- Gierlinger, N., Schwanninger, M., Hinterstoisser, B., and Wimmer, R. (2002). Rapid determination of heartwood extractives in *Larix sp* by means of Fourier transform near infrared spectroscopy. *J. Infrared Spectrosc.* *10*, 203–214.
- Gierlinger, N., Jacques, D., Schwanninger, M., Wimmer, R., Hinterstoisser, B., and Pâques, L.E. (2003). Rapid prediction of natural durability of larch heartwood using Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Can. J. For. Res.* *33*, 1727–1736.
- Gierlinger, N., Jacques, D., Grabner, M., Wimmer, R., Schwanninger, M., Rozenberg, P., and Pâques, L.E. (2004). Colour of larch heartwood and relationships to extractives and brown-rot decay resistance. *Trees* *18*, 102–108.
- Giger, S. (1985). Revue sur les méthodes de dosage de la lignine utilisées en alimentation animale. *Ann. Zootech.* *34*, 85–122.
- Gomez-Casati, D.F., Zanol, M.I., and Busi, M.V. (2013). Metabolomics in Plants and Humans: Applications in the Prevention and Diagnosis of Diseases. *Biomed Research International.* 792527.
- Górecki, T., Lynen, F., Szucs, R., and Sandra, P. (2006). Universal Response in Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection. *Anal. Chem.* *78*, 3186–3192.
- Guerra, F.P., Richards, J.H., Fiehn, O., Famula, R., Stanton, B.J., Shuren, R., Sykes, R., Davis,



- M.F., and Neale, D.B. (2016). Analysis of the genetic variation in growth, ecophysiology, and chemical and metabolomic composition of wood of *Populus trichocarpa* provenances. *Tree Genet. Genomes* 12, 6.
- Guilley, E., Charpentier, J.P., Ayadi, N., Snakkers, G., Nepveu, G., and Charrier, B. (2004). Decay resistance against *Coriolus versicolor* in Sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.): analysis of the between-tree variability and correlations with extractives, tree growth and other basic wood properties. *Wood Sci. Technol.* 38, 539–554.
- Gupta, B.S., Jelle, B., Petter, R., and Gao, T. (2015). Application of ATR-FTIR Spectroscopy to Compare the Cell Materials of Wood Decay Fungi with Wood Mould Fungi. *International Journal of Spectroscopy*. 7, 521938
- Gupta, L., Talwar, A., Nishi, null, Palne, S., Gupta, S., and Chauhan, P.M.S. (2007). Synthesis of marine alkaloid: 8,9-dihydrococcinamide B and its analogues as Novel class of antileishmanial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 4075–4079.
- Haluk, J.-P., and Roussel, C. (2000). Caractérisation et origine des tropolones responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées. Application potentielle en préservation du bois. *Ann. For. Sci.* 57, 819–829.
- Harju, A., and Venäläinen, M. (2011). Measuring the decay resistance of Scots pine heartwood indirectly by the Folin-Ciocalteu assay. *Can. J. For. Res.* 36, 1797–1804.
- Hassan, B., Mankowski, M., Kirker, G.T., Ahmed, S., and Haq, M.M. ul (2016). Antitermitic Activities of Shisham (*Dalbergia Sissoo* Roxb.) Heartwood Extractives against two Termite Species. *Proc. IRG Annu. Meet. ISSN 2000-8953 IRGWP 16-10856 Int. Res. GROUP WOOD Prot.* 1–16.
- Hassan, B., Mankowski, M.E., Kirker, G., and Ahmed, S. (2017). Effects of heartwood extractives on symbiotic protozoan communities and mortality in two termite species. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 123, 27–36.
- Hazenberg, G., and Yang, K.C. (1991). Sapwood/Heartwood Width Relationships with Tree Age in Balsam Fir. *IAWA J.* 12, 95–99.
- Hérault, B., Beauchêne, J., Muller, F., Wagner, F., Baraloto, C., Blanc, L., and Martin, J.-M. (2010). Modeling decay rates of dead wood in a neotropical forest. *Oecologia* 164, 243–251.
- Hon, D., and Shiraishi, N. (2000). *Wood and Cellulosic Chemistry* (CRC Press). Marcel Dekker: New York and Basel. 914 p.
- Huang, Z., Hashida, K., Makino, R., Kawamura, F., Shimizu, K., Kondo, R., and Ohara, S. (2009). Evaluation of biological activities of extracts from 22 African tropical wood species. *J. Wood Sci.* 55, 225–229.
- Huang, Z., Tsai, C.-J., Harding, S.A., Meilan, R., and Woeste, K. (2010). A cross-species transcriptional profile analysis of heartwood formation in black walnut. *Plant Molecular Biology Reporter* 28, 222-230.
- Humar, M., Fabčić, B., Zupančič, M., Pohleven, F., and Oven, P. (2008). Influence of xylem growth ring width and wood density on durability of oak heartwood. *Int. Biodeterior.*

Biodegrad. 62, 368–371.

IAWA (1964). Multilingual glossary of terms used in wood anatomy (Switzerland: Verlaganstalt Buchdruckerei Konkordia Winterthur).

INSEE (2018). Insee - Institut national de la statistique et des études économiques.

Ioannidis, K., Melliou, E., Alizoti, P., and Magiatis, P. (2016). Identification of black pine (*Pinus nigra* Arn.) heartwood as a rich source of bioactive stilbenes by qNMR. *J. Sci. Food Agric.*

Ismayati, M., Nakagawa-Izumi, A., Kamaluddin, N.N., and Ohi, H. (2016). Toxicity and Feeding Deterrent Effect of 2-Methylantraquinone from the Wood Extractives of *Tectona grandis* on the Subterranean Termites *Coptotermes formosanus* and *Reticulitermes speratus*. *Insects* 7.

Janusz, G., Kucharzyk, K.H., Pawlik, A., Staszczak, M., and Paszczynski, A.J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 52, 1–12.

Kabera, J. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 2014 2, 377–392.

Kahl, T., Arnstadt, T., Baber, K., Bässler, C., Bauhus, J., Borken, W., Buscot, F., Floren, A., Heibl, C., Hessenmöller, D., et al. (2017). Wood decay rates of 13 temperate tree species in relation to wood properties, enzyme activities and organismic diversities. *For. Ecol. Manag.* 391, 86–95.

Kampe, A., and Magel, E. (2013). New Insights into Heartwood and Heartwood Formation. In *Cellular Aspects of Wood Formation*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 71–95.

Kashima, M. (1999). Effects of catechins on superoxide and hydroxyl radical. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 47, 279–283.

Kataoka, Y., and Kiguchi, M. (2001). Depth profiling of photo-induced degradation in wood by FT-IR microspectroscopy. *J. Wood Sci.* 47, 325–327.

Kirker, G.T., Blodgett, A.B., Arango, R.A., Lebow, P.K., and Clausen, C.A. (2013). The role of extractives in naturally durable wood species. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 82, 53–58.

Klumpers, J., Scalbert, A., and Janin, G. (1994). Ellagitannins in European oak wood: Polymerization during wood ageing. *Phytochemistry* 36, 1249–1252.

Kokutse, A.D., Baillères, H., Stokes, A., and Kokou, K. (2004). Proportion and quality of heartwood in Togolese teak (*Tectona grandis* L.f.). *For. Ecol. Manag.* 189, 37–48.

Kokutse, A.D., Stokes, A., Baillères, H., Kokou, K., and Baudasse, C. (2006). Decay resistance of Togolese teak (*Tectona grandis* L.f) heartwood and relationship with colour. *Trees* 20, 219–223.

Kokutse, A.D., Amusant, N., Boutahar, N., and Chaix, G. (2010a). Influence of soil properties

on the natural durability, extractive content and colour of teak (*Tectona grandis* L.f.) wood in Togo. *Ann. Univ. Parakou Ser. Sci. Nat. Agron.* 1, 37–50.

Kokutse, A.-D., Brancheriau, L., and Chaix, G. (2010b). Rapid prediction of shrinkage and fibre saturation point on teak (*Tectona grandis*) wood based on near-infrared spectroscopy. *Ann. For. Sci.* 67, 403–403.

Kokutse, A.D., Stokes, A., Kokutse, N.K., and Kokou, K. (2010c). Which factors most influence heartwood distribution and radial growth in plantation teak? *Ann. For. Sci.* 67, 407–407.

Konno, K. (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry* 72, 1510–1530.

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., and Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9452–9458.

Korfmacher, W.A. (2005). Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov. Today* 10, 1357–1367.

Kukachka, B.F. (1964). Angélique : *Dicorynia guianensis* Amsh. Res. Note FPL No 071 Madison WI USDA For. Serv. For. Prod. Lab. 83 p.

Latorraca, J.V.F., Dunisch, O., and Koch, G. (2011). Chemical composition and natural durability of juvenile and mature heartwood of *Robinia pseudoacacia* L. *An. Acad. Bras. Cienc.* 83, 1059–1068.

Leal, S., Sousa, V.B., Knapic, S., Louzada, J.L., and Pereira, H. (2011). Vessel size and number are contributors to define wood density in cork oak. *Eur. J. For. Res.* 130, 1023–1029.

Lee, K.H., Wi, S.G., Singh, A.P., and Kim, Y.S. (2004). Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *J. Wood Sci.* 50, 281–284.

Lehnebach, R. (2015). Etude de la variabilité ontogénique du profil ligneux chez quelques espèces forestières tropicales de Guyane Française. Montpellier.

Lehnebach, R., Beauchêne, J., Amusant, N., and Nicolini, E. (2013). Structure des couronnes et variation de l'épaisseur et de la surface d'aubier chez l'Angélique de Guyane (*Dicorynia guianensis* Amsh., Caesalpinioideae, Fabaceae).

Lehnebach, R., Morel, H., Bossu, J., Mogueédec, G.L., Amusant, N., Beauchêne, J., and Nicolini, E. (2017). Heartwood/sapwood profile and the tradeoff between trunk and crown increment in a natural forest: the case study of a tropical tree (*Dicorynia guianensis* Amsh., Fabaceae). *Trees* 31, 199–214.

Leong, F.J., Li, R., Jain, J.P., Lefèvre, G., Magnusson, B., Diagana, T.T., and Pertel, P. (2014). A first-in-human randomized, double-blind, placebo-controlled, single-and multiple-ascending oral dose study of novel antimalarial Spiroindolone KAE609 (Cipargamin) to assess its safety,

tolerability, and pharmacokinetics in healthy adult volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 6209–6214.

Lim, K.-J., Paasela, T., Harju, A., Venäläinen, M., Paulin, L., Auvinen, P., Kärkkäinen, K., and Teeri, T.H. (2016). Developmental Changes in Scots Pine Transcriptome during Heartwood Formation. *Plant Physiol.* *172*, 1403–1417.

Lindsay, S. (1992). *High Performance Liquid Chromatography* (John Wiley & Sons).

Liu, F., Bai, X., Yang, F.-Q., Zhang, X.-J., Hu, Y., Li, P., and Wan, J.-B. (2016). Discriminating from species of *Curcumae Radix (Yujin)* by a UHPLC/Q-TOFMS-based metabolomics approach. *Chin. Med.* *11*, 21.

Lu, J., Venäläinen, M., Julkunen-Tiitto, R., and Harju, A.M. (2015). Stilbene impregnation retards brown-rot decay of Scots pine sapwood. *Holzforschung* *70*, 261–266.

Magel, E.A., Drouet, A., Claudot, A.C., and Ziegler, H. (1991). Formation of heartwood substances in the stem of *Robinia pseudoacacia* L. *Trees* *5*, 203–207.

Malz, F., and Jancke, H. (2005). Validation of quantitative NMR. *J Pharm Biomed Anal* *38*, 813–823.

Marinho, F.F., Simões, A.O., Barcellos, T., and Moura, S. (2016). Brazilian *Tabernaemontana* genus : Indole alkaloids and phytochemical activities. *Fitoterapia* *114*, 127–137.

Martucci, M.E.P., Vos, R.C.H.D., Carollo, C.A., and Gobbo-Neto, L. (2014). Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool : Application in the Genus *Vernonia* Schreb. *PLOS ONE* *9*, e93149.

Meder, R., Gallagher, S., Mackie, K.L., Böhrer, H., and Meglen, R.R. (1999). Rapid determination of the chemical composition and density of *Pinus radiata* by PLS modelling of transmission and diffuse reflectance FTIR spectra. *Holzforschung* *53*, 261–266.

Mohamed, A.A., Ali, S.I., EL-Baz, F.K., Hegazy, A.K., and Kord, M.A. (2014). Chemical composition of essential oil and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of *Commiphora myrrha* resin. *Ind. Crops Prod.* *57*, 10–16.

Monties, B. (1984). Dosage de la lignine insoluble en milieu acide : influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie* *4*, 387–392.

Moro, G.A., Graziano, M.N., and Coussio, J.D. (1975). Alkaloids of *Prosopis nigra*. *Phytochemistry* *14*, 827.

Morris, H., Brodersen, C., Schwarze, F.W.M.R., and Jansen, S. (2016). The Parenchyma of Secondary Xylem and Its Critical Role in Tree Defense against Fungal Decay in Relation to the CODIT Model. *Front. Plant Sci.* *7*.

Mosedale, J., Charrier, B., Crouch, N., Janin, G., and Savill, P. (1996). Variation in the composition and content of ellagitannins in the heartwood of European oaks (*Quercus robur* and *Quercus petraea*). A comparison of two French forests and variation with heartwood age. *Ann. Sci. For.* *53*, 1005–1018.

- Mounguengui, S., Tchinda, J.-B.S., Ndikontar, M.K., Dumarçay, S., Attéké, C., Perrin, D., Gelhaye, E., and Gérardin, P. (2016). Total phenolic and lignin contents, phytochemical screening, antioxidant and fungal inhibition properties of the heartwood extractives of ten Congo Basin tree species. *Ann. For. Sci.* 73, 287–296.
- Moya, R., Bond, B., and Quesada, H. (2014). A review of heartwood properties of *Tectona grandis* trees from fast-growth plantations. *Wood Sci. Technol.* 48, 411–433.
- Nascimento, M.S., Santana, A.L.B.D., Maranhão, C.A., and Bieber, L.S.O. and L. (2013). Phenolic Extractives and Natural Resistance of Wood. *Biodegrad. - Life Sci.*
- Nawrot, M., Pazdrowski, W., and Szymanski, M. (2008). Dynamics of heartwood formation and axial and radial distribution of sapwood and heartwood in stems of European larch (*Larix decidua* Mill.). *J. For. Sci.* 54, 409–417.
- Niamké, F.B. (2010). Recherche des déterminants biochimiques de la durabilité naturelle du bois de teck (*Tectona grandis*). Montpellier 2.
- Niamké, F., Amusant, N., Kadio, A., Thevenon, M., Nourissier, S., Adima, A., Jay-Allemand, C., and Chaix, G. (2014). Rapid prediction of phenolic compounds as chemical markers for the natural durability of teak (*Tectona grandis* Linn f.) heartwood by near infrared spectroscopy. *J. Infrared Spectrosc.* 22, 35–43.
- Niamké, F.B., Amusant, N., Stien, D., Chaix, G., Lozano, Y., Kadio, A.A., Lemenager, N., Goh, D., Adima, A.A., Kati-Coulibaly, S., et al. (2012). 4',5'-Dihydroxy-epiisocatalponol, a new naphthoquinone from *Tectona grandis* L. f. heartwood, and fungicidal activity. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 74, 93–98.
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E. (1999). “Metabonomics” : understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181–1189.
- Niessen, W.M.A. (1999). State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 856, 179–197.
- Nuopponen, M., Vuorinen, T., Jämsä, S., and Viitaniemi, P. (2005). Thermal Modifications in Softwood Studied by FT-IR and UV Resonance Raman Spectroscopies. *J. Wood Chem. Technol.* 24, 13–26.
- Nuopponen, M.H., Birch, G.M., Sykes, R.J., Lee, S.J., and Stewart, D. (2006). Estimation of wood density and chemical composition by means of diffuse reflectance mid-infrared Fourier transform (DRIFT-MIR) spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 54, 34–40.
- Oikkonen, A., Harju, A., Venäläinen, M., Saranpää, P., and Laakso, T. (2008). FT-NIR spectroscopy in predicting the decay resistance related characteristics of solid Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) heartwood. *Holzforschung* 62, 284–288.
- Oleynik, A., Trubnikova, Y., Kandalintseva, N., and Grigoriev, I. (2007). Studies on Antioxidative Properties of Nitrones from 3-Imidazoline-3-oxide, Dihydropyrazine-1, 4-dioxide and 2'-imidazole-1-oxide Series in the Reactions with Peroxyde Radicals. *Chem. Sustain. Dev.* 555–559.

Oliveira, L.S., Santana, A.L.B.D., Maranhão, C.A., de Miranda, R. de C.M., Galvão de Lima, V.L.A., da Silva, S.I., Nascimento, M.S., and Bieber, L. (2010). Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 711–715.

ONF (2015). ONF - Essences forestières de Guyane valorisables en bois de charpente.

Panche, A.N., Diwan, A.D., and Chandra, S.R. (2016). Flavonoids : an overview. *J. Nutr. Sci.* 5.

Passarini, L., Malveau, C., and Hernández, R.E. (2014). Water State Study of Wood Structure of Four Hardwoods Below Fiber Saturation Point with Nuclear Magnetic Resonance. *Wood Fiber Sci.* 46, 480–488.

Pauli, G.F., Jaki, B.U., and Lankin, D.C. (2005). Quantitative <sup>1</sup>H NMR : Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. *J. Nat. Prod.* 68, 133–149.

Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A. (2001). Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* 127, 1513–1523.

Poke, F.S., Potts, B.M., Vaillancourt, R.E., and Raymond, C.A. (2006). Genetic parameters for lignin, extractives and decay in *Eucalyptus globulus*. *Ann. For. Sci.* 63, 813–821.

Pretsch, E., Buehlmann, P., Affolter, C., Pretsch, E., Buehlmann, P., and Affolter, C. (2000). Structure determination of organic compounds (Springer).

Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302.

Proniewicz, L., Paluszkiwicz, C., Weselucha-Birczyńska, A., Majcherczyk, H., Barański, A., and Konieczna, A. (2001). FT-IR and FT-Raman study of hydrothermally degraded cellulose. *J. Mol. Struct.* 596, 163–169.

Raiskila, S., Pulkkinen, M., Laakso, T., Fagerstedt, K., Mahlberg, R., Paaanen, L., Ritschkoff, A.-C., and Saranpaa, P. (2007). FTIR Spectroscopic Prediction of Klason and Acid Soluble Lignin Variation in Norway Spruce Cutting Clones. *Silva Fenn.* 41.

Rajemison, A.H. (2013). Proposition d'essences de substitution aux bois précieux en épuisement par la connaissance des propriétés du matériau bois : cas du palissandre de Madagascar : application en ameublement. Toulouse 3.

Rana, R., Langenfeld-Heyser, R., Finkeldey, R., and Polle, A. (2009). FTIR spectroscopy, chemical and histochemical characterisation of wood and lignin of five tropical timber wood species of the family of Dipterocarpaceae. *Wood Sci. Technol.* 44, 225–242.

Rodrigues, A. (2010). Analyse et valorisation bioinspirée des métabolites secondaires à l'origine de la durabilité naturelle des bois exploités de Guyane française. Antilles-Guyane.

Rodrigues, A.M.S., Theodoro, P.N.E.T., Eparvier, V., Basset, C., Silva, M.R.R., Beauchêne, J., Espíndola, L.S., and Stien, D. (2010). Search for Antifungal Compounds from the Wood of Durable Tropical Trees. *J. Nat. Prod.* 73, 1706–1707.

- Rodrigues, A.M.S., Amusant, N., Beauchêne, J., Eparvier, V., Leménager, N., Baudassé, C., Espindola, L.S., and Stien, D. (2011). The termiticidal activity of *Sextonia rubra* (Mez) van der Werff (Lauraceae) extract and its active constituent rubrynolide. *Pest Manag. Sci.* *67*, 1420–1423.
- Rodrigues, A.M.S., Stien, D., Eparvier, V., Espindola, L.S., Beauchêne, J., Amusant, N., Leménager, N., Baudassé, C., and Raguin, L. (2012). The wood preservative potential of long-lasting Amazonian wood extracts. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *75*, 146–149.
- Roggy, C., Nicolini, E., Imbert, P., Caraglio, Y., Bosc, A., and Heuret, P. (2005). Links between tree structure and functional leaf traits in the tropical forest tree *Dicorynia guianensis* Amshoff (Caesalpinaceae). *Ann. For. Sci.* *62*, 553–564.
- Romera-Fernández, M., Berrueta, L.A., Garmón-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F., and Moreda, J.M. (2012). Feasibility study of FT-MIR spectroscopy and PLS-R for the fast determination of anthocyanins in wine. *Talanta* *88*, 303–310.
- Royer, M. (2008). Les molécules responsables de la stabilité des bois : cas des bois tropicaux de Guyane. Université des Antilles et de la Guyane.
- Royer, M., Stien, D., Beauchêne, J., Herbette, G., McLean, J.P., Thibaut, A., and Thibaut, B. (2010). Extractives of the tropical wood wallaba (*Eperua falcata* Aubl.) as natural anti-swelling agents. *Holzforschung* *64*, 211–215.
- Rutishauser, E., Barthélémy, D., Blanc, L., and Eric-André, N. (2011). Crown fragmentation assessment in tropical trees : Method, insights and perspectives. *For. Ecol. Manag.* *261*, 400–407.
- Salehzadeh, A., Akhkhah, A., Cushley, W., Adams, R.L.P., Kusel, J.R., and Strang, R.H.C. (2003). The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *33*, 681–689.
- Santoni, I., Callone, E., Sandak, A., Sandak, J., and Dirè, S. (2015). Solid state NMR and IR characterization of wood polymer structure in relation to tree provenance. *Carbohydr. Polym.* *117*, 710–721.
- Santos, A.J.A., Alves, A.M.M., Simões, R.M.S., Pereira, H., Rodrigues, J., and Schwanninger, M. (2012). Estimation of Wood Basic Density of *Acacia Melanoxylon* (R. Br.) by near Infrared Spectroscopy. *J. Infrared Spectrosc.* *20*, 267–274.
- Schimleck, L.R., Michell, A.J., Raymond, C.A., and Muneri, A. (1999). Estimation of basic density of *Eucalyptus globulus* using near-infrared spectroscopy. *Can. J. For. Res.* *29*, 194–201.
- Schmitt, M., Spiering, F., Zhaunerchyk, V., Jongma, R.T., Jaeqx, S., Rijs, A.M., and van der Zande, W.J. (2016). Far-infrared spectra of the tryptamine A conformer by IR-UV ion gain spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *PCCP* *18*, 32116–32124.
- Schultz, T.P., and Nicholas, D.D. (2000). Naturally durable heartwood : evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* *54*, 47–52.
- Schultz, T.P., and Nicholas, D.D. (2002). Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal

chelators. *Phytochemistry* 61, 555–560.

Schwanninger, M., Rodrigues, J.C., Pereira, H., and Hinterstoisser, B. (2004). Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vib. Spectrosc.* 36, 23–40.

Schwanninger, M., Rodrigues, J., Carlos, and Fackler, K. (2011). A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. *J. Infrared Spectrosc.* 19, 287–308.

Schwarze, F.W.M.R. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal Biol. Rev.* 21, 133–170.

Schwarze, F.W.M.R., Fink, S., and Deflorio, G. (2003). Resistance of parenchyma cells in wood to degradation by brown rot fungi. *Mycol. Prog.* 2, 267–274.

Shigo, A.L. (1984). Compartmentalization : a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 22 189-214 22, 189–214.

Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief. Bioinform.* 7, 128–139.

Simmler, C., Napolitano, J.G., McAlpine, J.B., Chen, S.-N., and Pauli, G.F. (2014). Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Curr. Opin. Biotechnol.* 25, 51–59.

Skyba, O., Douglas, C.J., and Mansfield, S.D. (2013). Syringyl-Rich Lignin Renders Poplars More Resistant to Degradation by Wood Decay Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2560–2571.

Spicer, R. (2005). 22 - Senescence in Secondary Xylem : Heartwood Formation as an Active Developmental Program. In *Vascular Transport in Plants*, N.M. Holbrook, and M.A. Zwieniecki, eds. (Burlington : Academic Press), pp. 457–475.

Steege, H. ter, Pitman, N.C.A., Sabatier, D., Baraloto, C., Salomão, R.P., Guevara, J.E., Phillips, O.L., Castilho, C.V., Magnusson, W.E., Molino, J.-F., et al. (2013). Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. *Science* 342, 1243092.

Stevanovic (2016). Chemical Composition and Properties of Wood. *Lignocellul. Fibers Wood Handb.* Chapter 3.

Stevanovic, T., and Perrin, D. (2009). *Chimie du bois* (Presses polytechniques et universitaires romandes). 240 p.

Stirling, R., and Morris, P.I. (2011). New perspectives on the role of extractives in the durability of western redcedar. *Proc Can Wood Preserv Assoc* 32, 12.

Stuart, B.H. (2004). *Infrared Spectroscopy : Fundamentals and Applications* (Wiley).

Sun, Y., Zhang, G., Zhang, Z., Yu, P., Zhong, H., Du, J., and Wang, Y. (2012). Novel multi-functional nitrones for treatment of ischemic stroke. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 3939–3945.

Swartz, M.E. (2005). UPLC<sup>TM</sup>: An Introduction and Review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28, 1253–1263.



- Sykacek, E., Gierlinger, N., Wimmer, R., and Schwanninger, M. (2006). Prediction of natural durability of commercial available European and Siberian larch by near-infrared spectroscopy. *Holzforschung* 60, 643–647.
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A.K., and Westerhuis, J.A. (2012). Double-check : validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics* 8, 3–16.
- Tao, L., Lin, Z., Chen, J., Wu, Y., and Liu, X. (2017). Mid-infrared and near-infrared spectroscopy for rapid detection of *Gardeniae Fructus* by a liquid-liquid extraction process. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145, 1–9.
- Taylor, A.M., Gartner, B.L., and Morrell, J.J. (2002). Heartwood formation and natural durability—a review. *Wood Fiber Sci.* 34, 587–611.
- Taylor, A., Labbé, N. & Noehmer, A. (2011). NIR-based prediction of extractives in American white oak heartwood. *Holzforschung*, 65(2), 185-190.
- Taylor, A.M., Labbé, N., and Noehmer, A. (2011). NIR-based prediction of extractives in American white oak heartwood. *Holzforschung* 65, 185–190.
- Thygesen, L.G. (1994). Determination of Dry Matter Content and Basic Density of Norway Spruce by near Infrared Reflectance and Transmittance Spectroscopy. *J. Infrared Spectrosc.* 2, 127–135.
- Tondi, G., and Petutschnigg, A. (2015). Middle infrared (ATR FT-MIR) characterization of industrial tannin extracts. *Ind. Crops Prod.* 65, 422–428.
- Tondi, G., Schnabel, T., Wieland, S., and Petutschnigg, A. (2013). Surface properties of tannin treated wood during natural and artificial weathering. *Int. Wood Prod. J.* 4, 150–157.
- Tripati, S., Shukla, S.R., Shashikala, S., and Sardar, A.A. (2016). Teak (*Tectona grandis* L.f.): A preferred timber for shipbuilding in India as evidenced from shipwrecks.
- Tsuchikawa, S., and Kobori, H. (2015). A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. *J. Wood Sci.* 61, 213–220.
- Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biol. Rev.* 31, 113–123.
- Vanbellinghen, Q.P., Fu, T., Bich, C., Amusant, N., Stien, D., Della-Negra, S., Touboul, D., and Brunelle, A. (2016a). Mapping *Dicorynia guianensis* Amsh. wood constituents by submicron resolution cluster-TOF-SIMS imaging. *Eur. J. Mass Spectrom.* 51, 412–423.
- Vargas, F., D. O. de Almeida, P., Aranha, E.S.P., de A. Boleti, A.P., Newton, P., Vasconcellos, M.C., Junior, V.F.V., and Lima, E.S. (2015). Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera spp.* *Oleoresins. Molecules* 20, 6194–6210.
- Veale, C.G.L., Edkins, A.L., de la Mare, J.-A., de Kock, C., Smith, P.J., and Khanye, S.D. (2015). Facile synthesis and biological evaluation of assorted indolyl-3-amides and esters from a single, stable carbonyl nitrile intermediate. *Tetrahedron Lett.* 56, 1860–1864.

- Venäläinen, M., Harju, A.M., Nikkanen, T., Paajanen, L., Velling, P., and Viitanen, H. (2001). Genetic Variation in the Decay Resistance of Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) Wood. *Holzforschung* 55, 1–6.
- Venäläinen, M., Harju, A.M., Saranpää, P., Kainulainen, P., Tiitta, M., and Velling, P. (2004). The concentration of phenolics in brown-rot decay resistant and susceptible Scots pine heartwood. *Wood Sci. Technol.* 38, 109–118.
- Wang, C.-C., Liu, H.-Z., Liu, M., Zhang, Y.-Y., Li, T.-T., and Lin, X.-K. (2011). Cytotoxic metabolites from the soil-derived fungus *Exophiala pisciphila*. *Molecules* 16, 2796–2801.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapon, C.A., Luzzatto-Knaan, T., et al. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* 34, 828–837.
- Weedon, J.T., Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Zanne, A.E., Wirth, C., and Coomes, D.A. (2009). Global meta-analysis of wood decomposition rates: a role for trait variation among tree species? *Ecol. Lett.* 12, 45–56.
- Wegner, T., Skog, K.E., Ince, P.J., and Michler, C.J. (2010). Uses and desirable properties of wood in the 21st century. *J. For.* Vol 108 No 4 June 2010, 165-173.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Phyo, A.P., Rueangweerayut, R., Nosten, F., Jittamala, P., Jeeyapant, A., Jain, J.P., Lefèvre, G., and Li, R. (2014). Spiroindolone KAE609 for falciparum and vivax malaria. *N. Engl. J. Med.* 371, 403–410.
- Williamson, G.B., and Wiemann, M.C. (2010). Measuring wood specific gravity...Correctly. *Am. J. Bot.* 97, 519–524.
- Wimmers, G. (2017). Wood: a construction material for tall buildings.
- Wong, A., Wilkes, J., and Heather, W.A. (1983). Influence of wood density and extractives content on the decay resistance of the heartwood of *Eucalyptus delegatensis* R.T. Baker. *Wood Sci.* 54, 261–263.
- Wong, A., Wilkes, J., and Heather, W.A. (1984). Inter- and intra-incremental variation in basic density, extractives content and decay resistance in *Eucalyptus delegatensis*. *Mater. Org.* 19, 141–148.
- Wu, S.-F., Hwang, T.-L., Chen, S.-L., Wu, C.-C., Ohkoshi, E., Lee, K.-H., Chang, F.-R., and Wu, Y.-C. (2011). Bioactive components from the heartwood of *Pterocarpus santalinus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 5630–5632.
- Xiao, J.F., Zhou, B., and Ransom, H.W. (2012). Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *TrAC Trends Anal. Chem.* 32, 1–14.
- XP CEN/TS 15083-2 (2006). Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois - Détermination de la durabilité naturelle du bois massif vis-à-vis des champignons lignivores - Méthodes d'essai - Partie 2 : micro-organismes de pourriture molle, AFNOR.
- Yamamoto, K. (Forestry and F.P.R.I., and Hong, L.T. (1994). A laboratory method for

predicting the durability of tropical hardwoods. JARQ Japan.

Yang, K.C. (1990). The aging process of sapwood ray parenchyma cells in four woody species. University of British Columbia.

Yang, J., Kamdem, D.P., Keathley, D.E., and Han, K.-H. (2004). Seasonal changes in gene expression at the sapwood-heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis. *Tree Physiol.* 24, 461–474.

Yang, J.Y., Sanchez, L.M., Rath, C.M., Liu, X., Boudreau, P.D., Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., de Felicio, R., Fenner, A., et al. (2013). Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod.* 76, 1686–1699.

Yang, M.-L., Kuo, P.-C., Hwang, T.-L., and Wu, T.-S. (2011). Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis*. *J. Nat. Prod.* 74, 1996–2000.

Ye, Z.-H., and Zhong, R. (2015). Molecular control of wood formation in trees. *J. Exp. Bot.* 66, 4119–4131.

Yen, T.-B., Chang, H.-T., Hsieh, C.-C., and Chang, S.-T. (2008). Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresour. Technol.* 99, 4871–4877.

Zabel, R.A., and Morrell, J.J. (1992). *Wood Microbiology: Decay and Its Prevention* (Academic Press).

Zhang, B., Cai, J., Duan, C.-Q., Reeves, M.J., and He, F. (2015). A Review of Polyphenolics in Oak Woods. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 6978–7014.

Zhou, J., Weber, R.J.M., Allwood, J.W., Mistrik, R., Zhu, Z., Ji, Z., Chen, S., Dunn, W.B., He, S., and Viant, M.R. (2014). HAMMER: automated operation of mass frontier to construct in silico mass spectral fragmentation libraries. *Bioinformatics* 30, 581–583.

Ziegler, H. (1968). Biologische Aspekte der Kernholzbildung. *Holz Als Roh- Werkst.* 26, 61–68.