



**HAL**  
open science

## Analyse des composés phénoliques du bois de mélèze

Sibylle Gremaud

► **To cite this version:**

| Sibylle Gremaud. Analyse des composés phénoliques du bois de mélèze. 2015, 52 p. hal-01269319

**HAL Id: hal-01269319**

**<https://hal.science/hal-01269319>**

Submitted on 5 Jun 2020

**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.

**Sibylle GREMAUD**

Licence Professionnelle de Chimie Analyse Contrôle

IUT Chimie d'Orléans

Promotion 2014/2015



# Analyse des composés phénoliques du bois de mélèze

Stage du 30 mars au 31 août 2015



Maître de stage : Jean-Paul CHARPENTIER, Unité AGFP, INRA Orléans

Professeur référent : Mme Bérengère CLAUDE, IUT Chimie, Université Orléans



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier M. Gilles PILATE, Directeur de l'unité de recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, d'avoir permis la réalisation de mon stage au sein de son unité.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à M. Jean-Paul CHARPENTIER, responsable de la plateforme technologique régionale GENOBOIS, ingénieur de recherche et responsable de mon stage, qui a su m'accorder sa confiance dans ce projet et pour toute l'aide qu'il m'a accordée afin de mieux cerner les différentes tâches à accomplir tout au long de mon stage.

De même je souhaite remercier Mme Nathalie BOIZOT, Assistante Ingénieure, M. Kévin ADER, technicien de Recherche, M. Vincent SEGURA, Chargé de Recherche, M. Luc PAQUES, Directeur de Recherche, pour avoir répondu à mes interrogations, pour le temps et le soutien qu'ils m'ont accordés lors des différentes manipulations.

Je remercie également Mademoiselle Bérengère CLAUDE, mon professeur tuteur, pour ses conseils et le suivi au cours de mon stage.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes, titulaires et non permanents de l'INRA d'Orléans, pour leur accueil et leur bonne humeur.

## Table des matières

Remerciements .....	2
Introduction générale.....	5

### *Partie Economique*

I - L'Institut National de la Recherche Agronomique .....	7
1 – Historique .....	7
2 - Le budget .....	7
3 - Les effectifs .....	8
4 - Organisation et structure générale de l'INRA.....	8
II - L'INRA d'Orléans.....	9
1 - Présentation du site d'Orléans .....	9
2 - Présentation de l'unité AGPF .....	9
3 - Les objectifs de l'unité.....	10

### *Partie Scientifique*

I – Introduction scientifique .....	12
1 - Structure du bois.....	12
2 - Présentation du mélèze .....	13
3 - Les composés phénoliques.....	14
4 - La durabilité naturelle et la couleur du mélèze .....	15
5 - Le projet européen d'infrastructures Trees for Future .....	15
II - Matériel et méthodes .....	16
1 - Présentation des échantillons.....	16
2 - Méthodes .....	16
2.1 - Broyage des échantillons .....	16
2.2 - Extraction des extractibles du bois .....	17
2.3 - Extraction des composés phénoliques du bois.....	18
2.4 - Dosage des phénols totaux par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu .....	19
2.5 - Dosage de la Taxifoline et du Dihydrokaempférol par HPL C .....	23
2.6 - Analyse des poudres en Spectrométrie Proche InfraRouge .....	27
III – Résultats et Discussions.....	29
1 – Les extractibles totaux dans le bois de mélèze .....	29
2 – Les composés phénoliques totaux dans le bois de mélèze .....	30

<i>3 – Répartition des teneurs en Taxifoline et en DHK dans le bois de mélèze .....</i>	<i>31</i>
3.1 – Gamme d'étalonnage en Taxifoline pour l'analyse en chromatographie liquide .....	31
3.2 - Chromatogramme d'un extrait de bois de mélèze .....	32
3.3 – Variation des teneurs en Taxifoline et en Dihydrokaempferol dans le bois de mélèze .....	32
<i>4 – Analyse des spectres Proche InfraRouge avec le logiciel R, établissement de modèle de calibration pour les données chimiques du bois .....</i>	<i>34</i>
4.1 – Prétraitement statistiques des spectres .....	34
4.2 – Modèle de calibration .....	34
Conclusion scientifique.....	40
Conclusion personnelle.....	41
Annexes.....	42
Bibliographie.....	50

## Introduction générale

Le bois de mélèze est un bois noble et est considéré comme durable naturellement (classe 3) purgé d'aubier. Il a une masse volumique qui s'apparente à celle du chêne (environ 600 kg / m<sup>3</sup>). Sa résistance aux insectes et aux pourritures permet de l'utiliser comme bois d'intérieur mais également comme bois d'extérieur notamment en tant que bardage. Cependant, certains arbres de mélèze ne présentent pas cette durabilité naturelle.

C'est dans ce contexte de sélection et d'amélioration génétique du mélèze que j'ai effectué mon stage au sein du centre INRA Val de Loire à Orléans et plus particulièrement dans l'unité d'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières.

Sous l'encadrement de Jean-Paul Charpentier, je me suis intéressée à l'extraction et l'analyse des composés phénoliques présents dans le bois de mélèze qui sont les principaux facteurs de la durabilité naturelle conférée. Ce travail fait partie de l'étude de la durabilité naturelle de ce bois dans le cadre du projet européen *Trees For Future*. Pour répondre aux objectifs qui m'ont été confiés, j'ai utilisé différentes méthodes d'extraction et techniques de dosages. Les résultats de ces analyses ainsi que les données acquises lors de cette étude vont permettre de créer un modèle de prédiction en spectrométrie proche infrarouge afin d'évaluer la durabilité naturelle du mélèze seulement grâce à une carotte prélevée sur l'arbre et ainsi mettre en place une méthode innovante de mesure de la durabilité naturelle du bois.

## Partie Economique

---

# **I - L'Institut National de la Recherche Agronomique [10]**

## **1 - Historique**

1946 : Création de l'Institut National de la Recherche Agronomique afin d'améliorer les techniques de production et la sélection génétique végétale et animale dans le but de développer l'agriculture après la guerre.

1984 : L'INRA devient un Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique. L'organisation est sous la tutelle des ministères de la Recherche et de l'Agriculture. Elle a notamment pour objectif d'accroître la qualité des produits et adapter ces derniers à la demande des consommateurs. De plus, elle doit gérer et protéger les ressources naturelles ainsi que l'espace rural.

Années 1990 : L'INRA élargit son domaine de compétences dans les secteurs de l'agriculture, l'alimentation et l'environnement. La santé de l'homme devient un des enjeux principaux de la recherche ainsi que l'impact des activités agricoles sur les ressources naturelles.

1998 : L'INRA a entrepris une réforme pour la mise en place d'une meilleure adéquation de ses compétences et de ses recherches à la nouvelle demande socio-économique (alimentation, santé et environnement).

2010 : Le conseil d'administration de l'INRA adopte, le 18 juin, un document d'orientation décennale qui va étudier des problématiques qui sont partagées mondialement.

## **2 - Le budget**

En 2013, L'INRA avait un budget qui s'élevait à 881.61 M€. Ce dernier provient à 77,0% de subventions pour charges de service public, 17,0% de subventions et soutiens finalisés à l'activité de la recherche, 4,9% de produits valorisés de l'activité de recherche et prestations de services et 1,1% d'autres subventions et produits.



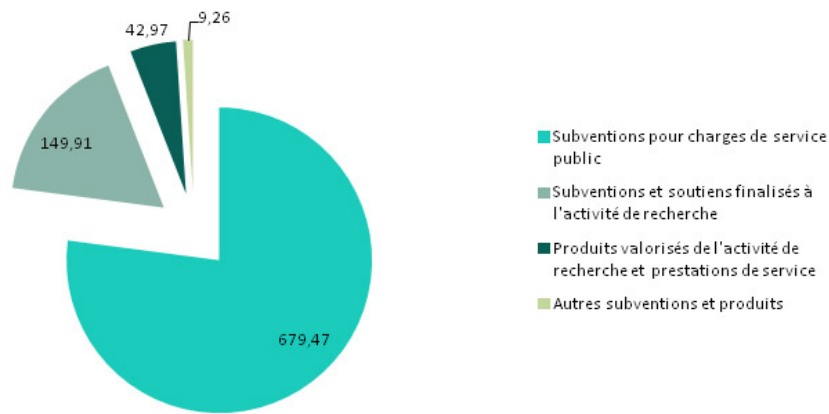


Figure 1 : Organigramme du budget de l'INRA en 2013 [10]

### 3 - Les effectifs

En 2013, l'INRA c'est :

- 8356 agents titulaires
- 1843 chercheurs titulaires
- 497 doctorants
- 2446 stagiaires

### 4 - Organisation et structure générale de l'INRA

L'INRA compte 17 centres de recherches comprenant 199 unités de recherches et 48 unités expérimentales réparties sur l'ensemble du territoire français y compris en outre-mer. Il s'agit de l'organisme de recherche public le plus décentralisé.



Figure 2 : Répartition des centres INRA en France [10]

## II - L'INRA d'Orléans [11]

L'INRA Centre Val de Loire est constitué de trois sites : un à Orléans, un à Tours et un à Bourges.

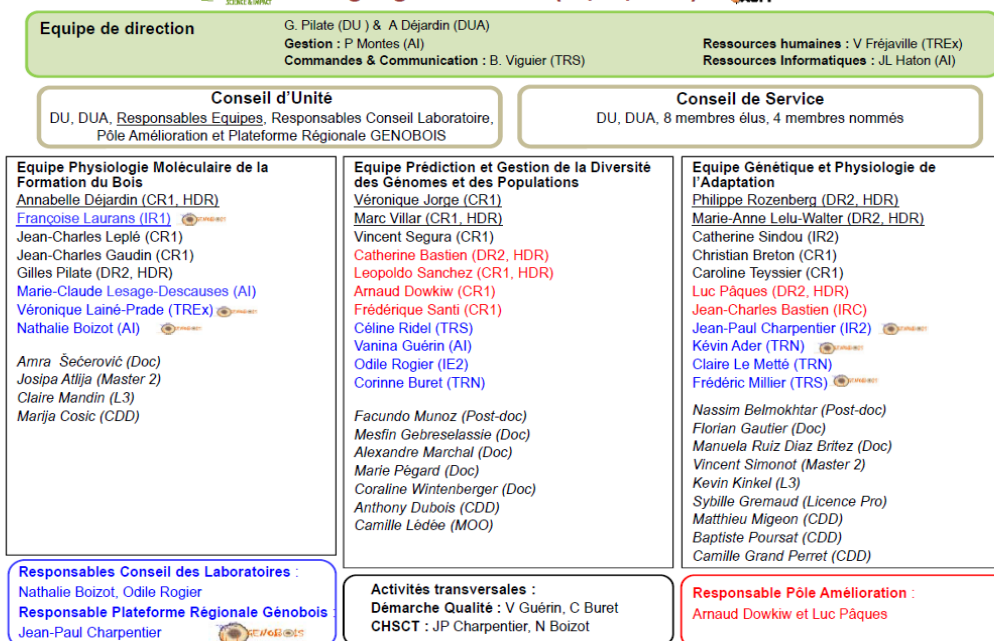
### 1 - Présentation du site d'Orléans

Plusieurs unités sont présentes sur le site d'Orléans :

- ❖ Unités de recherche :
  - Amélioration Génétique et Physiologie Forestières (AGPF)
  - Science du Sol
  - Zoologie Forestière
  
- ❖ Unités expérimentales :
  - Génétique et Biomasse Forestières (GBFOR)
  - Domaine expérimental de Bourges (Génétique Animale)
  
- ❖ Unité de service :
  - InfoSol
  
- ❖ Unité administrative :
  - Service déconcentré d'appui à la recherche (SDAR)

### 2 - Présentation de l'unité AGPF

L'Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF) est sous la direction de Gilles PILATE. Le personnel scientifique de l'unité se répartit en trois équipes et travaille dans quatre laboratoires : Biochimie Analytique, Biologie Moléculaire, Biologie Cellulaire et Histologie. Trente permanents (chercheurs, ingénieurs et techniciens) et vingt non permanents (CDD, doctorants, post doctorants, stagiaires et apprentis) travaillent dans cette unité de recherche.



**Figure 3 : Organigramme de l'unité AGPF [11]**

L'unité travaille étroitement avec le Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers (CGAF) de l'Office National Forestier (ONF), hébergé dans l'unité. Sous contrat INRA, l'unité collabore également avec l'équipe ARCHE (Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales) du laboratoire LBLGC (Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures) de l'Université d'Orléans et l'unité expérimentale Génétique et Biomasse Forestières d'Orléans (GBFOR).

### 3 - Les objectifs de l'unité

L'unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF) œuvre pour une forêt durable et à même de produire du bois pour de nombreux usages. Pour ce faire, elle s'appuie sur les techniques de génétique quantitative, de biochimie, de biologie cellulaire et moléculaire.

L'unité AGPF cherche à :

- Développer des connaissances en génétique et en physiologie des arbres forestiers
- Conduire des programmes d'amélioration sur les feuillus et les conifères d'intérêt
- Transférer son savoir-faire aux partenaires de la filière graines et plants forestiers

Ces travaux ont pour objectif final de produire du bois de qualité en grande quantité tout en veillant à l'équilibre de l'écosystème.

# Partie Scientifique

---

# I – Introduction scientifique

## 1 - Structure du bois

Les troncs d'arbres de diverses espèces ont une structure semblable. Les différentes parties sont, de l'extérieur vers l'intérieur : l'écorce, le phloème, le cambium, le xylème ou bois comprenant l'aubier et le duramen (également nommé bois de cœur).

L'écorce protège le tronc de l'arbre des insectes, intempéries, micro-organismes, UV, etc.

Le phloème est composé de cellules vivantes, qui forment des canaux conducteurs, où est transportée la sève élaborée, enrichie en glucides, produite par la photosynthèse au niveau des feuilles et qui va circuler jusqu'aux racines.

Le cambium est le méristème responsable de la croissance de l'arbre dans le sens radial c'est-à-dire en épaisseur. Les divisions cellulaires, qui ont lieu dans cette partie pendant la période de croissance (avril à août), donne naissance à l'aubier vers le côté interne et au phloème vers l'extérieur.

L'aubier est constitué de cellules qui transportent la sève brute des racines aux feuilles dans le ou les derniers cerne formés. Plus les cellules sont proches du duramen plus elles se duraminisent et donc meurent.

La zone de transition entre le duramen et l'aubier n'est pas présente chez toutes les espèces. Elle ne contient que très peu de cellules vivantes (environ 5%). Il s'agit d'une zone intermédiaire où ont lieu les dernières transformations chimiques conduisant à la formation du bois de cœur : c'est la duraminisation.

Le duramen (ou bois de cœur) correspond à la zone la plus sombre en général. Cette partie est formée exclusivement de cellules mortes. Il s'agit de la partie utilisée exclusivement en industrie pour la construction car c'est la zone la plus durable, la plus résistante. En effet, le duramen contient des "antiseptiques" naturels tels que les tanins, divers composés phénoliques, stilbènes, résines etc. [8] [1]

Cette durabilité naturelle du bois de cœur, qui en fait sa richesse et sa propriété la plus recherchée chez certaines essences (on parle aussi de bois parfait), est due à la mise en place et

à l'accumulation des produits tels que les composés phénoliques qui lui confèrent cette résistance aux agresseurs de toutes sortes. Cette transformation chimique (duraminisation) qui se passe au niveau de la zone de transition (limite aubier/duramen) a lieu plus ou moins tôt dans la vie de l'arbre et est plus ou moins importante en quantité selon les espèces. Cette caractéristique est sous contrôle génétique mais les effets environnementaux et la sylviculture peuvent également influencer ce phénomène. [18]

Les composés mis en place lors de cette duraminisation donnent très souvent une couleur différente au duramen et lui confère aussi un plus esthétique recherché pour l'ameublement et la marqueterie. [6]

## 2 - Présentation du mélèze

Le mélèze est un conifère qui appartient à la famille des pinacées et plus particulièrement du genre *Larix*. Il s'agit d'un résineux qui possède des aiguilles caduques. En effet, le mélèze est le seul conifère en Europe à perdre ses aiguilles en hiver. [21]

En Europe, il existe majoritairement 3 espèces de mélèze :

Le mélèze d'Europe alpin (*Larix decidua*) possède de bonnes propriétés mais a une croissance lente. Il aime les zones très lumineuses et à forte amplitude thermique. Il est rencontré à partir d'une certaine altitude dans les Alpes.

Le mélèze du Japon (*Larix kaempferi*) a des propriétés un peu moins bonnes que le mélèze d'Europe mais sa croissance est plus rapide. Cette espèce préfère les climats doux et humides tels que le climat océanique.

Le mélèze hybride (*Larix eurolepsis*) est obtenu par pollinisation du mélèze d'Europe alpin par le mélèze du Japon. Il est plus vigoureux que ses parents, a une croissance initiale plus rapide, possède une bonne résistance au chancre mais est plus sensible à la sécheresse. De plus, cette espèce peut être plantée en plaine ou en basse altitude comme dans le Limousin. [23]

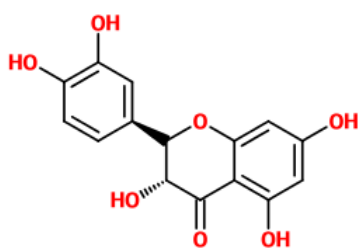
### 3 - Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont constitués d'un ou plusieurs noyaux benzéniques comportant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées, notamment dans une liaison avec un glucide. Ce sont des extractibles car ils sont à la fois solubles dans les solvants organiques et aqueux.

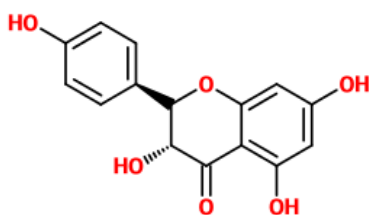
De manière générale, les composés phénoliques ont un rôle important dans la résistance des plantes qui sont attaquées par des parasites. Ces molécules agissent soit en tant que barrière mécanique soit en tant que barrière chimique (ex : antifongiques). En effet, dans le bois, ils ont pour rôle d'inhiber ou de diminuer la croissance des champignons et de repousser les insectes.

Les composés phénoliques regroupent plusieurs familles de composés tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins, etc.

Le mélèze est constitué de plusieurs types de composés phénoliques. Néanmoins, seuls deux composés sont majoritaires dans le bois : la dihydroquercétine, ou plus couramment nommée taxifoline (TAX), et le dihydrokaempférol (DHK). Ce sont des flavonoïdes ( $C_6-C_3-C_6$ ) et plus particulièrement des dihydroflavonols. [15]



Taxifoline (TAX)



Dihydrokaempférol (DHK)

#### 4 - La durabilité naturelle et la couleur du mélèze

Comme développé ci-dessus, les composés phénoliques vont conférer au bois une protection contre les agents pathogènes (champignons, insectes etc.). Lors de la duraminisation du bois de mélèze, les composés phénoliques s'accumulent fortement dans cette zone morte de l'arbre comme une sorte de stockage et de détoxification. C'est cet élément qui permet d'expliquer le fort niveau de durabilité du mélèze.

De plus, la quantité de composés phénoliques va agir sur la couleur du bois. En effet, plus les composés phénoliques sont présents dans le bois, plus il sera foncé, surtout après oxydation des composés. Certains peuvent conserver leur fluorescence dans le bois. [15]

#### 5 - Le projet européen d'infrastructures *Trees for Future*

*Trees for Future* (T4F) est un projet européen qui a débuté le 1<sup>er</sup> novembre 2011 et qui se finit en avril 2016. Il regroupe 28 partenaires positionnés à travers toute l'Europe. Le budget de ce projet est d'environ 9 millions d'euros.

T4F est un projet qui vise à intégrer, développer et améliorer la génétique des arbres et les infrastructures de recherches forestières. Il s'appuie sur 3 grands points d'études :

- Environnement physique vis-à-vis de la génétique
- Propriétés basiques du bois vis-à-vis de la qualité du produit final
- Études individuelles à l'échelle de la forêt

L'objectif à long terme de ce projet est de regrouper et de fournir, non seulement pour les partenaires mais également pour la communauté européenne, des sources complémentaires et des expertises afin d'optimiser l'exploitation à court et long terme des ressources forestières à la fois par la communauté de la recherche mais également pour les acteurs socio-économiques. [24]



## II - Matériel et méthodes

### 1 - Présentation des échantillons

Les échantillons proviennent de 104 arbres : 100 mélèzes hybrides, 2 mélèzes d'Europe et 2 mélèzes du Japon. Ils sont issus de la plantation de Beaumont-du-Lac, située dans le parc naturel régional de Millevaches en Limousin, et ont été abattus en décembre 2012. Les arbres sont issus d'une éclaircie de cette plantation.

Plusieurs billons de bois à différentes hauteurs du tronc ont été débités pour fournir le matériel à tous les partenaires du projet impliqués notamment pour découper les éprouvettes de bois nécessaires pour évaluer la durabilité naturelle selon la nouvelle norme européenne.

Un disque de 8 cm d'épaisseur a été découpé dans chaque tronc à 1,30 m. Ces rondelles de bois vont fournir des planchettes (épaisseur : 2 mm) pour faire l'évaluation de la durabilité naturelle selon une nouvelle méthode innovante et 2 planchettes pour la mesure de la microdensitométrie du bois à l'aide des rayons X et pour l'analyse des extractibles. Ces planchettes diamétrales passant par le cœur de l'arbre (moelle) sont partagées en deux parties de chaque côté du cœur. Il s'agira des rayons qui constitueront nos échantillons d'analyse.

## 2 - Méthodes

### 2.1 - Broyage des échantillons

Les échantillons reçus sont sous la forme de planchettes de 2 mm d'épaisseur. Ces dernières sont découpées et broyées afin d'obtenir une poudre qui servira pour les extractions et la prise de spectres proche infrarouge.

Le broyage se fait à l'aide d'un broyeur à billes (*Retsch*). Les morceaux de mélèze de chaque échantillon sont mis dans des godets métalliques contenant une bille en inox. Ces derniers sont fixés sur le broyeur. Vingt cinq coups par seconde sont programmés pour l'ensemble des broyages. Le temps varie selon la masse de l'échantillon (entre 15 secondes et 1 min 40).



Figure 4 : Echantillon avant broyage

La poudre est tamisée à travers deux filtres : un de 800  $\mu\text{m}$  et l'autre de 75  $\mu\text{m}$ . Les particules ayant une granulométrie entre 800 $\mu\text{m}$  et 75 $\mu\text{m}$  sont mises dans un pot. La poudre inférieure à 75  $\mu\text{m}$  est placée dans un tube *ependorf*.

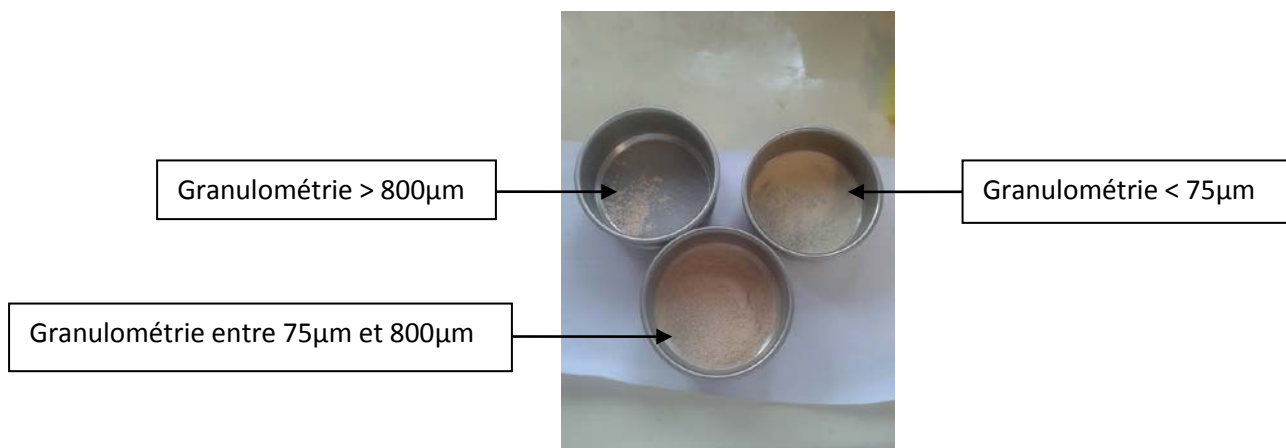


Figure 5 : Echantillon après broyage

## 2.2 - Extraction des extractibles du bois

Chaque échantillon, dont la granulométrie est comprise entre 800  $\mu\text{m}$  et 75  $\mu\text{m}$ , est utilisé pour l'extraction des extractibles globaux. Environ 0,8 g de poudre est pesé exactement puis mis dans un sachet thermosoudable d'extraction en fibre de verre poreux (25  $\mu\text{m}$ ). Ce dernier est ensuite placé une nuit à l'étuve. Après avoir réalisé une nouvelle pesée des sachets secs, ces derniers sont mis dans des erlenmeyers (8 sachets par erlenmeyer). Une première extraction est réalisée avec 600 mL d'acétone à 80% dans l'eau ultra-pure. Les sachets sont ensuite extraits avec 1 L d'eau osmosée. Une troisième extraction est faite avec 600 mL d'éthanol. Deux extractions à l'eau osmosée et deux extractions à l'éthanol sont encore réalisées en alternant les solvants organiques et aqueux. Chaque extraction dure environ 30 min et les solvants sont portés à ébullition. L'ensemble des solvants organiques est récupéré et régénéré à l'aide d'un évaporateur rotatif (*Büchi*) dans un souci d'économie de solvant.

A la fin des extractions, les sachets sont placés dans l'étuve à 105°C pendant une nuit puis sont pesés afin de connaître le taux des extractibles contenus dans la matière par différence gravimétrique entre la poudre de bois non extraite et celle extraite. [4]

Cette méthode a été mise au point en interne et est maintenant utilisée en routine.

Extraction selon la méthode "Soxtec" adaptée pour 8 échantillons dans un ballon de 2 L.

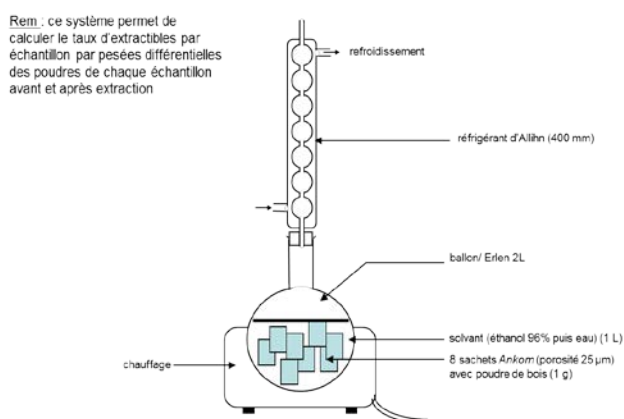


Figure 6 : Schéma du montage des extractions [4]



Figure 7 : Extraction des extractibles

Les extractibles sont, par définition, tous les composés solubles et qui peuvent être extraits du bois grâce à certains solvants. Les principaux extractibles du bois sont les composés phénoliques et les tannins. Néanmoins, d'autres molécules sont aussi extraites (stilbènes, pectines, lipides, sucres) mais en moindre quantité.

Les solvants organiques permettent d'extraire les acides phénoliques simples, les polyphénols et les sucres non structuraux. L'eau élimine les composés hydrosolubles comme les protéines et les tanins.

### 2.3 - Extraction des composés phénoliques du bois

La poudre, dont la granulométrie est inférieure à 75 µm, est mise à macérer dans une solution d'acétone à 80 % à laquelle est ajouté un témoin interne, la 6-méthoxyflavone à une concentration de  $10^{-4}$  M, qui servira de témoin interne lors de l'analyse HPLC.

Après avoir pesé exactement 50 mg environ, la poudre est mise dans un tube *ependorf* de 2 mL puis 1,80 mL du solvant d'extraction sont ajoutés. Les tubes sont ensuite soumis aux ultrasons dans une cuve à sonication pendant une heure afin de favoriser la libération des composés phénoliques dans le solvant en veillant au maintien de la température du bain à 4°C. A la fin de cette étape, les tubes *ependorf* sont agités pendant une heure. Après une centrifugation de 20 min, le surnageant contenant les polyphénols est récupéré dans un tube à hémolyse. Une seconde extraction est réalisée de la même manière sur le culot récupéré. Les deux surnageants d'un même échantillon sont rassemblés dans le même tube à hémolyse et le volume est vérifié (3,5 mL dans cette situation).

L'ensemble de l'extraction est réalisée à 4 °C afin de ne pas dégrader les composés phénoliques et permettre le maintien des structures natives des composés notamment pour les molécules glycolées.

500 µL de l'extrait brute est transféré dans un tube *ependorf* de 2 mL. Ce dernier est ensuite placé dans un évaporateur rotatif sous vide (Speed-Vac *Savant*) pendant 3h jusqu'à l'évaporation à sec des extraits. Le résidu sec est conservé à 4°C jusqu'aux dosages. [4]

## 2.4 - Dosage des phénols totaux par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu

### 2.4.1 - Principe du dosage Folin

Le réactif de Folin–Ciocalteu est composé d'acide phosphotungstique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) qui sont sous forme anionique dans la solution. En milieu basique, les composés phénoliques, sous forme ionique (phénolates), réagissent avec ce mélange et forment un complexe bleu visible à 735 nm. Il s'agit d'une réaction d'oxydoréduction où les phénolates sont les réducteurs. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en phénols totaux dans la solution dosée.

La méthode utilisée au laboratoire a été mise au point en interne [4] et est maintenant utilisée en routine.

### 2.4.2 - Les réactifs

Les réactifs utilisés lors du dosage sont : le réactif de Folin-Ciocalteu (SIGMA, 2N) dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  dans l'eau ultra pur (eau MilliQ) ; du carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 75 g/L ; une

solution mère de Taxifoline à une concentration de 2mg/mL, soit 20 mg de poudre dissous dans 10 mL de méthanol pur. Une solution fille à 0,2 mg/mL est préparée, au moment du dosage, à partir de cette solution en réalisant une dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans l'eau ultra pure.

#### 2.4.3 - Préparation de la gamme d'étalonnage

Une gamme d'étalonnage est faite afin de pouvoir déterminer la concentration en phénols contenus dans les extraits à doser. La Taxifoline est l'étalon choisi car il s'agit du polyphénol majoritairement présent dans les extraits de mélèze et disponible dans le commerce contrairement au dihydrokaempférol. La gamme, variant d'une concentration de 0 à 20 µg/mL, est préparée dans des tubes *ependorf* de 1,5 mL selon le tableau suivant :

Quantité finale (µg)	Vol. Taxifoline à 0,2 mg/mL (µL)	Vol. eau ultra pure (µL)
0	0	100
1	5	95
2	10	90
4	20	80
8	40	60
12	60	40
15	75	25
20	100	0

#### 2.4.4 - Réalisation du dosage

Les extraits secs repris avec 250 µL de méthanol pur sont dilués au 1/5<sup>ème</sup> avec de l'eau ultra-pure, pour un volume final de 100 µL. Dans chaque tube *ependorf*, points de gamme étalon et extraits, sont ajoutés 400 µL de réactif de Folin dilué au 1/10<sup>ème</sup> et, après agitation au vortex, 500µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 75 g/L. Après une seconde agitation au vortex, les tubes sont mis à l'étuve à 50°C pendant 5 min pour l'incubation. Le volume final du milieu réactionnel est de 1 mL.



Figure 8 : Dépôt des échantillons

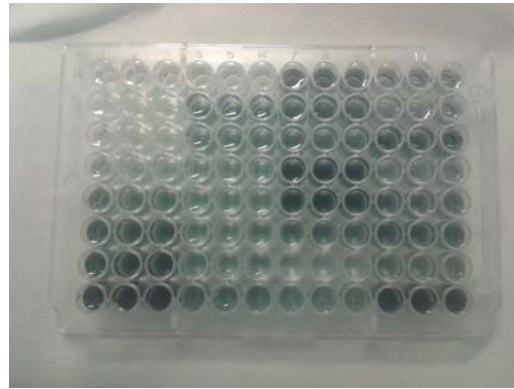


Figure 9 : Plaque 96 puits après dépôt

Chaque point de gamme et chaque extrait est déposé en triplicat à l'aide d'une pipette multicanaux à écartement variable avec un volume de 250  $\mu$ L.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	BI	BI	BI	E8	E8	E8	E16	E16	E16
B	1	1	1	E1	E1	E1	E9	E9	E9	E17	E17	E17
C	2	2	2	E2	E2	E2	E10	E10	E10	E18	E18	E18
D	4	4	4	E3	E3	E3	E11	E11	E11	E19	E19	E19
E	8	8	8	E4	E4	E4	E12	E12	E12	E20	E20	E20
F	12	12	12	E5	E5	E5	E13	E13	E13	E21	E21	E21
G	15	15	15	E6	E6	E6	E14	E14	E14	E22	E22	E22
H	20	20	20	E7	E7	E7	E15	E15	E15	E23	E23	E23

Figure 10 : Plan de plaque 96 puits pour le dosage Folin

### 2.4.5 - Principe du spectromètre UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible est une technique d'analyse basée sur l'étude de l'interaction du rayonnement électromagnétique avec la matière. En effet, au contact de l'énergie, la molécule va subir une ou plusieurs transitions électroniques qui ont pour conséquence de faire passer la molécule de l'état fondamental à l'état excité.

Le domaine de l'UV s'étend de 180 nm à 400 nm et le visible de 400 à 800 nm.

Le spectromètre ne détecte que les molécules possédant des groupements chromophores donc des insaturations (ex : liaisons multiples, cycles, fonctions aldéhydes, etc.)

L'appareil utilisé est un spectromètre simultané à double faisceaux. Un faisceau traverse l'échantillon et un autre le blanc, souvent constitué du solvant de l'échantillon. L'intensité issue du blanc permet une correction des fluctuations de l'intensité venant de la lampe ainsi qu'une correction de l'absorbance due au solvant de l'échantillon. [12]

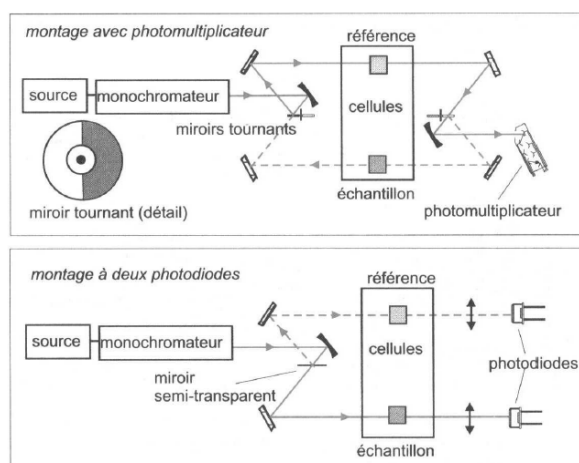


Figure 11 : Schéma d'un spectromètre [17]

L'appareil utilisé dans cette manipulation a comme source une lampe à Xénon flash et le détecteur est constitué de photodiodes.

### 2.4.6 - Analyse des plaques 96 puits

L'appareil utilisé est le spectromètre lecteur de plaques *Multiskan Spectrum* de chez *Thermo Scientific*. Les résultats sont traités sur le logiciel *Multiskan Spectrum*. Un blanc est également

fait pour faire le zéro du spectrophotomètre. La plaque est ensuite lue à la longueur d'onde de 735 nm qui correspond au maximum d'absorbance du milieu réactionnel.

#### 2.4.7 - Exploitation des résultats

Grâce à la gamme d'étalon faite,  $A_{735\text{nm}} = f(\text{concentration en taxifoline})$ , l'appareil peut calculer la concentration de l'échantillon à partir de l'absorbance. La concentration de l'extrait est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent de Taxifoline ( $\mu\text{g eq. TAX. mL}^{-1}$ ).

Le calcul suivant permet de convertir la concentration massique d'équivalent en molécule d'étalon en quantité d'équivalente molécule étalon (mg) par gramme de matière sèche :

$$Q = C_{\text{TAX}} \times \frac{V_{\text{reprise}}}{V_{\text{dosage}}} \times \frac{V_{\text{extrait brut}}}{V_{\text{évaporé}}} \times \frac{1}{M_{\text{matière sèche}}}$$

Q : Quantité en milligramme d'équivalent de molécule étalon par gramme de matière sèche

$C_{\text{TAX}}$  : Concentration massique de taxifoline en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

$V_{\text{reprise}}$  : Volume de méthanol lors de la reprise du résidu sec ( $V_{\text{reprise}} = 250 \mu\text{L}$ )

$V_{\text{dosage}}$  : Volume d'échantillon pris pour le dosage ( $V_{\text{dosage}} = 10 \mu\text{L}$ )

$V_{\text{extrait brut}}$  : Volume de solvant utilisé lors de l'extraction ( $V_{\text{extrait brut}} = 3500 \mu\text{L}$ )

$V_{\text{évaporé}}$  : Volume de solvant évaporé au speed Vac ( $V_{\text{évaporé}} = 500 \mu\text{L}$ )

$M_{\text{matière sèche}}$  : masse de matière poudre sèche utilisée pour l'extraction (environ 50mg)

### 2.5 - Dosage de la Taxifoline et le Dihydrokaempférol par HPL C

#### 2.5.1 - Principe de HPLC

La Chromatographie en Phase Liquide (appareil VWR HITACHI Chromaster 5160 pump), notée HPLC, est une méthode analytique basée sur la séparation de molécules en solution afin de les séparer, identifier et/ou de les quantifier. La séparation est basée sur l'affinité entre les composés et les phases : la phase stationnaire et la phase mobile.

La phase stationnaire peut être de plusieurs natures. Celle utilisée lors de cette manipulation est apolaire c'est-à-dire que des groupements  $\text{C}_{18}$  sont greffés sur la silice (Lichrospher 18e 250 mm



x 4mm x 5  $\mu$ m, Merck). Dans cette situation, les analytes les plus apolaires ont plus d'affinité avec la phase stationnaire et sont donc plus retenus que les analytes polaires.

La colonne est placée dans un four (programmé à 40°C) afin de travailler à une température constante et maintenue tout au long des analyses. Ce paramètre n'aura donc pas d'influence sur les résultats.

La phase mobile est constituée, ici, de deux solvants :

- solvant A -> Acide acétique 1% dans l'eau ultra-pure

- solvant B -> Acétonitrile/Méthanol (50/50, v/v)

Le mélange acétonitrile/méthanol est le bon solvant. Il va décrocher les composés les plus apolaires. Son pourcentage est donc augmenté au cours du temps. L'acide acétique à 1%, qui joue le rôle de mauvais solvant, va favoriser la rétention des analytes. Le débit de la phase mobile est fixé à 1,0 mL/min et le volume d'injection est de 20 $\mu$ L. [16]

Un gradient d'élution est déterminé pour les analyses des extraits. Les proportions de chaque solvant varient au cours du temps.

### 2.5.2 - Le Détecteur à Barrette de Diodes (DAD)

Le détecteur utilisé pour cette manipulation est le détecteur à barrette de diodes (DAD). Il s'agit d'une technique spectroscopique où les photons sont excités grâce à un rayonnement lumineux.

Ce détecteur permet :

- de faire l'identification de pics chromatographiques et d'obtenir son spectre d'absorbance
- de déterminer la pureté d'un pic chromatographique
- de déterminer la longueur d'onde maximale de chaque analyte dans les conditions d'analyse en HPLC

Le DAD est composé de photodiodes alignées. Ces dernières reçoivent une radiation qui va créer une énergie. Les condensateurs vont se décharger puis se recharger. C'est la recharge qui est mesurée. [7]

Ce détecteur permet de réaliser les analyses à plusieurs longueurs d'ondes afin d'obtenir le spectre. De plus, certaines longueurs d'ondes sont fixées afin d'obtenir les chromatogrammes de travail. Ici, deux chromatogrammes sont obtenus : un à 280 nm et l'autre à 315 nm.

La relation de Beer-Lambert permet de démontrer que l'absorbance est proportionnelle à la concentration du composé :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A : Absorbance (sans unité)

$\epsilon$  : coefficient d'absorption molaire pour une longueur d'onde donnée (en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

l : longueur du trajet optique (en cm)

C : concentration de l'espèce absorbante ( $mol \cdot L^{-1}$ ) [17]

Le détecteur est placé à la sortie de la colonne. La détection a donc lieu en continu pendant l'analyse.

### 2.5.3 - Préparation des échantillons

#### 2.5.3.1 - La gamme d'étalonnage

Plusieurs solutions de taxifoline dans le méthanol pur sont préparées à différentes concentrations. Elles serviront pour l'étalonnage externe fait lors de l'analyse. Chaque solution est mise dans un vial de 2 mL. L'ensemble des échantillons sont stockés à 4°C jusqu'à l'analyse.

#### 2.5.3.2 - Préparation des analytes

Chaque tube *ependorf* est passé au vortex puis à la centrifugeuse pendant 5 min à la vitesse maximale. 100  $\mu$ L de solution sont ensuite prélevés et mis dans un insert, placé dans un vial de 2mL. L'ensemble des vials sont stockés à 4°C jusqu'à l'analyse.

### 2.5.4 - Analyse des échantillons

Les échantillons sont analysés avec le programme *analyse echantillon\_2*. Le gradient utilisé est décrit ci-après :

Temps d'analyse (min)	0	9	11	16	17	22
Proportion du solvant B dans solvant A	30%	40%	100%	100%	30%	30%

### 2.5.6 – Expression des résultats

L'étalonnage externe permet de calculer la concentration en TAX et DHK. L'équation de la gamme de calibration obtenue permet de déterminer la concentration de la TAX et du DHK contenus dans chaque échantillon. Elle est exprimée dans la partie Résultats et Discussion.

La droite d'équation est :

$$y = ax$$

où y correspond à la surface des pics et x à la concentration de taxifoline pour un volume d'injection de 20 µL. La surface de pic est connue car elle est lue sur le chromatogramme. Le calcul ci-dessous permet donc de connaître les concentrations en TAX et en DHK dans chaque échantillon et pour les deux longueurs d'ondes d'intérêts :

$$x = y / a$$

En connaissant cette valeur, il est possible de calculer la concentration des deux composés phénoliques par gramme de matière sèche, grâce au calcul décrit ci-après :

$$Q = C_x \times \frac{V_{reprise}}{V_{injection}} \times \frac{V_{extrait\ brut}}{V_{\text{évaporé}}} \times \frac{1}{M_{\text{matière sèche}}}$$

Q : Quantité en milligramme d'équivalent de molécule étalon par gramme de matière sèche

$C_x$  : Concentration massique de TAX ou DHK en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

$V_{reprise}$  : Volume de méthanol lors de la reprise du résidu sec ( $V_{reprise} = 250 \mu\text{L}$ )

$V_{injection}$  : Volume d'injection ( $V_{dosage} = 20 \mu\text{L}$ )

$V_{extrait\ brut}$  : Volume de solvant utilisé lors de l'extraction ( $V_{extrait\ brut} = 3500 \mu\text{L}$ )

$V_{\text{évaporé}}$  : Volume de solvant évaporé au speed Vac ( $V_{\text{évaporé}} = 500 \mu\text{L}$ )

$M_{\text{matière sèche}}$  : masse de matière poudre sèche utilisée pour l'extraction (environ 50mg)

## 2.6 - Analyse des poudres en Spectrométrie Proche InfraRouge

### 2.6.1 - Principe de la spectrométrie proche infrarouge

La spectrométrie proche infrarouge (SPIR) est un procédé analytique qui permet d'accéder à la composition des échantillons en quantifiant les liaisons moléculaires caractéristiques des grands groupes de constituants. En effet, cette méthode est basée sur l'étude de l'interaction de la lumière avec la matière. Sous l'incidence d'un rayonnement infrarouge, une partie de l'énergie de cette dernière est absorbée par les liaisons chimiques des molécules. Elles se mettent en vibration.

L'infrarouge est découpé en trois parties :

Le proche infrarouge : 700 à 2500 nm

Le moyen infrarouge : 2500 à 25000 nm

L'infrarouge lointain : 2500 à 50000 nm

L'appareil est composé de 4 parties essentielles :

- Une source lumineuse
- Un système de séparation de lumière polychromatique en fonction des longueurs d'ondes
- Un système permettant de présenter l'échantillon
- Un ou plusieurs capteurs photosensibles

Le spectromètre utilisé est basé sur le principe de la transformé de Fourier ce qui permet de retranscrire les signaux reçus en spectres. [2] [9] [3]

Il s'agit d'une technique optique non invasive car il n'y a pas de contact entre l'appareil et le produit. La SPIR présente de nombreux avantages dont celui d'avoir peu de préparation d'échantillon. Néanmoins, certains paramètres de l'échantillon peuvent avoir des influences notables sur les résultats (granulométrie, orientation des particules, humidité, etc.) [13]

### 2.6.2 – Prise des spectres

Les échantillons sont placés, 24 heures avant l'analyse dans une armoire de dessiccation, afin d'avoir un taux d'humidité inférieur à 20%.

Le spectromètre utilisé est le *Spectrum 400* de chez *Perkin Elmer* qui permet à la fois de travailler en Proche Infra Rouge (PIR) et en Moyen Infra Rouge (MIR). L'échantillon est mis dans une cellule en verre puis déposé sur la cible d'analyse (sphère d'intégration). Il faut faire attention que la base de la cellule soit propre et sans trace car le rayon lumineux traverse à cette endroit. Les résultats pourraient donc être faussés.



**Figure 12 : Analyse d'un échantillon au SPIR**

Après l'analyse, l'échantillon est remis dans son pot.

Un blanc est fait, avec une référence (Spectralon), à chaque début de demi-journée. Un alignement du faisceau lumineux est réalisé toute les deux heures.

### III – Résultats et Discussions

#### 1 – Les extractibles totaux dans le bois de mélèze

Le graphe ci-dessous présente le taux d'extractibles dans chacun des 104 arbres. Les échantillons ont été triés par ordre croissant.

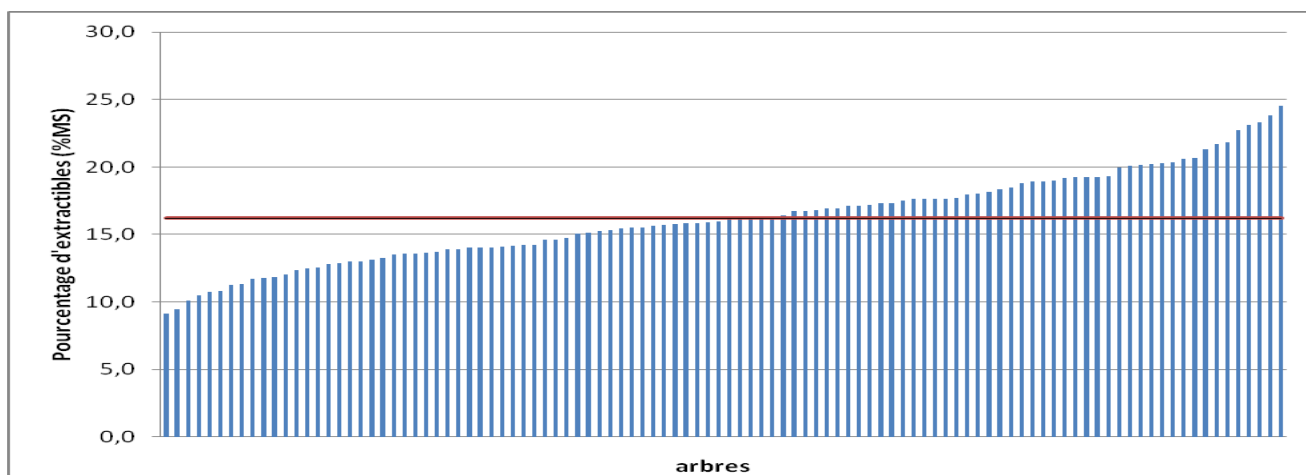


Figure 13 : Répartition du pourcentage en extractibles par rapport à la matière sèche dans les 104 arbres de mélèze analysés. Les résultats ont été classés par ordre croissant. La ligne horizontale représente la moyenne des valeurs. Chaque barre correspond à la moyenne des valeurs des deux rayons opposés par rapport à la moelle du tronc

Le graphique permet de remarquer que la proportion d'extractibles dans le bois varie selon les échantillons. En effet, la valeur minimale est 9,2 % tandis que la maximale est 24,5 %. La moyenne du taux d'extractibles sur les 104 arbres, en rouge sur le graphe, est de 16,2%. De plus, les valeurs obtenues pour les deux rayons opposés d'un même arbre sont du même ordre de grandeurs sauf pour 2 ou 3 arbres, ce qui correspond certainement à la présence de bois de compression dans un des rayons. Il s'agit de bois de structure spéciale qui se forme quand l'arbre est soumis à des contraintes mécaniques (arbre penché).

Le coefficient de variation est de 20,6% ce qui démontre que la quantité d'extractibles dans le bois de mélèze est un paramètre chimique du bois assez variable.

## 2 - Les composés phénoliques totaux dans le bois de mélèze

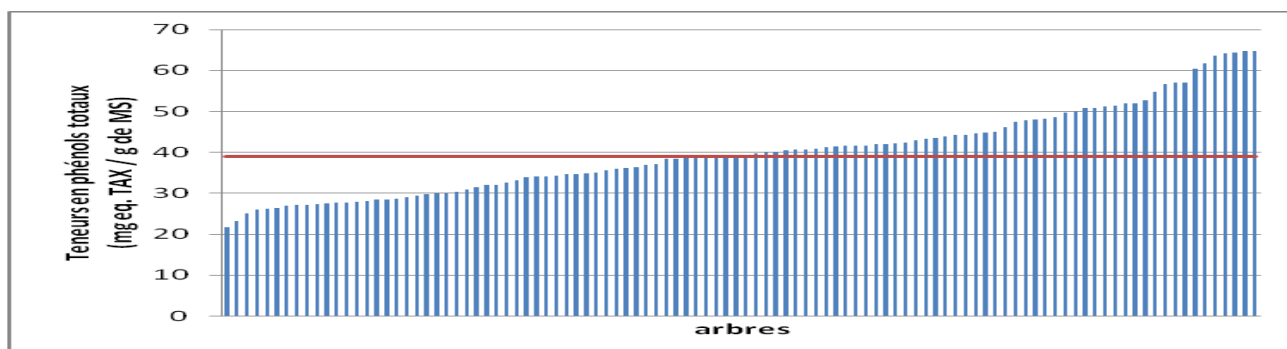


Figure 14 : Teneurs en polyphénols par rapport à la matière sèche dans les 104 arbres de mélèze étudiés. Les résultats ont été classés par ordre croissant. La ligne horizontale représente la moyenne des valeurs. Chaque barre correspond à la moyenne des valeurs des deux rayons opposés par rapport à la moelle du tronc

Les teneurs en polyphénols dans le bois de chaque arbre sont représentées sur la figure 14. La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligramme d'équivalent de Taxifoline par gramme de matière sèche (mg eq.TAX / g de MS) car la gamme d'étalonnage a été faite avec la Taxifoline. Ce composé est présent en grande quantité dans le bois mélèze.

La teneur de composés phénoliques varie notablement d'un arbre à l'autre comme il est possible de le constater sur le graphe. En effet, elle s'étend de 21,6 à 64,8 mg eq.TAX/g de MS avec une moyenne, en rouge sur le graphe, de 39,0 mg eq. TAX/g de MS. A l'exception de certaines valeurs, les résultats sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour une autre série dont une partie correspondait aux mêmes arbres mais à un âge plus jeune décrite par Pâques et *al.* en 2013 [19] qui était comprise entre 6 et 55,9 mg eq. TAX/g de MS.

Une différence de teneur en phénols est observable entre les rayons d'un même arbre. Cette variation est plus ou moins prononcée selon les mélèzes. Néanmoins, les coefficients de variation restent acceptables c'est-à-dire inférieurs à 30% (valeur choisie arbitrairement).

Le coefficient de variation sur l'ensemble de la population est de 25,9% ce qui est correct du fait que les travaux sont réalisés sur des éléments provenant de la nature. Ce paramètre chimique est sous dépendance génétique avec une forte héritabilité mais est fortement lié à la croissance de l'arbre. [18]

### 3 - Répartition des teneurs en Taxifoline et en DHK dans le bois de mélèze

La Taxifoline et le DHK sont les deux composés phénoliques majeurs présents dans le bois de mélèze.

#### 3.1 - Gamme d'étalonnage en Taxifoline pour l'analyse en chromatographie liquide

Une gamme d'étalonnage de Taxifoline a été faite avec une détection à 280 nm et à 315 nm.

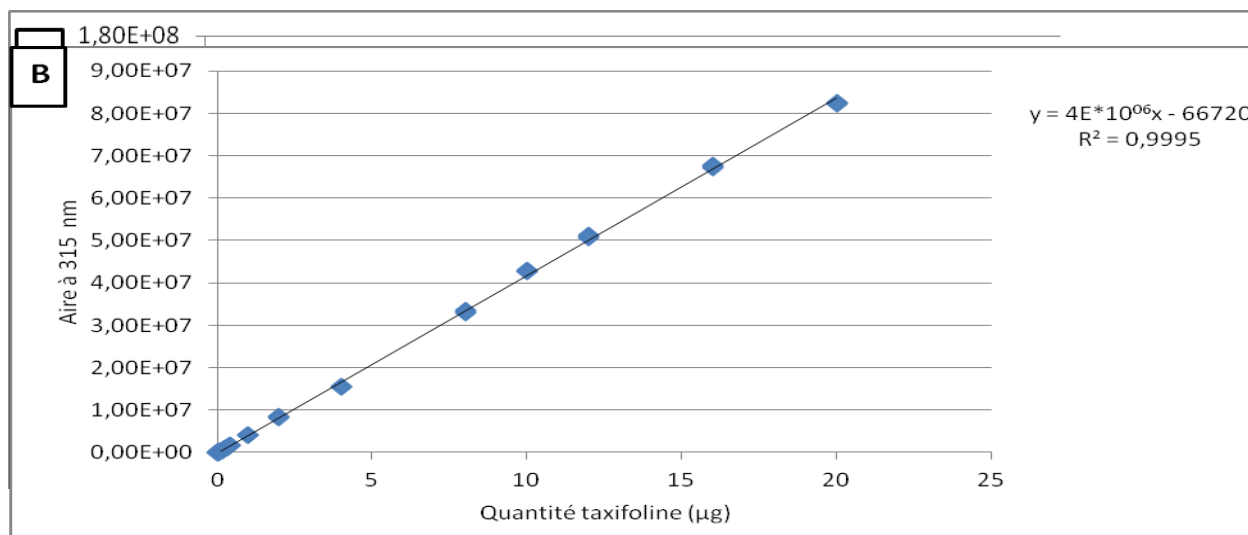


Figure 15 : Gammes d'étalonnages externes de taxifoline réalisées en chromatographie liquide à 280 (A) et 315 nm (B)

Les résultats obtenus à 315 nm ( $R^2 = 0,9995$ ) sont meilleurs que ceux à 280 nm ( $R^2 = 0,9766$ ). En effet, à 280 nm, les échantillons dont la concentration est élevée semblent saturer le détecteur. A 315 nm, la courbe est plus linéaire que celle à 280 nm. C'est pour ces raisons que les résultats futurs seront pris à 315 nm et non pas à 280 nm pour ne pas avoir des données surestimées. L'équation de la droite d'étalonnage obtenue est utilisée dans les calculs.

#### 3.2 - Chromatogramme d'un extrait de bois de mélèze

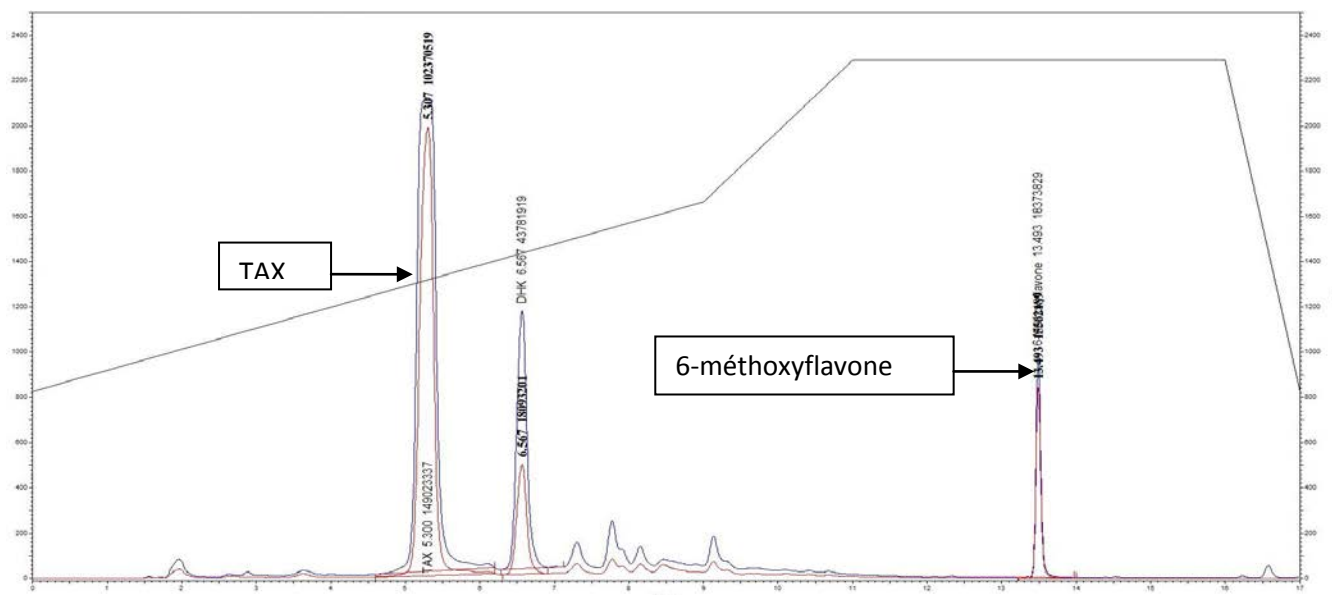




Figure 16 : Chromatogramme d'un extrait de bois de mélèze à 280 nm et 315 nm

L'illustration ci-dessus permet d'observer les chromatogrammes obtenus à 280 nm (en bleu) et à 315 nm (en rouge). Le gradient d'élution est représenté en noir.

Les deux chromatogrammes ainsi que les temps de rétention permettent de définir l'ordre de sortie des composés. En effet, la Taxifoline sort en premier avec un temps de rétention de 5,3 min, suivi du Dihydrokaempférol (DHK) ( $t_r = 6,5$  min). Enfin, la 6-méthoxyflavone, qui est l'étalon interne, sort en dernier ( $t_r = 13,5$  min). La présence de ce dernier ne sert pas pour la quantification mais seulement pour vérifier l'homogénéité des extractions et des injections en HPLC entre tous les extraits chromatographiés en évaluant la stabilité de surface des pics obtenus dans toutes les injections.

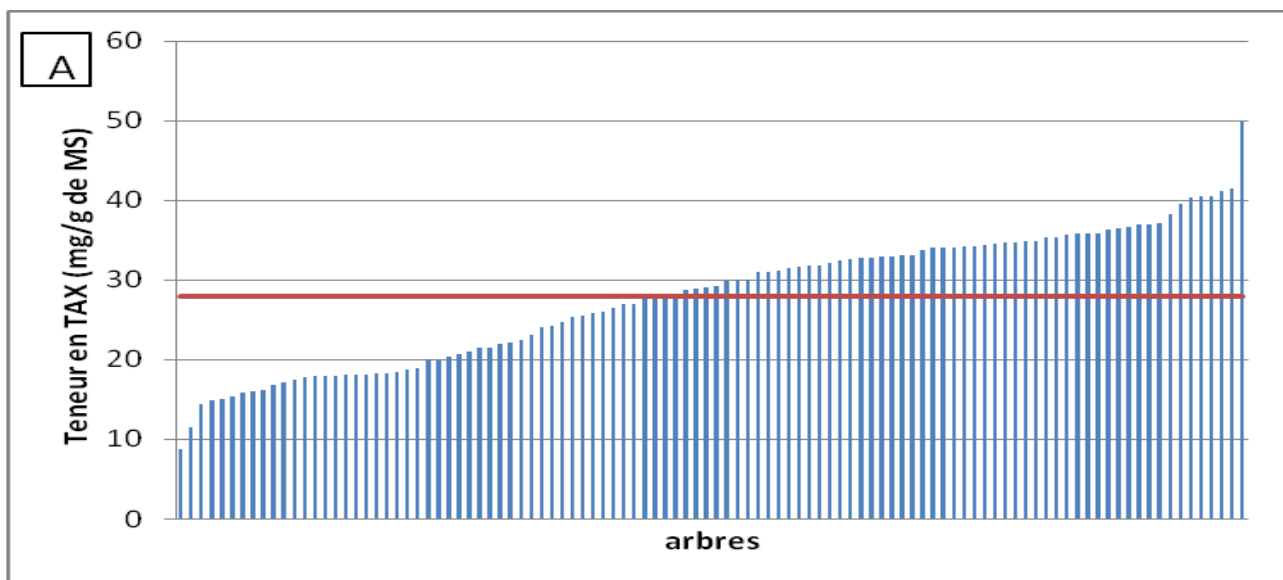
Ces chromatogrammes permettent de faire une première observation. En effet, autant à 280 nm qu'à 315 nm, le pic de TAX est plus grand que celui de DHK. Il est donc possible de conclure que la Taxifoline est le composé phénolique majoritaire dans les extraits de bois de mélèze.

Les valeurs obtenues pour l'étalon interne permettent de démontrer que les injections et les extractions sont homogènes. En effet, le coefficient de variation est de 13,4 %.

De plus, les pics, situés entre 7 et 9,5 min, démontrent que d'autres composés phénoliques sont présents dans le mélèze. Néanmoins, ces derniers sont présents en très faible quantité.

### 3.3 – Variations des teneurs en Taxifoline et en Dihydrokaempférol dans le bois de mélèze

Les extraits de bois de mélèze sont constitués de composés phénoliques dont les deux principaux sont la Taxifoline (TAX) et le Dihydrokaempférol (DHK). La teneur de ces deux composés dans chaque échantillon est déterminée grâce à l'analyse par HPLC-DAD.



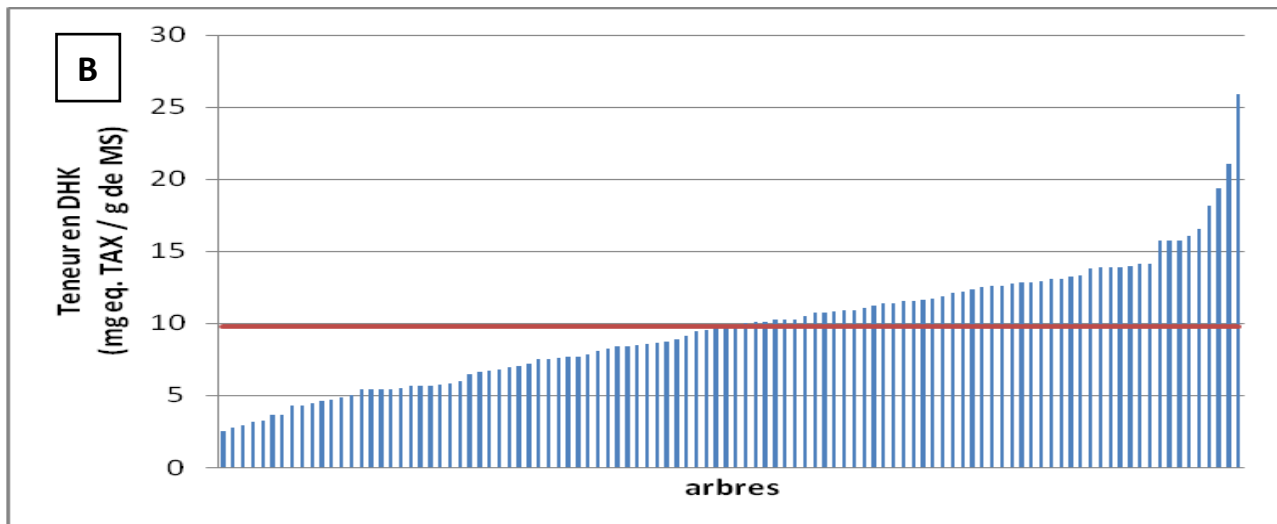


Figure 17 : Teneur en TAX (A) et en DHK (B) par rapport à la matière sèche dans les 104 arbres de mélèze analysés. Les résultats ont été classés par ordre croissant. La ligne horizontale représente la moyenne des valeurs. Chaque barre correspond à la moyenne des valeurs des deux rayons opposés par rapport à la moelle du bois

Au sein des 104 arbres, la TAX est présente dans les arbres à partir de 8,8 et jusqu'à 49,8 mg / g de MS, ce qui présente une variation très importante. La moyenne sur l'ensemble des échantillons, en rouge sur le graphe, est de 27,9 mg / g de MS. Cette variation est du même ordre de grandeur que celle observée pour une population plus grande et avec des arbres plus jeunes. Ces valeurs appartiennent, sauf pour quelques exceptions, au domaine (1,3 à 41,7 mg / g de MS) annoncé par Pâques et *al.* en 2013 [19]. Les arbres étudiés ici sont plus âgés de 9 ans. Certains sont plus riches car les arbres de mélèze ont tendance, en vieillissant, à accumuler les composés phénoliques de ce type dans leur bois

La teneur de ce composé phénolique est très variable selon les arbres. Le coefficient de variation au sein de cette population est de 29,5%.

La variation de la teneur en DHK dans les échantillons s'étend de 2,5 à 25,9 mg eq.TAX/g de MS avec une moyenne, en rouge sur le graphe, de 9,8 mg eq. TAX / g de MS. Comme précédemment, ces résultats, à l'exception de quelques uns, correspondent à la gamme (0,5 à 13,7 mg eq. TAX / g de MS) évoqué par Pâques et *al.* en 2013 [19]. Une fois encore, une différence notable de la quantité de ce polyphénol est observable entre les arbres avec un coefficient de variation de 43,1%.

Globalement, le DHK est présente en moins grande quantité que la TAX ce qui permet d'affirmer que la Taxifoline est le composé majoritaire du mélèze. La grande variation de concentration de la TAX et du DHK entre les arbres est sûrement due à la variation de phénols totaux accumulés dans le bois de ces derniers.

Dans les deux cas, certains arbres présentent des écarts importants de teneur composés phénoliques entre ses deux rayons opposés (voir tableau général des résultats en annexe 3). En effet, les coefficients de variation de ces derniers sont très élevés pour certains échantillons. Une seconde analyse puis une seconde extraction ont été faites pour savoir si cette grande différence vient de l'analyse, de l'extraction ou de l'arbre. A la suite de ces tests, les résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment. Il est donc possible de supposer que ce contraste entre les rayons opposés d'un même arbre vienne de ce dernier lui-même. En effet, si un arbre ne pousse pas droit, il fait du bois de compression pour compenser. Dans ce cas, le bois ne présente pas la même structure et la même composition chimique en tout point.

D'après Pâques et *al.* en 2013, le mélèze du Japon a une forte teneur en phénols totaux et en Taxifoline mais faible en DHK. Le mélèze d'Europe, à l'inverse de celui du Japon, a beaucoup de DHK mais peu de Taxifoline [19]. Sur la population étudiée ici, cette remarque n'est pas vérifiée. En effet, les valeurs minimales obtenues pour le pourcentage de Taxifoline et de DHK (respectivement 8,4 mg / g de MS et 2,2 mg eq. TAX / g de MS) proviennent de deux mélèzes hybrides. Il en est de même pour le pourcentage maximal de DHK (27,4 mg eq. TAX / g de MS). Seul le pourcentage maximal de Taxifoline (56,7 mg / g de MS) provient d'un mélèze du Japon. Cette différence d'observation peut s'expliquer par le fait que seulement 2 arbres de chaque parent sont étudiés et que ces derniers ne sont peut être pas représentatifs.

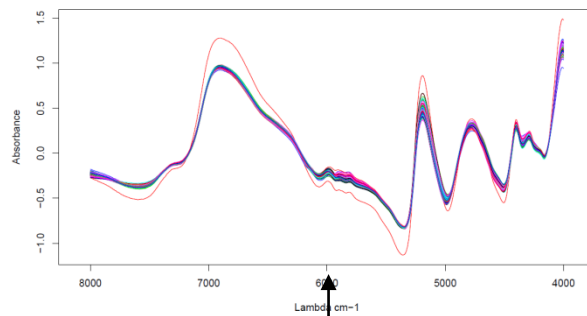
#### **4 – Analyse des spectres Proche InfraRouge avec le logiciel R, établissement de modèles de calibration pour les données chimiques du bois**

R est un logiciel de traitement statistique. Ce dernier va permettre de faire des corrélations entre les résultats chimiques et les spectres infrarouges. De ce fait, des modèles de calibrations pourront être réalisés et comparés afin de trouver le meilleur. [22]

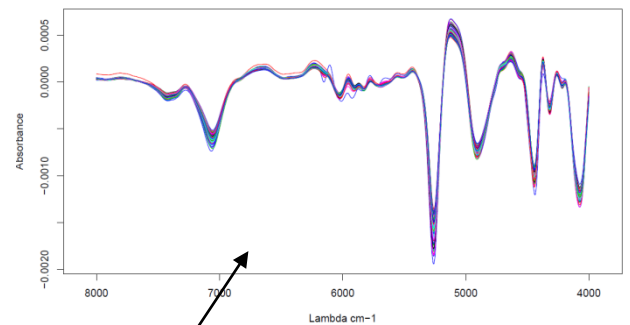
##### **4.1 – Prétraitements statistiques des spectres**

Des analyses statistiques et mathématiques permettent de traiter les spectres obtenus au SPIR. Elles sont réalisées avec le programme « *code\_R\_preparation\_exploitation\_donnees* » sur le logiciel R. Les résultats obtenus après ce premier traitement sont présentés dans la figure 18.

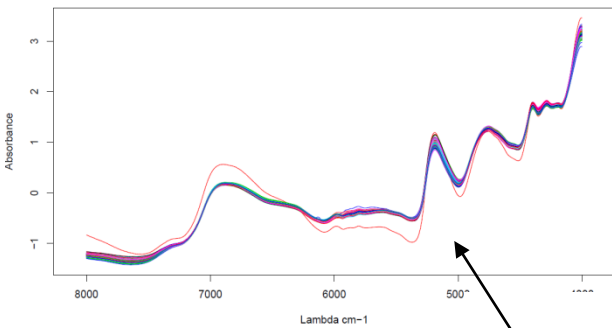
Detrend



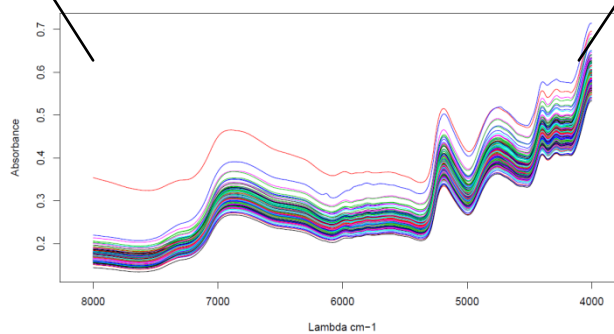
Données après dérivée première

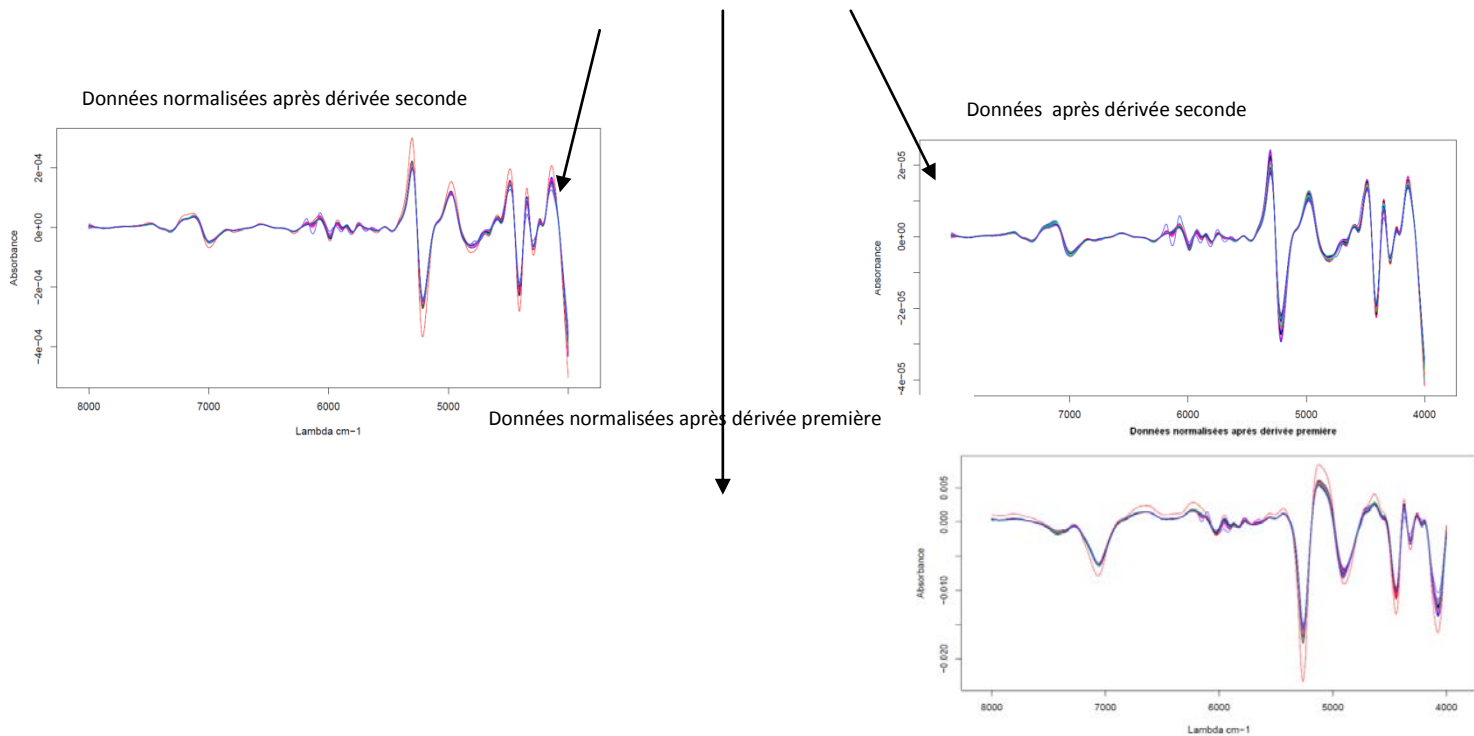


Données normalisées



Données brutes de 8000 à 4000 cm-1





**Figure 12** : Spectres PIR enregistrés pour les 208 échantillons testés chimiquement, avant (données brutes) et après traitements statistiques (normalisation, dérivées avant et après normalisation, *detrend*)

Pour une grande majorité des échantillons, les spectres obtenus sont semblables voir identiques. Seuls deux spectres (rouge et bleu) sont différents. En effet, ces derniers ont une absorbance plus forte ou plus faible (selon la longueur d'onde) par rapport aux autres. Ce phénomène est observable dès l'acquisition des spectres (données brutes de 8000 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) et l'est toujours après chaque traitement statistique. Les analyses ayant été faites sur 3 jours consécutifs et dans des conditions de température et d'hydrométrie similaires, l'effet « jour » ne peut pas expliquer cette différence de résultat. Les hypothèses faites pour expliquer cet écart sont :

- Une différence de tassage de la poudre dans le vial lors de la mesure
- Une granulométrie très différente par rapport aux autres échantillons
- Une différence notable de la composition de la poudre

#### 4.2 – Modèle de calibration

Des modèles de calibration sont réalisés sur les données chimiques, acquises précédemment, avec le programme « *code\_R\_calibrations\_SPIR\_Meleze\_planchettes* » sur le logiciel R [22].

Plusieurs modèles ont été faits en fonction des traitements appliqués. En effet, un premier modèle a été fait sans traitement, puis un second en identifiant les « outliers » c'est-à-dire les valeurs qui semblent aberrantes. Ces dernières peuvent correspondre soit à une erreur de la référence ou lors de l'acquisition des spectres soit un problème d'identification d'échantillon. Ces valeurs sont donc identifiées puis enlevées pour faire le modèle de calibration. Un troisième modèle a été réalisé en identifiant et sélectionnant les bandes ou zone d'absorption du spectre. Dans cette situation, le programme sélectionne des longueurs d'onde qui sont nécessaires à la création du modèle. Enfin, le quatrième traitement correspond à la sélection des bandes et en éliminant les « outliers ».

Le tableau ci-dessous regroupe les meilleurs modèles de calibrations pour chaque traitement et chaque paramètre chimique.

**Tableau I : Meilleurs modèles de calibration pour chaque paramètre chimique et chaque traitement appliqué**

Nom	Traitement	Meilleur	R <sup>2</sup>	RPD	RMSE	Nb Outliers
Extractibles	aucun	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,84	2,54	1,48	0
	identification outliers	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,89	3,01	1,2	9
	Identification bandes	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,85	2,62	1,43	0
	Identification bandes + identification outliers	Dérivée 2 <sup>nde</sup>	0,92	3,61	1,01	13

Taux d'extraction	aucun	Dérivée 1 <sup>ère</sup> normalisée	0,025	1,02	3,45	0
	identification outliers	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,3	1,2	2,16	14
	Identification bandes	Dérivée 2 <sup>nde</sup> normalisée	0,08	0,02	3,34	0
	Identification bandes + identification outliers	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,38	1,27	2,04	14

Phénols totaux	aucun	Dérivée 1 <sup>ère</sup> normalisée	0,48	1,39	8,09	0
	identification outliers	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,71	1,86	5,04	27
	Identification bandes	Dérivée 2 <sup>nde</sup> normalisée	0,53	1,47	7,67	0
	Identification bandes + identification outliers	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,73	1,93	4,87	27

TAX+DHK	aucun	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,53	1,46	7,1	0
---------	-------	--------------------------	------	------	-----	---

	identification outliers	Dérivée 2 <sup>nde</sup> normalisée	0,73	1,78	5,6	10
	Identification bandes	Dérivée 2 <sup>nde</sup> normalisée	0,59	1,57	6,63	0
	Identification bandes + identification outliers	Dérivée 2 <sup>nde</sup> normalisée	0,72	1,88	5,31	10

TAX	aucun	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,58	1,56	5,76	0
	identification outliers	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,71	1,87	4,47	7
	Identification bandes	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,67	1,74	5,17	0
	Identification bandes + identification outliers	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,75	2,01	4,47	7

DHK	aucun	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,44	1,34	3,32	0
	identification outliers	Dérivée 1 <sup>ère</sup>	0,55	1,5	2,59	10
	Identification bandes	Dérivée 2 <sup>nde</sup>	0,61	1,6	2,78	0
	Identification bandes + identification outliers	Dérivée 2 <sup>nde</sup>	0,68	1,78	2,37	6

Pour chaque modèle de calibration, le nombre « d'outliers », le coefficient de validation croisé ( $R^2$ ), l'erreur quadratique moyenne (RMSE) et le ratio entre l'écart type et le RMSE (RPD) sont notés.

Le tableau ci-dessus permet de comparer les modèles de calibration entre eux. Pour l'ensemble des traitements, le modèle obtenu pour les extractibles est le meilleur avec un  $R^2$  de 0,88 en moyenne et un taux d'erreur (RMSE) d'en moyenne 1,3 %. Le second meilleur modèle est celui de la Taxifoline ( $R^2 = 0,68$  et RMSE = 4,9 mg / g de MS) puis celui de la somme de la Taxifoline et du DHK ( $R^2 = 0,64$  et RMSE = 6,2 mg eq. TAX / g de MS). Le quatrième modèle est celui des phénols ( $R^2 = 0,61$  et RMSE = 6,4 mg eq. TAX / g de MS) suivi par le modèle du DHK ( $R^2 = 0,57$  et RMSE = 2,8 mg eq. TAX / g de MS). Enfin, le modèle du taux d'extraits ( $R^2 = 0,20$  et RMSE = 2,8 %) est le moins bon modèle.

De plus, il est possible de remarquer que plus il y a de traitements appliqués aux données chimiques, meilleur est le modèle. En effet, les traitements permettent d'éliminer les valeurs suspectes et donc d'obtenir de meilleurs résultats. Ceci est observable avec la figure 19. Sur le

modèle de gauche, qui a subi aucun traitement, certains points sont éloignés de la droite de calibration tandis que sur le modèle de droite (identification de bandes et élimination d'« outliers »), les points sont globalement plus proches de la droite de calibration. De plus, les valeurs sont tout le long de la droite et ne sont pas localisées que sur une zone.

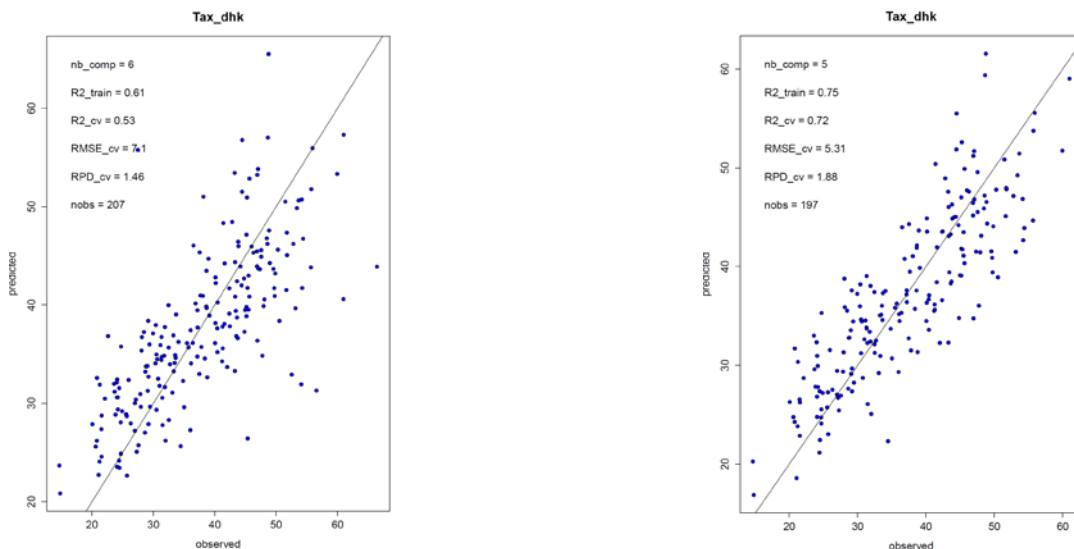


Figure 19 : Modèles de calibration de la Taxifoline et du DHK (à gauche : modèle sans aucun traitement; à droite : modèle avec identification de bandes et identification d'outliers)

## Conclusion scientifique

Le bois de mélèze contient de nombreuses familles de molécules extractibles. Sur la population étudiée, le pourcentage d'extractibles varie de 9,2% à 24,5%.

Ces derniers sont constitués pour une grande partie de composés phénoliques (de 21,6 à 64,8 mg eq. TAX / g de MS).

Dans cette étude, deux phénols ont été étudiés : la Taxifoline (TAX) et le Dihydrokaempférol (DHK). A l'aide d'une analyse en chromatographie liquide, il a été possible de déterminer la teneur de chacun de ces composés dans le bois de mélèze. La TAX est présente de 8,8 à 49,8 mg /g de MS tandis que le DHK varie de 2,5 à 25,9 mg eq. TAX / g de MS. Dans les deux cas, les résultats trouvés correspondent aux valeurs trouvées par Pâques et *al.* en 2013 [19] (respectivement de 1,3 à 41,7 mg / de MS pour la TAX et de 0,5 à 13,7 mg eq. TAX / g de MS pour le DHK). Certains bois étudiés ont des teneurs en Taxifoline ou en DHK supérieures à celles trouvées par Pâques et *al.* Ceci peut s'expliquer par le fait que les arbres étudiés sont âgés de 9



ans de plus que l'étude précédente. En vieillissant, les arbres de mélèze ont tendance à accumuler les composés phénoliques de ce type dans le bois.

L'analyse HPLC a également permis de démontrer que ces deux composés phénoliques sont majoritaires dans le bois de mélèze comme l'avait démontré Pâques et *al.* en 2013 [19].

L'ensemble des données acquises (extractibles, phénols, TAX, DHK) ont permis de créer des modèles de calibrations. Les meilleurs modèles sont ceux des extractibles et de la Taxifoline. Leur qualité devra néanmoins être améliorée pour pouvoir être utilisés pour la prédiction de ces paramètres chimiques du bois de mélèze. De précédents modèles établis dans le cadre du projet *Trees for Future* par quatre laboratoires différents en Europe avec beaucoup plus de données ont montré des indicateurs de qualité meilleurs. Il est possible d'espérer dans l'avenir de pouvoir utiliser des modèles pour la prédiction de ces paramètres avec suffisamment de confiance pour se passer des analyses classiques lourdes, longues et coûteuses.

Ces données chimiques ainsi que celles de la durabilité naturelle, obtenue en appliquant la norme CEN/TS 15083-1 [5] (travaux effectués par une autre personne) ou avec une méthode innovante à partir de planchettes de bois équivalentes à celles qui ont été analysées dans cette étude, serviront pour tenter d'établir un modèle de prédiction en Proche InfraRouge afin d'évaluer rapidement la durabilité naturelle du bois de mélèze.

## Conclusion personnelle

Le fait de travailler sur le milieu forestier et plus particulièrement sur le mélèze m'a beaucoup plu. En effet, pendant mes cinq mois de stage, j'ai pu découvrir et acquérir de nouvelles notions dans ce domaine.

Ce stage m'a permis d'approfondir mes connaissances mais également en assimiler des nouvelles. En effet, j'ai pu appliquer certaines techniques d'analyse vues lors de mes deux années de DUT et mon année en licence. De plus, certaines méthodes ou logiciel (Logiciel de statistique R) utilisés à l'INRA m'étaient inconnus avant le début de cette période au sein de l'INRA. De ce fait, j'ai pu les découvrir, les utiliser et les apprécier. Au travers de ce stage, j'ai acquis de nouvelles compétences qui me serviront très certainement dans ma vie professionnelle.

Au niveau relationnel, mon intégration dans l'équipe et dans l'unité a été plutôt facile et rapide. En discutant avec les membres de l'INRA, j'ai pu enrichir ma culture scientifique et découvrir certains travaux menés par mes collègues.

Ce stage m'a également permis de mûrir mon projet professionnel : je sais maintenant que je souhaiterais travailler dans un laboratoire de recherche pour la diversité des tâches et l'intérêt des projets.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accueilli, aidé et notamment M. Jean-Paul Charpentier.

# Annexes

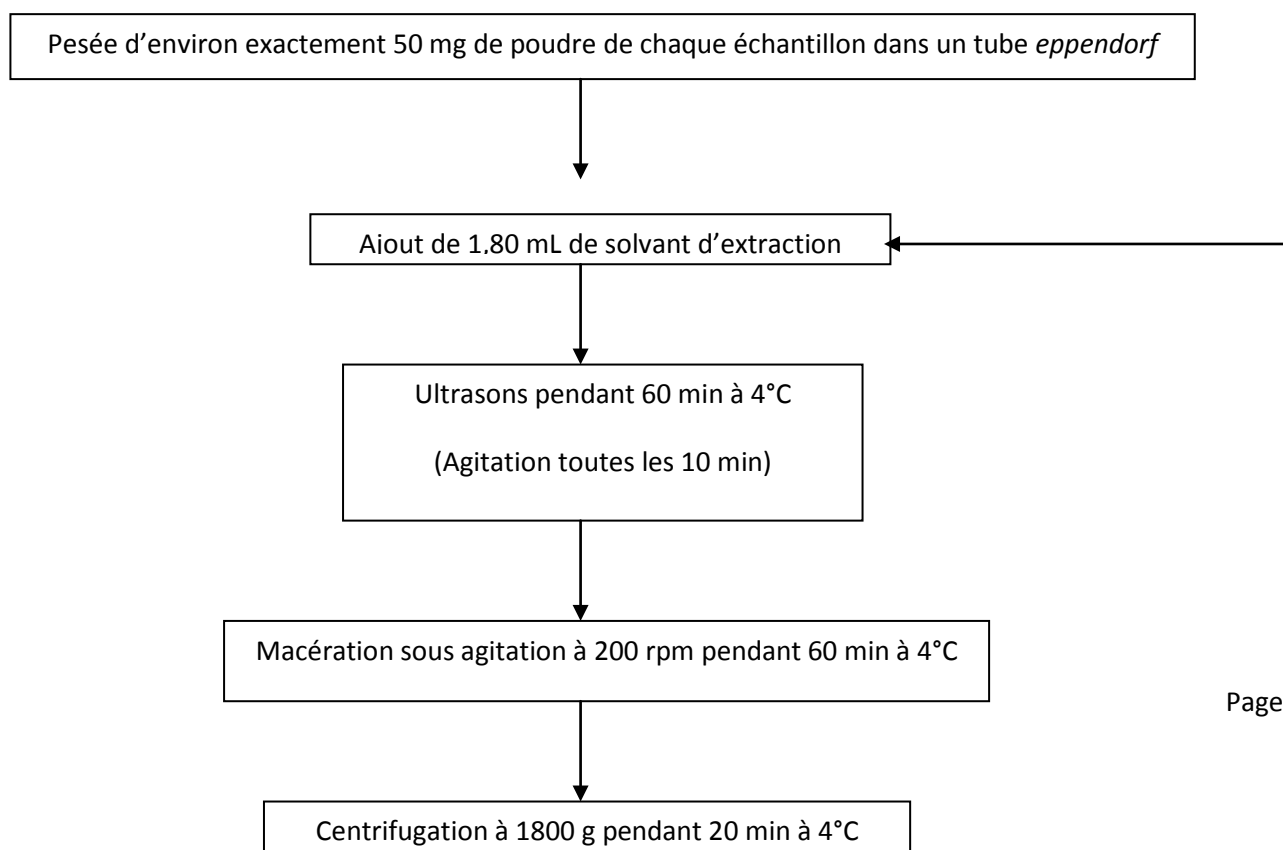
---

Annexe 1 : Protocole d'extraction des composés phénoliques

Annexe 2 : Données Physico-chimiques des produits utilisés

Annexe 3 : Récapitulatif des résultats

## Annexe 1 : Protocole d'extraction des composés phénoliques



Nom	Formule Brute	Masse Molaire	Numéro CAS	T fusion	T ébullition	Données Risques	Données Sécurité
-----	---------------	---------------	------------	----------	--------------	-----------------	------------------

Acétone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58,01 g/mol	67-64-1	-94,6°C	556,05°C	R11, R36, R66, R67	S2, S9, S16, S26, S46
Carbonate de Sodium	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,99 g/mol	497-19-8	851°C	1600°C	R36	S22, S26
Dihydrokaempférol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	288,25 g/mol	480-20-6	#	#	R22	#
Ethanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	46,07 g/mol	64-17-5	-117°C	78,37°C	R11	S2, S7, S16
Réactif de Folin-Ciocalteu	#	#	#	#	#	R36/38	S26, S36/37/39, S45
Taxifoline	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	304,25 g/mol	480-18-2	#	#	R22	S36
6-méthoxyflavone	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	252,26 g/mol	26964-24-9	163°C	#		S36/37/39
Méthanol	CH <sub>3</sub> OH	32,04 g/mol	67-56-1	-97,6°C	64,7°C	R11, R23/24/ 25, R39	S7, S16, S36/37, S45
Acétonitrile	CH <sub>3</sub> CN	41,05 g/mol	200-835-2	-45°C	82°C	R11, R20/21/ 22, R36	S16, S36/37
Acide acétique	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	60,05 g/mol	64-19-7	16°C	118°C	R10, R35	S23, S26, S45

## Annexe 2 : Données Physico-chimiques des produits utilisés

Tableau II: Produits utilisés

### Phrases Risques [20]

R10 : Inflammable

R 11 : Facilement inflammable

R22 : Nocif en cas d'ingestion

R35 : Provoque de graves brûlures

R36 : Irritant pour les yeux

R39 : Danger d'effets irréversibles très graves

R66 : L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou vergetures de la peau

R67 : L'inhalation des vapeurs peut provoquer somnolences et vertiges

R20/21/22 : Nocif par inhalation, contact avec la peau et par ingestion

R23/24/25 : Toxique par inhalation, contact avec les yeux et par ingestion

R36/38 : Irritant pour les yeux et la peau

### **Phrases Sécurité [20]**

S2 : Conserver hors de la portée des enfants

S7 : Conserver le récipient bien fermé

S9 : Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé

S16 : Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles-Ne pas fumer

S22 : Ne pas respirer les poussières

S23 : Ne pas respirer les gaz/ vapeurs/ fumées/ aérosols

S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulté un spécialiste

S36 : Porter un vêtement de protection approprié

S45 : En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)

S46 : En cas d'ingestion consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette

S36/37 : Porter un vêtement de protection et des gants appropriés

S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage

### **Annexe 3 : Récapitulatif des résultats**

Tableau III : Résultats des manipulations réalisées

Ech.	Extractibles (%)	moy. extractibles (%)	Phenols (mg eq. TAX / g de MS)	moy. phenols (mg eq. TAX / g de MS)	TAX (mg / g de MS)	moy. TAX (mg / g de MS)	DHK (mg eq. TAX / g de MS)	moy.DHK (mg eq. TAX / g de MS)	Taux d'extract° (%)	moy.taux d'extract° (%)
1a	15,80	13,00	42,85	40,88	37,21	34,07	12,55	12,56	11,02	13,49
1b	10,20		38,91		30,94		12,58		15,96	
2a	10,50	13,53	44,92	51,98	39,40	40,60	14,74	10,86	18,47	18,31
2b	16,56		59,05		41,79		6,97		18,15	
3a	14,36	14,18	41,63	40,21	32,74	30,09	22,91	19,36	12,73	14,09
3b	14,01		38,78		27,43		15,81		15,45	
4a	16,42	16,94	49,48	51,41	38,93	36,93	12,55	11,05	16,57	16,52
4b	17,45		53,34		34,92		9,55		16,47	
5a	18,71	23,10	35,27	41,28	29,87	33,78	6,66	5,71	15,10	13,19
5b	27,49		47,28		37,69		4,76		11,29	
6a	9,48	9,15	50,97	46,20	28,51	22,54	11,95	13,92	9,92	10,87
6b	8,81		41,43		16,57		15,88		11,81	
7a	13,45	13,16	47,75	44,73	36,08	32,72	15,70	15,75	12,88	11,62
7b	12,87		41,71		29,36		15,80		10,37	
8a	13,29	14,63	59,04	57,01	32,55	37,14	11,90	12,94	10,38	14,24
8b	15,98		54,99		41,73		13,98		18,11	
9a	17,45	19,27	44,55	51,22	36,14	35,69	7,72	6,93	16,16	13,96
9b	21,10		57,89		35,25		6,14		11,75	
10a	15,38	14,22	47,11	44,95	35,84	34,87	11,04	9,99	12,37	13,30
10b	13,07		42,80		33,90		8,93		14,23	
11a	21,91	19,31	40,20	37,12	32,67	26,57	7,50	7,55	14,63	14,60
11b	16,71		34,04		20,47		7,60		14,57	
12a	27,74	24,53	73,21	64,33	37,54	35,43	9,50	10,90	12,30	12,92
12b	21,31		55,44		33,33		12,30		13,54	
13a	14,65	15,46	46,32	43,85	36,83	34,65	24,12	21,10	13,05	12,12
13b	16,27		41,38		32,46		18,07		11,20	
14a	19,72	20,59	41,46	47,96	32,73	34,29	15,43	14,12	15,72	13,73
14b	21,47		54,46		35,84		12,80		11,74	
15a	16,56	15,68	57,57	52,74	38,97	34,41	27,44	25,91	10,54	10,78
15b	14,79		47,91		29,85		24,37		11,02	
16a	26,96	23,80	61,64	56,99	47,49	36,69	13,51	12,57	11,74	10,68
16b	20,63		52,34		25,88		11,63		9,62	
17a	17,99	20,23	50,88	52,05	42,19	40,39	12,20	10,27	14,37	15,03
17b	22,47		53,21		38,58		8,34		15,69	
18a	18,90	20,26	53,47	48,28	40,78	36,96	15,13	15,77	11,33	12,39
18b	21,62		43,08		33,15		16,41		13,45	
19a	16,36	14,06	43,50	43,39	36,50	34,56	12,34	18,14	15,18	11,39
19b	11,76		43,28		32,62		23,95		7,60	
20a	16,99	18,16	46,37	44,25	33,83	32,95	17,91	16,59	11,31	9,89
20b	19,32		42,13		32,06		15,27		8,47	
21a	14,15	17,15	35,77	36,13	19,45	22,13	11,31	10,10	12,35	10,59
21b	20,15		36,49		24,81		8,89		8,84	
22a	19,04	21,67	68,80	63,59	30,62	31,18	14,64	13,12	12,85	14,42
22b	24,30		58,39		31,74		11,60		15,99	
23a	19,26	18,94	43,79	38,64	35,30	35,39	13,65	13,92	10,26	10,06
23b	18,63		33,48		35,49		14,20		9,86	
24a	17,72	18,37	39,22	38,85	31,12	31,90	13,03	12,56	10,40	11,22
24b	19,03		38,49		32,67		12,09		12,05	
25a	23,26	23,31	52,07	47,41	42,63	41,10	10,75	9,83	11,18	12,51

Ech.	Extractibles (%)	moy. extractibles (%)	Phenols (mg eq. TAX / g de MS)	moy. phenols (mg eq. TAX / g de MS)	TAX (mg / g de MS)	moy. TAX (mg / g de MS)	DHK (mg eq. TAX / g de MS)	moy.DHK (mg eq. TAX / g de MS)	Taux d'extract° (%)	moy.taux d'extract° (%)
25b	23,35		42,76		39,57		8,90		13,84	
26a	20,88	18,92	36,79	38,37	32,01	33,07	8,12	9,80	22,61	49,97
26b	16,96		39,95		34,14		11,48		77,33	
27a	17,90	17,12	27,62	30,82	24,59	25,84	4,21	4,29	8,96	12,87
27b	16,34		34,03		27,08		4,36		16,77	
28a	16,64	19,00	56,85	61,78	30,10	31,08	14,86	13,06	10,04	9,99
28b	21,36		66,71		32,07		11,25		9,94	
29a	16,18	15,31	34,44	39,39	28,33	34,19	3,44	5,46	13,77	12,57
29b	14,44		44,34		40,06		7,48		11,36	
30a	21,15	20,09	53,99	49,83	39,04	39,59	10,81	11,90	15,13	14,43
30b	19,02		45,67		40,14		12,99		13,74	
31a	13,55	12,46	36,15	38,50	29,06	31,76	8,11	9,51	26,48	18,59
31b	11,38		40,85		34,46		10,90		10,71	
32a	19,37	17,21	70,14	64,78	32,11	32,90	6,54	8,06	10,24	10,00
32b	15,05		59,42		33,70		9,59		9,77	
33a	16,61	15,07	36,58	41,64	30,20	32,66	5,29	4,47	9,47	11,22
33b	13,53		46,69		35,13		3,65		12,98	
34a	17,77	20,67	43,32	50,92	41,71	40,59	3,78	2,97	9,84	10,12
34b	23,57		58,52		39,46		2,15		10,40	
35a	21,21	22,76	61,10	54,73	36,18	38,24	2,79	3,15	10,40	11,72
35b	24,30		48,37		40,30		3,52		13,04	
36a	16,50	16,23	43,11	36,45	39,26	32,46	5,57	4,69	10,30	11,92
36b	15,96		29,78		25,65		3,81		13,53	
37a	15,65	13,91	29,66	28,53	22,24	20,01	6,46	6,44	12,22	11,22
37b	12,17		27,41		17,78		6,42		10,22	
38a	17,98	17,72	45,41	40,51	33,53	35,85	8,05	8,91	10,22	11,90
38b	17,47		35,61		38,16		9,78		13,57	
39a	16,12	15,10	34,62	35,98	24,59	24,06	7,89	8,72	8,24	9,90
39b	14,08		37,35		23,53		9,56		11,57	
40a	21,09	19,28	49,36	42,43	39,45	33,14	7,42	7,03	16,70	12,84
40b	17,46		35,50		26,83		6,64		8,98	
41a	19,58	19,20	38,63	39,34	28,81	31,61	9,01	8,48	14,20	11,60
41b	18,82		40,05		34,40		7,95		9,00	
42a	20,38	19,27	42,13	41,95	32,03	31,52	6,59	6,61	22,40	16,38
42b	18,16		41,76		31,01		6,64		10,36	
43a	19,44	20,35	27,60	32,13	18,16	18,03	5,91	5,85	10,12	10,76
43b	21,27		36,66		17,90		5,79		11,40	
44a	12,78	14,21	37,10	34,75	16,27	20,13	7,57	7,53	21,99	17,15
44b	15,65		32,40		23,99		7,50		12,30	
45a	12,66	12,90	23,08	25,93	12,75	14,43	8,81	8,56	8,68	11,22
45b	13,14		28,79		16,10		8,32		13,77	
46a	16,86	16,19	38,69	44,74	30,97	34,76	9,09	11,53	10,52	9,35
46b	15,52		50,78		38,55		13,97		8,19	
47a	17,08	16,22	37,16	34,59	32,49	28,74	8,70	8,67	9,24	10,03
47b	15,36		32,02		24,99		8,63		10,82	
48a	11,77	10,13	27,18	27,19	19,58	20,31	6,38	7,20	15,26	12,54
48b	8,50		27,20		21,05		8,03		9,82	
49a	17,31	15,82	32,44	27,25	21,01	18,38	8,00	6,76	13,31	13,39
49b	14,33		22,07		15,74		5,53		13,47	
50a	12,92	14,13	29,66	30,26	22,85	24,65	5,27	4,61	10,20	12,88
50b	15,34		30,87		26,45		3,95		15,57	
51a	17,83	15,80	24,27	26,24	15,80	18,18	6,80	7,69	14,55	11,85
51b	13,77		28,22		20,55		8,59		9,16	
52a	15,74	15,92	27,79	27,62	21,36	21,53	2,73	2,53	7,41	8,82
52b	16,11		27,45		21,70		2,32		10,24	



Ech.	Extractibles (%)	moy. extractibles (%)	Phenols (mg eq. TAX / g de MS)	moy. phenols (mg eq. TAX / g de MS)	TAX (mg / g de MS)	moy. TAX (mg / g de MS)	DHK (mg eq. TAX / g de MS)	moy.DHK (mg eq. TAX / g de MS)	Taux d'extract° (%)	moy.taux d'extract° (%)
53a	17,55	15,84	42,85	41,44	32,67	31,05	15,40	14,16	9,94	11,54
53b	14,12		40,02		29,43		12,92		13,13	
54a	17,44	17,62	32,01	32,05	27,37	27,00	3,14	4,89	9,42	7,82
54b	17,81		32,09		26,62		6,63		6,23	
55a	17,64	16,07	27,96	25,17	19,75	16,91	4,99	5,50	11,37	11,60
55b	14,51		22,38		14,07		6,00		11,83	
56a	18,24	17,33	42,47	38,64	31,47	27,84	13,70	12,77	9,92	8,98
56b	16,42		34,80		24,21		11,84		8,04	
57a	17,74	17,64	44,11	36,97	34,42	29,16	6,01	5,73	9,23	10,73
57b	17,54		29,82		23,90		5,46		12,23	
58a	16,07	17,96	32,51	33,17	28,48	27,81	2,67	2,74	10,12	11,18
58b	19,84		33,84		27,13		2,81		12,25	
59a	23,13	21,30	62,90	56,73	40,97	41,48	3,40	3,69	15,63	14,41
59b	19,46		50,57		42,00		3,99		13,19	
60a	16,48	16,16	43,07	42,98	32,70	32,75	4,51	4,28	9,07	10,97
60b	15,84		42,90		32,81		4,06		12,87	
61a	14,63	14,58	26,78	31,44	12,75	14,90	8,05	8,27	10,04	12,85
61b	14,54		36,09		17,05		8,50		15,66	
62a	16,44	17,63	50,74	49,71	22,16	29,02	5,80	8,43	14,60	12,60
62b	18,83		48,67		35,88		11,07		10,60	
63a	15,26	17,67	35,22	34,04	20,92	22,00	10,38	9,15	16,02	16,36
63b	20,08		32,86		23,08		7,91		16,70	
64a	13,12	13,58	42,57	40,71	29,63	26,94	6,37	5,65	13,61	14,68
64b	14,04		38,85		24,26		4,93		15,75	
65a	14,23	13,69	27,29	27,77	13,97	15,30	10,47	10,50	16,33	13,26
65b	13,15		28,25		16,62		10,53		10,18	
66a	11,80	11,35	26,27	29,12	17,52	18,09	10,05	11,69	17,24	13,93
66b	10,91		31,96		18,66		13,33		10,62	
67a	16,17	18,83	39,39	44,24	28,85	35,89	10,26	10,07	13,23	16,53
67b	21,49		49,09		42,93		9,87		19,84	
68a	18,20	17,53	33,54	34,27	42,61	35,92	5,15	5,46	17,55	16,34
68b	16,85		35,00		29,24		5,78		15,13	
69a	17,14	16,39	26,59	26,36	16,18	15,91	5,92	5,44	15,31	15,77
69b	15,65		26,14		15,64		4,96		16,23	
70a	11,33	12,04	38,59	35,61	16,83	16,19	17,61	13,86	12,23	13,67
70b	12,76		32,62		15,56		10,10		15,11	
71a	15,92	15,64	40,04	39,12	27,23	24,31	13,18	12,14	16,00	15,41
71b	15,37		38,20		21,39		11,11		14,81	
72a	16,20	18,47	42,27	47,79	31,17	36,27	12,46	11,38	15,44	16,58
72b	20,75		53,31		41,36		10,30		17,71	
73a	12,83	14,00	34,86	42,18	19,17	26,06	13,53	12,87	8,46	9,52
73b	15,18		49,50		32,96		12,22		10,58	
74a	10,48	10,76	22,23	21,61	9,18	8,78	5,63	5,97	6,67	7,76
74b	11,03		20,99		8,37		6,31		8,86	
75a	10,95	12,56	25,42	27,10	13,52	15,01	7,70	8,45	9,00	14,90
75b	14,18		28,79		16,51		9,19		20,79	
76a	18,13	15,50	64,18	64,10	38,48	34,05	10,10	10,87	15,46	14,18
76b	12,86		64,03		29,62		11,64		12,90	
77a	24,05	21,86	64,63	60,48	35,65	34,11	11,90	11,38	14,62	13,65
77b	19,66		56,33		32,56		10,87		12,67	
78a	13,66	13,23	34,23	35,04	21,75	21,47	11,56	12,23	13,16	12,64
78b	12,81		35,84		21,19		12,89		12,12	
79a	13,76	16,76	44,24	48,61	30,41	36,52	16,66	13,85	11,94	12,92
79b	19,76		52,97		42,63		11,03		13,89	
80a	21,89	18,06	49,35	43,46	29,45	29,82	8,02	10,73	27,42	20,44

Ech.	Extractibles (%)	moy. extractibles (%)	Phenols (mg eq. TAX / g de MS)	moy. phenols (mg eq. TAX / g de MS)	TAX (mg / g de MS)	moy. TAX (mg / g de MS)	DHK (mg eq. TAX / g de MS)	moy.DHK (mg eq. TAX / g de MS)	Taux d'extract° (%)	moy.taux d'extract° (%)
80b	14,23		37,56		30,18		13,44		13,45	
81a	18,61	16,91	38,83	42,04	32,45	32,10	13,05	13,32	12,15	16,56
81b	15,22		45,25		31,74		13,59		20,98	
82a	12,83	13,61	31,91	33,91	16,79	20,99	15,09	13,99	14,06	14,22
82b	14,39		35,90		25,19		12,88		14,37	
83a	15,86	14,06	30,70	39,24	18,00	23,16	9,46	15,71	16,84	15,86
83b	12,25		47,78		28,31		21,97		14,88	
84a	16,63	20,18	36,20	40,67	26,68	28,85	13,45	10,29	14,90	32,84
84b	23,72		45,15		31,02		7,12		50,78	
85a	14,15	13,90	31,26	29,38	19,39	18,29	9,80	10,24	15,14	14,67
85b	13,64		27,50		17,18		10,69		14,20	
86a	10,33	12,81	23,67	29,78	15,88	20,72	5,65	5,70	13,41	16,91
86b	15,29		35,89		25,57		5,76		20,41	
87a	9,01	10,51	55,24	41,66	40,39	28,20	13,68	12,33	11,57	13,73
87b	12,01		28,09		16,01		10,98		15,90	
88a	11,70	11,85	27,83	28,45	16,68	17,16	10,30	11,59	6,81	10,54
88b	12,01		29,08		17,63		12,88		14,26	
89a	9,85	11,75	23,70	27,97	15,38	18,71	10,94	11,22	13,82	13,73
89b	13,65		32,24		22,05		11,51		13,64	
90a	15,81	17,29	36,50	40,11	32,03	30,05	6,35	7,72	10,47	15,91
90b	18,78		43,71		28,07		9,09		21,35	
91a	15,66	15,53	34,49	32,64	19,36	18,29	12,52	12,83	12,28	15,83
91b	15,40		30,78		17,22		13,13		19,37	
92a	11,10	11,71	28,46	30,04	17,17	17,98	11,47	11,65	8,11	11,86
92b	12,32		31,63		18,80		11,82		15,61	
93a	13,84	13,66	33,15	29,95	18,71	19,00	5,47	5,43	10,72	13,05
93b	13,48		26,75		19,30		5,38		15,38	
94a	7,74	9,46	24,26	23,14	11,06	11,48	9,72	9,70	11,22	11,17
94b	11,17		22,01		11,90		9,67		11,11	
95a	9,83	11,26	30,43	28,07	14,39	16,00	14,08	16,10	10,46	12,13
95b	12,69		25,70		17,60		18,11		13,81	
96a	16,38	16,79	39,07	39,72	25,39	25,49	10,75	10,79	23,11	17,49
96b	17,20		40,36		25,59		10,83		11,87	
97a	20,10	16,71	38,71	34,78	22,63	18,04	8,70	9,43	14,77	14,80
97b	13,31		30,85		13,45		10,16		14,82	
98a	15,04	15,96	51,08	50,87	34,84	34,91	8,90	7,60	14,85	13,50
98b	16,88		50,65		34,98		6,31		12,15	
99a	14,04	14,72	29,06	27,01	17,90	18,01	6,80	6,69	8,05	10,25
99b	15,41		24,96		18,12		6,58		12,45	
100a	13,54	10,83	31,55	27,67	19,36	17,52	4,72	5,05	11,35	12,72
100b	8,13		23,78		15,68		5,39		14,09	
101a	9,84	13,03	33,10	41,68	15,38	25,43	9,11	7,83	9,50	10,58
101b	16,22		50,25		35,48		6,55		11,65	
102a	8,74	12,35	23,16	28,67	14,56	17,79	12,72	13,27	12,17	11,74
102b	15,97		34,17		21,02		13,82		11,31	
103a	16,92	15,25	39,18	34,09	34,62	28,17	4,05	3,62	14,45	14,33
103b	13,59		29,01		21,71		3,19		14,20	
104a	22,54	19,94	64,28	64,78	56,66	49,83	3,29	3,29	12,75	11,52
104b	17,35		65,27		43,00		3,28		10,28	

# Bibliographie

---

[1] Berger, P. Le matériau bois

[http://philippe.berger2.free.fr/Bois/Orga/materiau\\_bois/Le%20bois.htm](http://philippe.berger2.free.fr/Bois/Orga/materiau_bois/Le%20bois.htm) [consulté le 01/04/2015]

[2] Bertrand, D. (2002). La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. *Productions Animales*, 15 (3), 209-219

<http://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:269152>

[3] Bertrand, D.; Dufour, E. (2006). La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. Paris : Tec & Doc : Lavoisier, 2<sup>e</sup> ed, 660 p.

[4] Boizot, N.; Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82

<http://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:19067>

[5] Centre Européen de la Normalisation (2005). Durability of wood and wood-based products. Determination of the natural durability of solid wood against food-destroying fungi, test methods. Basidiomycetes: part 1. Standard Number DD CEN/TS 15083-1:2005 ; ISBN. 0 580 46610 8

[6] Chapelet, J.; Dirol, D.; Ozanne, G. et al. (1991). Mode d'emploi et préservation : guide d'exigences pour la préservation et l'entretien des ouvrages en bois. Paris : CTBA, 175 p.

[7] Claude, B. (2014-2015). Détecteur à barrettes de diodes (DAD). (cours LPAC, IUT Chimie, Faculté Orléans)

[8] Fiche de synthèse. S4.1 Le matériau bois PROF, Lycée Don Bosco, Marseille

<http://donbosco-marseille.fr/IMG/pdf/3A->

[fiche\\_synth\\_le\\_bois\\_S41\\_le\\_materiau\\_S42\\_la\\_deformation\\_au\\_sechage\\_Mode\\_de\\_compatibilite\\_.pdf](fiche_synth_le_bois_S41_le_materiau_S42_la_deformation_au_sechage_Mode_de_compatibilite_.pdf) [consulté le 24/04/2015]

[9] Giordanengo, T.; Charpentier, J.-P.; Mourey, N. (2012). OakScan<sup>®</sup> : outil d'évaluation rapide de la qualité du bois de chêne pour l'œnologie. *Forêt Entreprise* (203), 38-41

<http://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:48656>

[10] Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

<http://www.inra.fr/> [consulté le 24/04/2015]

[11] INRA Centre Val de Loire- Unité de Recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (UAGPF)

<http://www6.val-de-loire.inra.fr/uragpf> <http://www.inra.fr/> [consulté le 24/04/2015]

[12] Konika Minolta. (2001) Spectrophotometer CM-2600d Minolta. Simply expands the boundaries in color control, Konika Minolta Optics, inc 8 p.

[https://www.konicaminolta.eu/fileadmin/content/eu/Measuring\\_Instruments/2\\_Products/1\\_Colour\\_Measurement/2\\_Spectrophotometers\\_Portable/2\\_CM-2600d\\_CM-2500d/PDF/CM-2600d\\_EN.pdf](https://www.konicaminolta.eu/fileadmin/content/eu/Measuring_Instruments/2_Products/1_Colour_Measurement/2_Spectrophotometers_Portable/2_CM-2600d_CM-2500d/PDF/CM-2600d_EN.pdf) [consulté le 10/04/2015]

[13] Lachenal, G. La spectroscopie proche infrarouge, Université Lyon1, part.IIa

<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/spectroscopie/techniquepir.html> [consulté le 10/04/2015]

[14] Iefloch, R. Présentation de la spectrocolorimétrie : principe, référentiels couleurs, fonctionnement du spectrocolorimètre

<http://chimie.sup.pagesperso-orange.fr/spectrocolorimétrie.htm> [consulté le 10/04/2015]

[15] Macheix, J.J.; Fleuriet, A.; Jay-Allemand, C.(2005). Les composés phénoliques des végétaux. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes, 192 p.

[16] Morin, M.P. (2014-2015). Chromatographie en phase liquide. ( cours LPAC, IUT Chimie, Faculté Orléans)

[17] Nehmé, R. (2013/2014). Spectroscopie d'absorption UV-Visible. ( cours 2<sup>ème</sup> année DUT, IUT Chimie, Faculté Orléans)

[18] Pâques, L. E., Charpentier, J.-P. (2015). Perspectives for genetic improvement of heartwood size and extractive content in relation to natural durability and aesthetics in interspecific hybrid larch (*Larix x eurolepis*). *European Journal of Forest Research, online first*

<http://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:319312>

[19] Pâques, L.; Garcia Casas, M. D. C.; Charpentier, J.-P. (2013). Distribution of heartwood extractives in hybrid larches and in their related European and Japanese larch parents: relationship with wood colour parameters. *European Journal of Forest Research, 132* (1), 61-69

<http://prodinra.inra.fr/record/183641>

[20] Phrases R et S, Université Aix-Marseille

<http://dsite.univ-provence.fr/gsite/Local/lce/dir/user-570/HSE/Phrases%20R%20et%20S.pdf> [consulté le 25/06/2015]

[21] Pontoppidan, A. (2003). Le mélèze. Arles : Actes Sud, 91 p.

[22] R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0,

<http://www.R-project.org>

[23] Riou-Nivert, P. (2001). Le mélèze. Paris : Institut pour le développement forestier, 144 p.

[24] Trees for the Future- Integrative European Research Infrastructure project

<http://www.trees4future.eu> [consulté le 10/06/2015]