

Effet de la hauteur de prélèvement sur la composition quantitative et qualitative des polyphénols de l'écorce d'*Abies alba* Mill.

Pauline Gérardin, Clément Fritsch, Sylvain Cosgun, Maree Brennan, Stéphane Dumarçay, Francis Colin, Philippe Gerardin

► **To cite this version:**

Pauline Gérardin, Clément Fritsch, Sylvain Cosgun, Maree Brennan, Stéphane Dumarçay, et al.. Effet de la hauteur de prélèvement sur la composition quantitative et qualitative des polyphénols de l'écorce d'*Abies alba* Mill.. *Revue forestière française*, AgroParisTech, 2020, 72 (5), pp.411-423. hal-03273202

HAL Id: hal-03273202

<https://hal-agroparistech.archives-ouvertes.fr/hal-03273202>

Submitted on 29 Jun 2021

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.



EFFET DE LA HAUTEUR DE PRÉLÈVEMENT SUR LA COMPOSITION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES POLYPHÉNOLS DE L'ÉCORCE D'*ABIES ALBA* MILL.

PAULINE GÉRARDIN^a – CLÉMENT FRITSCH^a – SYLVAIN COSGUN^a – MAREE BRENNAN^a –
STÉPHANE DUMARÇAY^a – FRANCIS COLIN^b – PHILIPPE GÉRARDIN^a

Lors de la première transformation du bois, l'écorce constitue, après le bois, le second sous-produit industriel en termes de volumes. Elle est composée d'écorce interne correspondant au phloème secondaire fonctionnel et d'écorce externe constituée de phloème non fonctionnel et de phellogène comprenant le phelloderme et le liège. La majeure partie des métabolites secondaires de l'écorce est constituée de polyphénols qui se forment dans les cellules du parenchyme traversant le phloème secondaire. Une couche de ces cellules parenchymateuses se forme chaque année et reste viable même dans les couches d'écorce les plus anciennes. En plus de ces composés polyphénoliques, ces cellules contiennent des lipides et des polysaccharides comme l'amidon. L'écorce la plus épaisse se trouve vers la base du tronc et est constituée en majeure partie d'écorce externe mature, tandis que l'écorce la plus fine présentant la plus grande proportion d'écorce interne se trouve au sommet de l'arbre.

Les travaux de Jablonsky *et al.* (2017) ont permis d'identifier 237 composés dans des extraits d'écorce de résineux, dont la majorité correspond à des tannins. Ces composés peuvent être utilisés, par exemple comme antioxydants dans le domaine des nutraceutiques ou pour la dépollution des eaux contenant des métaux lourds, des colorants, des surfactants et autres produits toxiques (Kavitha et Kandasubramanian, 2020). Les tannins peuvent être de deux types : les tannins hydrolysables correspondant à des esters d'acide gallique ou ellagique et de sucres et les tannins condensés ou proanthocyanidines, correspondant à des oligomères de flavan-3-ol comme la catéchine. Les résineux contiennent le plus souvent des tannins condensés possédant des degrés de polymérisation (nombre d'unités flavan-3-ol impliquées dans leur structure) supérieurs à ceux des tannins présents dans les feuillus. Ces tannins condensés contiennent de nombreux groupes hydroxyles leur conférant une forte aptitude à complexer les protéines et les polysaccharides. La réactivité des tannins condensés avec les aldéhydes dont le formaldéhyde permet d'envisager la production de résines particulièrement adaptées pour être utilisées en tant qu'adhésif, résine ou mousse (Pizzi *et al.*, 1994). Les polyphénols sont également dotés de propriétés antioxydantes et antiradicalaires pouvant présenter des intérêts pour de nombreuses applications dans les domaines de la santé animale, de la cosmétique, de la nutraceutique ou de la protection des matériaux... (Tavcar Benkovic *et al.*, 2014 ; Ostolski *et al.*, 2021). Les polyphénols et autres tannins pourraient donc conduire à des voies de valorisation nouvelles des écorces produites par l'industrie du bois

^a Université de Lorraine, INRAE, LERMAB, F-54000 Nancy, France

^b Université de Lorraine, AgroParisTech, INRAE, SILVA, F-54000 Nancy, France

sans remettre en cause leurs valorisations actuelles tournées vers l'horticulture et l'énergie, puisque la matière lignocellulosique résiduelle après extraction pourrait continuer à être utilisée selon une approche de valorisation en cascade.

Les nature et quantité des molécules extractibles présentes dans les écorces constituent donc un élément important en vue de leur valorisation. Le rendement d'extraction dépend de nombreux paramètres dont la nature du solvant d'extraction, la granulométrie de la poudre, l'âge et la position des tissus dans l'arbre. Il est donc essentiel de connaître au mieux la variabilité intraspécifique de la teneur en tannins et autres composés phénoliques en termes de quantité, mais aussi en termes de composition, de manière à pouvoir adapter et maîtriser au mieux l'approvisionnement pour une utilisation donnée.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet « ExtraFor_Est » dont l'objectif est de faire un état des lieux des extractibles présents dans les différents sous-produits tels que les écorces, les sciures et les nœuds produits au cours de la transformation du bois que ce soit pour des applications bois d'œuvre, bois d'industrie ou bois énergie. À partir d'un échantillonnage de huit arbres, réalisé avec l'ONF, plusieurs hypothèses ont pu être évaluées :

- il existe une variabilité dans la teneur et la composition chimique des extraits d'écorce pour une même hauteur entre différents arbres d'une même espèce ;
- il existe une variabilité dans la teneur et la composition chimique des extraits en fonction de la hauteur dans un même arbre ;
- enfin, la gestion de la forêt affecte la teneur et la composition chimique des extraits.

Pour tester ces différentes hypothèses, des disques ont été prélevés à différentes hauteurs de huit sapins, quatre provenant d'une placette avec un mode de gestion dynamique suite à différentes éclaircies, quatre provenant d'une placette avec un mode de gestion témoin sans intervention humaine (zone non éclaircie). L'écorce a été prélevée, broyée, puis des extractions ont été réalisées afin de déterminer les teneurs en extractibles et leur composition. Les résultats présentés dans la suite de cet article sont extraits de deux publications réalisées par les auteurs dans *Annals of Forest Science* et *Plant Physiology and Biochemistry* (Brennan *et al.*, 2020a, 2020b).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillonnage

Les huit arbres d'*Abies alba* étudiés proviennent d'une expérimentation sylvicole menée en forêt de Saint Prix gérée par l'Office national des forêts (latitude nord : 46°59,550'; longitude : 4°34'13'; altitude : 750 mètres).

Les arbres proviennent de placettes sujettes à deux types de sylviculture : une placette témoin sans intervention avec une croissance radiale des arbres de 2,5 mm/an et une placette où une sylviculture dynamique a été conduite donnant une croissance radiale de 4 mm/an.

Sur chacun des arbres sélectionnés, une douzaine de disques de bois de 10 cm d'épaisseur a été prélevée à différentes hauteurs choisies selon des critères morphologiques ou technologiques (bois d'œuvre *versus* bois d'industrie). L'ensemble de l'échantillonnage est répertorié dans la figure 1 (p. 414) et le tableau I (p. 413).

Préparation des échantillons, extraction et quantification

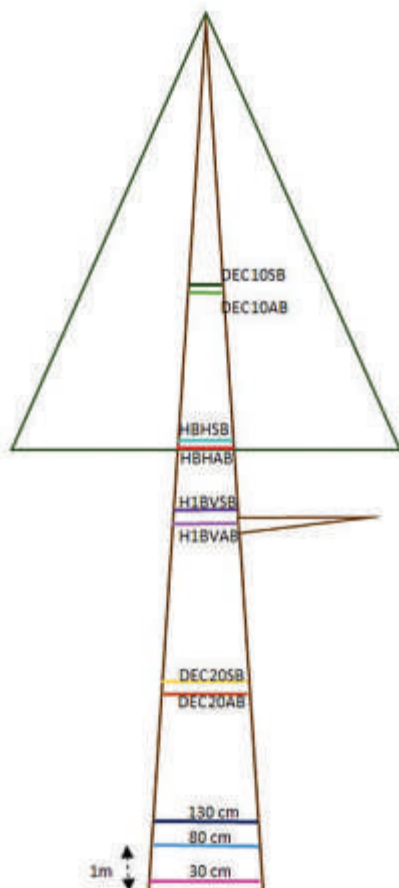
Les rondelles prélevées ont été écorcées avec un ciseau à bois et les écorces obtenues ont été broyées dans un broyeur à anneaux Fritsch Pulverisette 9 (Fritsch, Idar-Oberstein, Allemagne) pendant 90 secondes à 1 100 rpm. L'écorce broyée a ensuite été séchée à 103 °C pendant 8 heures.

TABLEAU I
Hauteur des échantillons prélevés sur chaque arbre
(exprimées en cm au-dessus du sol)

Échantillon	Arbre 1	Arbre 2	Arbre 3	Arbre 4	Arbre 5	Arbre 6	Arbre 7	Arbre 8
30 cm	30	30	30	30	30	30	30	30
80 cm	80	80	80	80	80	80	80	80
130 cm	130	130	130	130	130	130	130	130
MILAB (mi-hauteur entre 130 cm et hauteur limite pour l'utilisation industrielle) (cm)	480	–	265	–	600	697	435	685
MILSB (10 cm au-dessus de MILAB, sans branche) (cm)	490	–	275	–	605	–	445	–
DEC20AB (hauteur limite de bois d'œuvre) (cm)	–	–	465	–	–	1 350	870	1 318
DEC20SB (10 cm au-dessus de DEC20AB, sans branche) (cm)	955	–	479	–	–	1 365	885	1 340
H1BVAB (hauteur de la branche verte la plus basse) (cm)	1 130	1 136	950	947	720	495	515	703
H1BVSB (10 cm au-dessus de H1BVAB)	1 140	1 150	965	958	732	505	525	713
HBHAB (hauteur de la base de la couronne)	1 365	1 350	1 095	–	780	795	765	890
HBHSB (10 cm au-dessus de HBHAB, sans branche) (cm)	1 375	1 361	1 107	–	793	800	775	905
DEC10AB (hauteur limite pour l'utilisation industrielle, avec branche) (cm)	1 685	617	1 509	–	1 147	1 745	1 540	1 720
DEC10SB (10 cm au-dessus de DEC10AB, sans branche) (cm)	1 705	629	1 523	–	1 154	1 765	1 525	1 740
Hauteur totale de l'arbre (cm)	2 240	1 575	2 050	1 360	1 699	2 140	2 010	2 120
Âge de l'arbre (années)	50	44	51	57	48	43	43	44
Diamètre du tronc à hauteur de poitrine (130 cm)	28,0	13,9	22,6	10,4	19,6	41,2	29,5	38,9

Des échantillons de 2,00 g (\pm 0,01 g) ont été préparés en triplicat pour l'extraction, menée avec un mélange eau/éthanol (50 : 50, v/v) comme solvant, à l'aide d'un extracteur par solvant sous pression Thermo Scientific™ ASE™ 350. Trois cycles d'extraction de 5 minutes ont été réalisés à 100 °C et 1 600 psis, le milieu étant renouvelé par du solvant frais entre chaque cycle. L'éthanol a ensuite été évaporé grâce à un évaporateur rotatif puis l'extrait a été lyophilisé afin d'éliminer le reste d'eau. Le rendement d'extraction est calculé comme le pourcentage de poids sec d'extrait obtenu par rapport aux 2,00 g d'écorce broyée de départ.

FIGURE 1 SCHÉMA REPRÉSENTANT LES HAUTEURS ÉCHANTILLONNÉES DANS UN ARBRE



Quantification et identification des composés par LC-UV-MS/MS

La composition des extraits eau/éthanol a été étudiée par chromatographie liquide haute performance (chaîne Nexera Shimadzu) couplée à un spectromètre de masse triple quadrupôles (LCMS-8030) et un détecteur UV-visible à barrettes de diodes. Pour cela, 10 mg d'extrait lyophilisé ont été placés dans un flacon de 1,5 mL avec 1 mL de mélange eau/éthanol (50 : 50, v/v). Cet échantillon a ensuite été solubilisé dans un bain à ultrasons pendant 2 minutes. La séparation des composés a été réalisée sur une colonne en phase inverse Luna C18 (Phenomenex). 5 µL d'échantillon ont été injectés avec un débit de 0,4 mL/min. L'éluant pour la chromatographie est composé d'un mélange de deux solvants : de l'eau ultra-pure acidifiée à 0,1 % avec de l'acide formique et de l'acétonitrile également acidifié à 0,1 % avec de l'acide formique (tableau II, p. 415).

L'identification des composés chimiques a été réalisée en comparant les temps de rétention des pics obtenus à ceux des solutions standards de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine, les spectres UV-visibles entre 190 et 800 nm et les spectres de masses à ceux des standards et aux données de la littérature.

La quantification des composés a été réalisée à 280 nm, ce qui correspond généralement au maximum d'absorption des composés phénoliques. Les pics à 280 nm présents sur le chromatogramme obtenu ont donc été numérotés et définis selon leur spectre de masse.

TABLEAU II Gradient de solvants pour l'analyse HPLC-MS

Temps	Acétonitrile	Eau
0,0 à 10,0 min	5 %	95 %
10,0 à 18,0 min	30 %	70 %
18,0 à 19,0 min	80 %	20 %
19,0 à 20,0 min	5 %	95 %

Analyses par résonance magnétique nucléaire

Cette technique a été utilisée afin de mettre en évidence d'autres types de composés que les polyphénols, notamment les composés non visibles en UV comme les sucres ou les composés aliphatiques tels que les terpènes et les acides gras.

Quatre extraits eau/éthanol ont été choisis pour l'analyse RMN. Ils proviennent des arbres 2 et 6, et correspondent aux disques prélevés à 130 cm de hauteur.

Les spectres ^{13}C RMN CP/MAS ont été réalisés directement sur 250 mg d'extrait lyophilisé placés dans un rotor en CeO_2 de 4 mm de diamètre. L'acquisition a nécessité 2 048 scans de 0,04 seconde. Les spectres ont ensuite été analysés avec le logiciel TopSpin 3.6.2.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de R (R Development Core Team, 2008). Toutes les données sont disponibles en ligne (Brennan *et al.*, 2019). Une analyse de la variance a été réalisée pour vérifier si l'arbre avait une influence significative sur le rendement des extractibles en fonction des disques prélevés à différentes hauteurs. Lorsque l'effet de l'arbre était significatif, un test HSD de Tukey a été utilisé pour déterminer quels arbres étaient significativement différents les uns des autres. Des informations complémentaires sont disponibles dans Brennan *et al.* (2020a).

RÉSULTATS

Variation du rendement des extraits eau/éthanol

Les rendements en extractibles en fonction de la hauteur dans l'arbre sont représentés dans la figure 2 (p. 416) et le tableau III (p. 417).

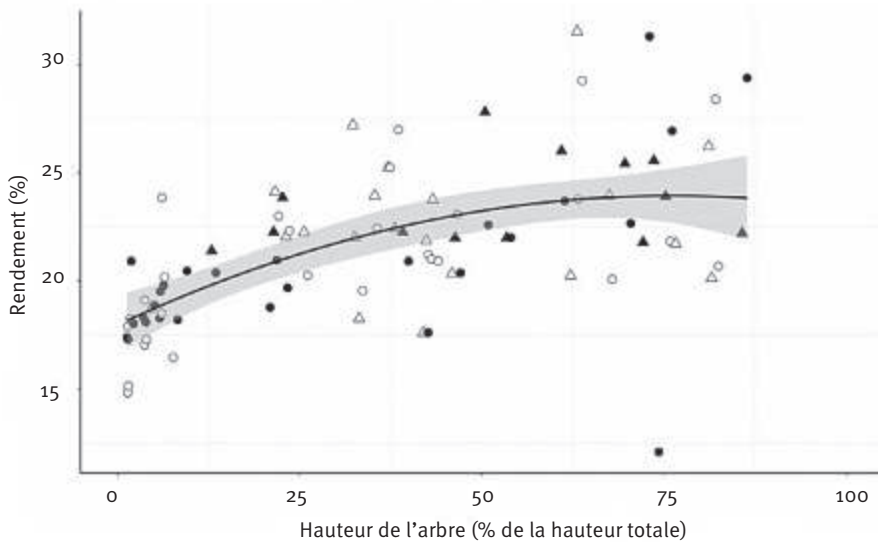
La figure 2 (p. 416) montre une augmentation des rendements d'extraction en fonction de la hauteur de prélèvement indiquant des teneurs plus importantes d'extractibles vers la cime de l'arbre. Les rendements mesurés sont de l'ordre de 15 % à la base des arbres et atteignent 20 à 25 % en haut des arbres. Il existe donc bien une variabilité dans la teneur en extraits d'écorce entre différentes hauteurs à l'intérieur d'un arbre. L'effet de la sylviculture ne semble pas influencer les rendements en extractibles comme l'indique la répartition des différentes mesures réalisées.

FIGURE 2

RELATION ENTRE LA HAUTEUR DE L'ÉCHANTILLON
ET LE RENDEMENT D'EXTRACTION EAU/ÉTHANOL DANS LES 8 ARBRES

- : échantillons en gestion dynamique et sans branche
- : échantillons en gestion standard et sans branche
- △ : gestion dynamique avec branches
- ▲ : échantillons en gestion standard avec branches

La ligne noire représente la courbe de tendance et la bande grisée correspond à l'intervalle de confiance à 95 %.



Des différences significatives de rendement ont été observées entre les arbres pour les disques échantillonnés à différentes hauteurs, sauf pour les disques à 80 cm au-dessus du sol, à mi-hauteur sans branche, ou juste au-dessus de la base de la couronne verte sans branche comme le présente le tableau III (p. 417). Parmi les huit arbres, seulement un ou deux étaient différents les uns des autres. Le type de sylviculture n'a pas montré d'influence significative sur les taux d'extraits des différents sapins. La présence ou l'absence de branche n'a pas non plus engendré de différence dans le rendement d'extraction.

Des études réalisées chez le Robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia* L.) ont démontré que le rendement d'extraction à l'eau chaude augmente avec la hauteur dans l'arbre (Stringer et Olson, 1987). Nos résultats obtenus avec *Abies alba* sont similaires, le rendement d'extraction eau/éthanol est généralement plus élevé dans la région du tronc vers la base de la couronne et dans le haut de l'arbre plutôt que dans les parties inférieures du tronc. En ce qui concerne les valeurs des rendements, les résultats rapportés par Bianchi *et al.* (2014) ont montré des rendements d'extraction de l'ordre de 10 % pour des écorces 3 m de haut. Ces valeurs sont bien inférieures à celles de 17 à 20 % trouvées dans la présente étude sur des échantillons prélevés à la même hauteur. Cette différence de rendement pourrait être due à des conditions d'extraction différentes notamment en termes de température, plus faible dans l'étude de Bianchi *et al.* (2014).

La base du tronc présente une plus grande proportion d'écorce externe mature, tandis que le tronc plus en hauteur contient une plus grande proportion d'écorce interne, jeune ; l'épaisseur d'écorce interne restant relativement constante de haut en bas de l'arbre.

TABLEAU III

**Rendement d'extraction en eau/éthanol pour chaque arbre
en fonction de la hauteur de prélèvement (en % de masse)**

a Les arbres qui ne partagent pas une même lettre sont significativement différents les uns des autres comme démontré par le test HSD de Turkey, une analyse ANOVA montre que le rendement en extrait est significativement différent pour chaque arbre.

b Le rendement est exprimé en % massique \pm l'écart type mesuré sur 3 réplicats.

Disque	30 cm	80 cm	130 cm	MILAB	MILSB	DEC20AB
Branche	Sans	Sans	Sans	Avec	Sans	Avec
Arbre 1	17,38 \pm 0,66 abc	18,30 \pm 0,64	18,27 \pm 0,87 a	22,25 \pm 0,48 ac	20,95 \pm 3,67	Nd
Arbre 2	20,90 \pm 0,21 d	18,87 \pm 1,03	18,20 \pm 0,91 a	Nd	18,77 \pm 1,51	Nd
Arbre 3	17,28 \pm 0,42 abc	18,08 \pm 0,63	19,78 \pm 0,39 ab	21,38 \pm 0,34 a	20,38 \pm 0,11	23,83 \pm 2,37 a
Arbre 4	18,02 \pm 0,68 bd	19,50 \pm 1,50	20,45 \pm 1,78 ab	Nd	Nd	Nd
Arbre 5	18,25 \pm 1,82 cd	18,70 \pm 0,05	16,45 \pm 1,78a	23,93 \pm 0,64 bc	22,43 \pm 2,06	Nd
Arbre 6	14,83 \pm 0,58 a	17,03 \pm 1,84	18,48 \pm 1,79 a	22,00 \pm 0,61 ab	Nd	31,53 \pm 1,38 b
Arbre 7	15,13 \pm 1,25 ab	17,28 \pm 0,85	20,17 \pm 2,47 ab	24,10 \pm 1,19 c	22,98 \pm 2,37	23,75 \pm 0,35 a
Arbre 8	17,88 \pm 1,61 ad	19,10 \pm 1,05	23,83 \pm 0,76 b	27,20 \pm 0,83 d	Nd	20,23 \pm 1,00 a

Disque	DEC20SB	H1BVAB	H1BSB	HBHAB	HBHSB	DEC10AB	DEC10SB
Branche	Sans	Avec	Sans	Avec	Sans	Avec	Sans
Arbre 1	17,60 \pm 0,26 a	27,80 \pm 0,60 a	22,58 \pm 1,46 a	26,00 \pm 0,87 a	23,68 \pm 0,71	23,90 \pm 1,10 ab	26,93 \pm 0,49 a
Arbre 2	Nd	21,78 \pm 3,18 bc	31,29 \pm 2,67 b	22,20 \pm 1,98 ab	29,38 \pm 1,59	22,25 \pm 0,90 bcd	20,90 \pm 0,84 b
Arbre 3	19,67 \pm 0,29 ab	21,98 \pm 0,79 bc	20,37 \pm 0,12 a	21,98 \pm 0,38 bc	22,00 \pm 2,44	25,55 \pm 2,09 ac	12,08 \pm 0,51 c
Arbre 4	Nd	25,42 \pm 1,12 ab	22,65 \pm 1,15 a	Nd	Nd	Nd	Nd
Arbre 5	Nd	21,85 \pm 0,79 bc	21,00 \pm 1,00 a	20,33 \pm 1,88 bd	23,07 \pm 5,31	23,99 \pm 0,64 ab	20,07 \pm 1,72 b
Arbre 6	29,25 \pm 1,06 d	22,03 \pm 1,69 bc	22,30 \pm 2,61 a	25,23 \pm 1,63 ac	25,23 \pm 0,87	20,12 \pm 0,78 d	20,67 \pm 1,76 b
Arbre 7	20,90 \pm 0,35 b	22,23 \pm 1,63 bc	20,25 \pm 2,47 a	22,42 \pm 0,38 ab	26,98 \pm 2,07	21,72 \pm 1,14 bd	21,83 \pm 0,67 b
Arbre 8	23,77 \pm 1,45 c	18,25 \pm 1,74 c	19,53 \pm 0,91 a	17,60 \pm 2,16 d	21,20 \pm 1,34	26,22 \pm 1,75 a	28,38 \pm 0,54 a

L'analyse de la variation longitudinale des extractibles nous permet donc d'affirmer que l'écorce du bas des arbres, présentant une écorce interne minoritaire, présente des taux d'extractibles plus faibles que l'écorce du haut des arbres présentant une écorce interne plus importante. Le taux d'extrait constitue donc un indicateur de maturité de l'écorce. Une analyse chimique séparée des deux types d'écorce permettrait d'affiner ces premiers résultats.

Par conséquent, les différences d'extractibles détectées entre les écorces prélevées à différentes hauteurs indiquent que le rendement dépendrait d'une combinaison entre la proportion des différents types d'écorces et l'âge (donc la hauteur) de ces dernières.

Chez certains arbres, comme chez le Peuplier faux-tremble, l'allocation du carbone pour la synthèse de tannins est plus importante dans les feuilles matures que dans les jeunes feuilles (Kleiner, 1999).

La biosynthèse de tannins y est donc affectée par la disponibilité en photo-assimilats plus grande dans les feuilles adultes. Ici, que le houppier soit grand ou non et qu'il y ait davantage d'aiguilles matures n'a aucune incidence sur les rendements d'extraction. Ce n'est qu'en multipliant ces rendements par les biomasses d'écorce des arbres de différentes tailles de houppier qu'il sera possible de tester si la synthèse de tannins est déterminée par le type de gestion utilisée et donc la disponibilité de photo-assimilats.

De plus, pour un même type d'échantillon (même hauteur de prélèvement), il n'y a pas de différence de rendement significative d'un arbre à l'autre. La hauteur totale de l'arbre n'a donc pas de rôle important dans les rendements en extractibles. Ce serait plutôt la maturité de l'écorce qui jouerait un rôle dans la variabilité observée longitudinalement. Le parenchyme secondaire constitue un site d'accumulation important de polyphénols (Li *et al.*, 2012 ; Krekling *et al.*, 2000). Chaque saison, une couche de ces cellules est produite, une écorce plus mature contient donc plus de couches de cellules de parenchyme secondaire qu'une écorce plus jeune. Ceci pourrait donc conduire à des différences entre la base (bois d'œuvre) et le haut (bois d'industrie) du tronc, la base contenant plus d'écorce mature pourrait de ce fait contenir plus de polyphénols que le haut du tronc, qui pourrait être pour sa part plus riche en sucre.

Composition des extraits

L'analyse chromatographique des différents extraits d'écorces en fonction de leur hauteur dans l'arbre a été réalisée pour déterminer si une variabilité intra-arbre existait en fonction de la hauteur de prélèvement. 11 composés ont pu être détectés et 9 d'entre eux ont pu être identifiés et quantifiés (figure 3, p. 419).

La figure 3 nous permet de voir que, d'une manière générale, les mêmes molécules sont présentes aux différentes hauteurs de l'arbre. En revanche, l'intensité de certains pics change le long de l'arbre ; c'est le cas, notamment pour le pic 1 qui augmente ; le pic 2 (dimère de gallocatéchine) diminue avec la hauteur, l'intensité des dérivés de catéchine diminue également avec la hauteur de l'arbre tandis que l'intensité de la catéchine semble augmenter ; les pics 7, 8 et 9 diminuent également. Enfin, le pic 11 (isorhamnétine) semble également montrer une diminution de l'intensité lorsque la hauteur augmente. Pour deux pics, correspondant à l'isorhamnétine glycosylée (10) et la catéchine (6), la présence ou l'absence de branche semble influencer l'intensité des pics. En effet, une diminution de l'intensité pour chacun de ces pics est visible pour les écorces prélevées sur les disques présentant des branches.

Des analyses réalisées sur les écorces d'autres arbres ont montré des profils chromatographiques très similaires, indépendamment de la sylviculture (Brennan *et al.*, 2020b).

Analyse par résonance magnétique nucléaire

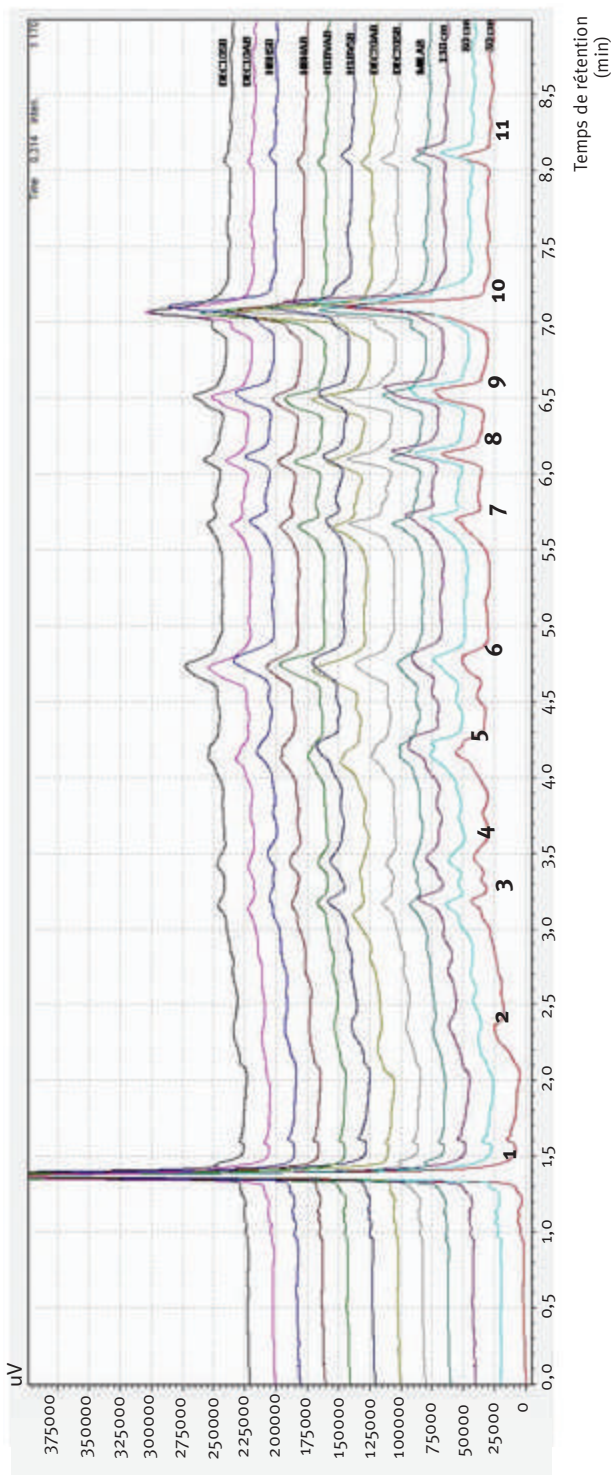
Des analyses en RMN ont été réalisées afin de compléter les résultats et vérifier la présence potentielle d'autres molécules dans les extraits qui seraient non visibles en UV (comme les sucres, ou les composés aliphatiques tels que les terpènes ou les acides gras).

Les extraits d'écorce des disques prélevés à 130 cm des arbres 2 et 6 ont donc été testés en RMN ¹³C.

Comme attendu, les résultats (figure 4, p. 420) ont montré la présence de signaux correspondant à des composés aromatiques et à des hydrates de carbone (sucres), ainsi que des signaux dans la zone des carbones aliphatiques pouvant correspondre à des dérivés terpéniques ou à des chaînes grasses. Les signaux 155 ppm, 145 ppm et 130 ppm, correspondent respectivement à un carbone aromatique lié à un oxygène, un carbone aromatique lié à un carbone et un carbone aromatique lié à un hydrogène présent dans une boucle aromatique de composé phénolique comme les

FIGURE 3 CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DES EXTRAITS D'ÉCORCES AUX DIFFÉRENTES HAUTEURS PRÉLEVÉES DANS UN MÊME ARBRE

- 1 : Acide quinique
- 2 : Dimère de gallocatéchine
- 3 : Gallocatéchine
- 4 : Gallate de gallocatéchine
- 5 : Epigallocatéchine
- 6 : Catéchine
- 7 : Composé non identifié
- 8 : Composé non identifié
- 9 : Quercétine glycosylée
- 10 : Isorhamnétine glycosylée
- 11 : Isorhamnétine



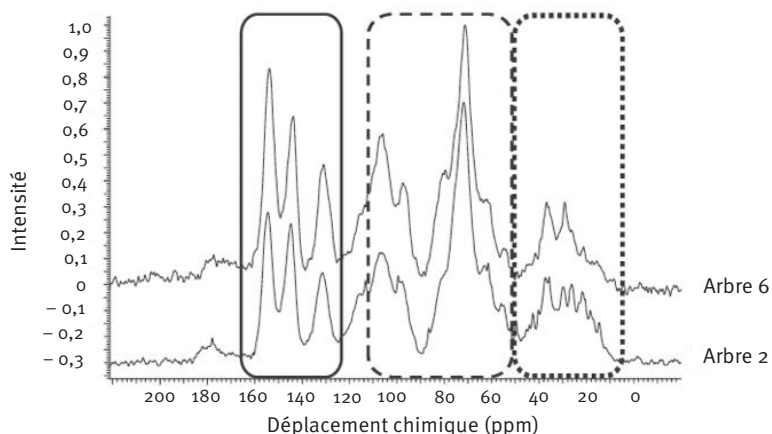
flavonoïdes et les tannins. Les signaux compris entre 110 et 50 ppm, en particulier 75 ppm, indiquent la présence de saccharides correspondant soit à des sucres libres soit aux sucres associés aux composés phénoliques sous forme de glycosides.

Enfin, les signaux entre 10 et 50 ppm correspondent à des carbones aliphatiques pouvant être présents dans des corps gras tels que acides gras, glycérides ou subérine. Ces signaux peuvent également correspondre à des terpènes impliqués dans des structures de type saponine, expliquant ainsi leur extraction dans des solvants hydro-alcooliques.

FIGURE 4

**SPECTRE RMN DES EXTRAITS À 130 cm
DES ARBRES 2 (SPECTRE DU BAS) ET 6 (SPECTRE DU HAUT)**

- Noyau aromatique
- - - Squelette glucidique
- Carbone aliphatique



CONCLUSIONS

Les teneurs en extraits varient en fonction de la hauteur de prélèvement, alors que la variation de la composition chimique est moins marquée. Le mode de sylviculture influence peu la teneur et la nature des extractibles présents dans l'écorce. Les teneurs en extraits eau/éthanol sont plus élevées pour les échantillons prélevés en haut de l'arbre. Pour ce qui est de la composition chimique, la plupart des composés phénoliques détectés en LC-MS restent sensiblement les mêmes, même si les intensités relatives des pics peuvent varier légèrement. Bien que les rendements d'extraction soient plus élevés pour les échantillons prélevés vers le haut du tronc, le taux de polyphénols est plus élevé dans les parties basses du tronc du fait de teneurs moins marquées en polysaccharides. Par conséquent, l'écorce plus mature, qui est plus présente en bas du tronc, a tendance à avoir une plus grande proportion de composés phénoliques que l'écorce plus jeune, qui, elle, contient une plus grande proportion de sucres. Cette étude met donc en évidence la nécessité d'étudier la composition des extraits d'écorce non seulement quantitativement, mais également qualitativement, en termes de composition chimique afin d'exploiter plus efficacement l'écorce.

Pauline GÉRARDIN – Clément FRITSCH –
Sylvain COSGUN – Maree BRENNAN –
Stéphane DUMARÇAY – Philippe GÉRARDIN

Université de Lorraine, INRAE, LERMAB
Faculté des Sciences et Technologies
Boulevard des Aiguillettes
BP 70239

F-54506 VANDŒUVRE-LÈS-NANCY CEDEX
(auteur correspondant : philippe.gerardin@univ-lorraine.fr)

Francis COLIN

Université de Lorraine, AgroParisTech, INRAE, SILVA
INRAE Grand Est - Nancy
Route d'Amance
F-54280 CHAMPENOUX

Remerciements

Les auteurs remercient chaleureusement Antoine Billard, Rodolphe Bauer, Fleur Longuetaud et Frédéric Mothe qui ont géré l'échantillonnage des arbres et Adrien Contini pour son soutien technique. Merci également à l'ONF (Office national des forêts) qui a fourni le matériel de la forêt de Saint-Prix. L'UMR 1434 Silva et l'UR 4370 LERMAB sont soutenues par une subvention de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du programme "Investissements d'Avenir" (ANR-11-LABX-0002-01, Labo d'Excellence ARBRE) dans le cadre du projet "BARK-TAN-BIO" inclus dans un projet plus large "EXTRAFORREST" soutenu par le ministère de l'Agriculture, le FEDER-Lorraine, l'ADEME et la Région Grand Est.

BIBLIOGRAPHIE

- BIANCHI S., GLOESS AN., KROSLAKOVA I. *et al.*, 2014. Analysis of the structure of condensed tannins in water extracts from bark tissues of Norway spruce (*Picea abies* [karst.]) and silver fir (*Abies alba* [Mill.]) using MALDI-TOF mass spectrometry. [Analyse de la structure de tannins condensés dans les extraits aqueux de l'écorce de l'Épicéa commun (*Picea abies*) et du Sapin blanc (*Abies alba*) par spectrométrie de masse MALDI-TOF]. *Industrial Crops and Products*, 61, pp. 430-437.
- BRENNAN M., FRITSCH C., COSGUN S., DUMARÇAY S., COLIN F., GÉRARDIN P., 2019. Extraforest. *Abies alba* bark polyphenols. V1. Harvard Dataverse. [Dataset]. <https://doi.org/10.7910/DVN/8C37D>
- BRENNAN M., FRITSCH C., COSGUN S., DUMARÇAY S., COLIN F., GÉRARDIN P., 2020a. Quantitative and qualitative composition of bark polyphenols changes longitudinally with bark maturity in *Abies alba* Mill. [Composition quantitative et qualitative des polyphénols présents dans les écorces d'*Abies alba* Mill. en fonction de leur maturité]. *Annals of Forest Sciences*, 77, Article number: 9.
- BRENNAN M., FRITSCH C., COSGUN S., DUMARÇAY S., COLIN F., GÉRARDIN P., 2020b. Yield and compositions of bark phenolic extractives from three commercially significant softwoods show intra- and inter-specific variation. [Variations intra et interspécifiques des rendements et compositions des extraits phénoliques de l'écorce de trois résineux d'importance commerciale]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, pp. 346-356.
- BRENNAN M., HENTGES D., COSGUN S., DUMARÇAY S., COLIN F., GÉRARDIN C., GÉRARDIN P., 2021. Intraspecific variability of quantity and chemical composition of ethanolic knotwood extracts along the stems of three industrially important softwood species: *Abies alba*, *Picea abies* and *Pseudotsuga menziesii*. [Variabilité intraspécifique de la quantité et de la composition chimique d'extraits éthanoliques de nœuds le long de l'arbre chez trois espèces : *Abies alba*, *Picea abies* et *Pseudotsuga menziesii*]. *Holzforschung*, 75(2), pp. 168-179.
- JABLONSKY M., NOSALOVA J., SLADKOVA A. *et al.*, 2017. Valorisation of softwood bark through extraction of utilizable chemicals. A review [Valorisation de l'écorce de résineux par extraction de produits chimiques]. *Biotechnology advances*, 35(6), pp. 726-750.
- KAVITHA V.U., KANDASUBRAMANIAN B., 2020. Tannins for wastewater treatment. *SN Applied Sciences*, 2, Article number: 1081.
- KLEINER K., RAFFA K.F., DICKSON R.E., 1999. Partitioning of ¹⁴C-labeled photosynthate to allelochemicals and primary metabolites in source and sink leaves of aspen: evidence for secondary metabolite turnover. *Oecologia*, 119(3), pp. 408-418.

- KREKLING T., FRANCESCHI V.R., BERRYMAN A.A., CHRISTIANSEN E., 2000. The structure and development of polyphenolic parenchyma cells in Norway spruce (*Picea abies*) bark. [Structure et développement des cellules du parenchyme polyphénolique dans l'écorce de l'Épicéa commun (*Picea abies*)]. *Flora*, 195(4), pp. 354-369.
- LI S.H., NAGY N.E., HAMMERBACHER A., KROKENE P., NIU X.M., GERSHENZON J., SCHNEIDER B., 2012. Localization of phenolics in phloem parenchyma cells of Norway spruce (*Picea abies*). [Localisation des composés phénoliques dans les cellules du parenchyme du phloème de l'Épicéa commun (*Picea abies*)]. *ChemBioChem*, 13(18), pp. 2707-2713.
- OSTOLSKI M., ADAMCZAK M., BRZozowski B., WICKZOWSKI W., 2021. Antioxidant Activity and Chemical Characteristics of Supercritical CO₂ and Water Extracts from Willow and Poplar. [Activité antioxydante et caractérisation chimique d'extraits de Saule et de Peuplier à l'eau et au CO₂ supercritique]. *Molecules*, 26(3), 545.
- PIZZI A., STEPHANOU A., 1994. Fast vs. slow-reacting non-modified tannin extracts for exterior particleboard adhesives. [Extraits de tannins non modifiés à réaction rapide VS réaction lente pour les adhésifs extérieurs]. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 52(4), pp. 218-222.
- STRINGER J.W., OLSON J.R., 2007. Radial and vertical variation in stem properties of juvenile black locust (*Robinia pseudoacacia*). [Variation radiale et verticale des propriétés de la tige chez le Robinier pseudoacacia]. *Wood and Fiber Science*, 19(1), pp. 59-67.
- TAVCAR BENKOVIC E., GROHAR T., ZIGON D., SVAJGER U., JANES D., KREFT S., STRUKELJ B., 2014. Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract, Abigenol® and its antioxidant activity. [Composition chimique de l'extrait d'écorce de Sapin blanc (*Abies alba*), l'Abigenol® et son activité antioxydante]. *Industrial Crops and Products*, 52, pp. 23-28.

EFFET DE LA HAUTEUR DE PRÉLÈVEMENT SUR LA COMPOSITION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES POLYPHÉNOLS DE L'ÉCORCE D'*ABIES ALBA* MILL. (Résumé)

L'écorce de résineux, cultivés dans un but commercial, est une source potentielle précieuse de métabolites secondaires tels que les polyphénols. Les tannins, qui font partie des polyphénols présents dans l'écorce, sont utilisés dans la fabrication d'adhésifs et de résines, mais également en tant qu'agent de tannage, antibactérien, antifongique, antitermite et antioxydant. Peu d'informations existent à propos du rendement et de la composition des extraits d'écorce en fonction de la hauteur de l'échantillon prélevé dans le tronc ainsi qu'en fonction de la présence ou l'absence de branches. Cette étude a pour but d'examiner la variabilité des métabolites secondaires présents dans l'écorce d'*Abies alba* à la fois en fonction de la hauteur de l'échantillon prélevé dans un arbre, mais également la variabilité présente à des hauteurs spécifiques entre plusieurs arbres. La finalité de cette étude est de déterminer quelle fraction d'écorce contient le plus d'extractibles chez cette essence. Pour cela, huit arbres ont été sélectionnés dans lesquels un maximum de treize disques a été coupé tout le long du tronc. Ces échantillons ont été prélevés en bas du tronc à une hauteur de 30 cm du sol puis à différentes hauteurs. Ces différentes hauteurs ont été choisies pour des raisons industrielles (hauteur limite pour le bois d'œuvre ou pour l'utilisation industrielle) mais également pour des raisons physiologiques (hauteur à la base du houppier, hauteur de la première branche verte...). Les échantillons prélevés ont été broyés puis extraits avec un mélange eau/éthanol (1 :1, v/v) en réalisant une extraction accélérée à chaud et sous pression. Une première étude quantitative est réalisée pour connaître la quantité d'extractibles totale présente dans l'écorce. La seconde étude est qualitative, afin de connaître quels types d'extractibles sont présents dans ces écorces. Ces extraits ont donc été examinés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre UV-visible et un spectromètre de masse. Les résultats ont montré que la composition de l'extrait total d'écorce augmente en même temps que la hauteur dans le tronc. La proportion la plus élevée en composés polyphénoliques se trouve dans la section inférieure sous la couronne.

EFFECT OF SAMPLING HEIGHT ON THE QUANTITATIVE AND QUALITATIVE COMPOSITION OF *ABIES ALBA* BARK POLYPHENOLS (Abstract)

The bark of coniferous trees grown for a commercial purpose is a potential precious source of secondary metabolites such as polyphenols. Tannins are among the polyphenols found in the bark. They are used to manufacture adhesives and resins, but also as tanning agents, antibacterial agents, antifungal agents, anti-termite agents and antioxidants. Little information is available on the yield and composition of bark extracts depending on the height at which samples are taken from the trunk and on the presence or absence of branches. The present study examines the variability of the secondary metabolites present in *Abies alba* bark depending on sampling height on the tree, but also on variability at specific heights among several trees. The aim of the study was to determine which bark fraction contained the greatest quantity of extractible compounds in this species. To this end, eight trees were selected, and a maximum of thirteen discs was cut out along each trunk. The samples were taken down the trunk (30 cm from the ground) and then at different heights. The heights were chosen based on industrial criteria (maximum height for lumber production of for industrial use), but also on physiological parameters (e.g. height at the base of the crown, height of the first green branch). The samples were ground, and then polyphenols were extracted with water/ethanol (1:1, v/v) in fast extraction conditions at high temperature and under high pressure. A first – quantitative – study was carried out to determine the total quantities of extractables present in the bark. The second study was qualitative, and aimed at determining which types of extractables were present in the barks. The extracts were analysed by liquid chromatography coupled to a UV-visible spectrometer and a mass spectrometer. The results showed that the quantity of compounds in the total bark extracts increased proportionally to sampling height. The highest proportion of polyphenols was found in the section below the crown.



Licence Creative Commons

Attribution + Pas de Modification + Pas d'Utilisation Commerciale (BY ND NC)