ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

RP2E

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences du bois et des fibres

Zineb KEBBI-BENKEDER

Soutenue le 03 décembre 2015

Biodiversité interspécifique et intraspécifique des extractibles nodaux

Directeur de thèse : **Philippe GÉRARDIN**
Co-encadrement de la thèse : **Francis COLIN et Stéphane DUMARÇAY**

Jury

Mme Marie-Pierre LABORIE, Professeur, Université de Freiburg (Allemagne)	Rapporteur
M. Christian JAY-ALLEMAND, Professeur, Université Montpellier II	Rapporteur
Mme Marie-France THEVENON, HDR, CIRAD Montpellier	Examinateur
M. Stéphane DUMARCAY, HDR, Université de Lorraine	Examinateur
M. Francis COLIN, HDR, INRA Centre Nancy-Lorraine	Examinateur
M. Philippe GERARDIN, Professeur, Université de Lorraine	Examinateur
Mme Phila Raharivelomanana, Professeur, Université de la Polynésie Française	Invitée

AgroParisTech
Laboratoire d'Etude des Ressources FOrêt-Bois (Lerfob) UMR 1092 AgroParisTech – INRA
Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois (Lermab) EA 4370 Université de Lorraine
Route d'Amance. 54280 Champenoux

Zineb Kebbi Benkeder

Biodiversité interspécifique et intraspécifique des extractibles nodaux

A jeddi Mouhamed, mon grand-père

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : Pr. Marie-Pierre Laborie, Dr. Marie-France Thévenon et Pr. Christian Jay-Allemand pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Mes remerciements les plus sincères sont adressés à Philippe Gérardin, Francis Colin et Stéphane Dumarçay d'avoir proposé ce sujet de thèse original au concours « Contrat Jeune Scientifique » de l'INRA et d'avoir fait confiance au jury de sélection que je remercie également. Je tiens à remercier particulièrement Erwin Dreyer, président du Centre INRA Nancy – Lorraine qui a présidé le jury et qui a suivi personnellement la progression de ma thèse.

Je remercie Francis pour sa disponibilité, sa réactivité et son investissement tout au long de ces trois années, et qui n'a pas ménagé ses efforts particulièrement à la fin de la thèse. Je suis reconnaissante envers Stéphane pour sa disponibilité et sa patience face à mes incessantes questions chimiques, informatiques et bien d'autres lorsque j'étais en désarroi devant la GC-MS, mon ordinateur ou encore ma voiture. Mes considérations sont adressées à Philippe pour avoir initié ce projet stimulant et enrichissant pendant lequel j'ai pu traiter plusieurs aspects depuis la forêt jusqu'à la chimie, en passant par la biologie végétale.

Je n'aurais certainement pas obtenu les résultats présentés au terme de ma thèse sans la générosité des nombreux fournisseurs des essences étudiées. Que soient remerciés l'INRA, l'ONF, l'IRSTEA et la Pépinière Adam. Lors de ces trois années, ce sont trente-huit arbres qui ont été abattus. Quatre à quatorze rondelles par arbre ont été sciées et découpées pour prélever un à six nœuds par rondelle. Evidemment je n'aurais jamais pu faire ce travail moi-même. Je suis extrêmement reconnaissante envers Bruno Garnier et Loïc Dailly pour leur rigueur et leur disponibilité pour prélever les nœuds à l'état frais malgré leur emploi du temps chargé en hiver. Mes remerciements s'adressent également aux personnes qui ont activement participé à la campagne d'échantillonnage des sapins à 900m d'altitude : Francis, Fleur Longuetaud, Fréderic Mothe, Philippe Jacquin, Charline Freyburger, Emmanuel Cornu et Marwen Fatnassi. Enfin, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé activement à mon travail et permis d'obtenir des résultats originaux : Ruben Manso pour la modélisation des extractibles nodaux des sapins, Nassim Touahri pour son investissement lors de son stage de M2, Aurélie Deroy et Eric Gelhaye du laboratoire « Interactions arbres-microorganismes » pour les tests biologiques, ainsi que Jana Dlhoua, Julien Ruelle, Meriem Fournier, Jean-Paul Charpentier et Mireille Cabané qui m'ont apporté des réponses et des éléments de discussion m'ayant permis de progresser.

Mes plus sincères remerciements sont adressés à toutes les personnes qui ont toujours été disponibles pour répondre à mes questions administratives et techniques toujours avec un sourire rassurant : Nathalie Morel, Hélène Hurpeau, Virginie Friley, Elodie Taillefumier, Michelle Besançon, Nicolas Houssemont, Daniel Rittié, Fréderic Bordat, Sandrine Gigleux, Corinne Martin, Corinne Courtehoux, Etienne Farré, Alain Mercanti, Pierre Gelhaye, Anthony Chaumet, Maryline Harroué, David Gasperotto, Sylvier Geller.

Je remercie les stagiaires, les doctorants et les post-doctorants que j'ai rencontrés pendant ces trois années passées au Lermab et au Lerfob pour leur bonne humeur et leur solidarité : Solafa pour m'avoir fait découvrir la cuisine syrienne, Masoumeh pour la cuisine iranienne, Aurélia pour son dynamisme et pour m'avoir redonné goût au sport, Estelle pour son extrême générosité et Jialin pour

m’avoir ménagée en fin de thèse. J’ai apprécié les précieux conseils de Thomas, Benoit, Mathieu et Jérémie et l’aide de François, Joel et Jean-Bosco lorsque j’étais en difficulté. Les parties de UNO n’auraient pas été si amusantes sans l’animation assurée par Thibaud, Anne, Christine et Géraldine. Je n’aurais certainement pas encore chaussé des skis sans Matthieu qui a initié le projet de week-end à Gérardmer ; par contre grâce à Marin je ne retournerai plus jamais au MacDonald. Je remercie Félix pour sa bienveillance envers son successeur CJS, Vivien pour m’avoir envoyé des articles dès qu’il s’agissait d’extractibles, Nicolas pour sa joie de vivre et les écologistes Raphael et Emilien pour leur intérêt pour mon sujet chimique. Je souhaite bonne continuation aux nouveaux : Lara, Lise, Adrien, Citra, Anjy et VanTho.

Je ne me serais certainement pas lancée en thèse sans les personnes qui m’ont donné goût à la recherche pendant ma formation à l’ENSTIB (école nationale supérieure des technologies et industries du bois) : Paola Navarrete, Caroline Rogaume, Jérome Lannon, Eric Masson, Emmanuel Fredon, Tony Pizzi, Alain Celzard et particulièrement Marie-Christine Trouy qui m’a aussi fourni les photos de plans ligneux, et surtout transmis l’appel à candidature pour ce sujet de thèse il y a trois ans et demi. Mais mon amour pour le bois remonte à ma tendre enfance lorsque je regardais « sagement » mon grand-père Mohamed travailler passionnément ce matériau.

Ma thèse est l’aboutissement d’une longue scolarité qui a débuté en Algérie et s’est poursuivie en France grâce à la décision de mes parents Hassina et Said de venir s’y installer pour nous offrir à mon frère Belkacem, à mes sœurs Yasmina et Sarah et à moi-même un meilleur avenir ; je les remercie pour les sacrifices qu’ils ont dû faire et les obstacles qu’ils ont surmontés. Je leur exprime ma sincère et éternelle gratitude pour leur éducation, les principes qu’ils m’ont transmis et leur générosité.

Je remercie Beka, Mina, Sarouche, Mouni, Yamina, Malika, toute ma famille et toutes les personnes que j’ai croisées pendant ces trois années pour leur bienveillance, leur amitié et leur soutien.

Enfin, je tiens à remercier Abdelaziz, mon mari, pour son appui et ses encouragements lorsque j’ai décidé de faire une thèse et parce qu’il a accepté de venir se confronter au climat lorrain. Sa capacité à relativiser les choses, sa patience et sa sérénité ont été d’un grand réconfort tout au long de ces trois dernières années, et particulièrement en fin de thèse.

Table des matières

Remerciements VII
Table des matières IX
Liste des figures XIII
Liste des productions scientifiques XVII
Liste des articles XVII
Liste des présentations orales et affichées XVII
Introduction 1
Objectifs de la thèse 5
Chapitre 1 Etat de l'art 9
1 Formation des branches et des nœuds 9
1.1 Caractéristiques morphologiques des branches 9
1.2 Croissance radiale du tronc et des branches 12
1.2.1 Le cambium 12
1.2.2 Formation d'un cerne d'accroissement 12
1.2.3. La formation du nœud 13
1.2.4. L'aubier et le duramen dans le tronc et les branches 14
1.2.5 Constitution de la paroi d'une cellule de bois 16
1.2.5.1 La cellulose 16
1.2.5.2 Les hémicelluloses 17
1.2.5.3 La lignine 18
1.3 Les différents types de bois 20
1.3.1 Le bois de résineux 20
1.3.2 Le bois de feuillus 21
1.3.3 Le bois des branches et des nœuds 22
1.3.4 Le bois de réaction 23
1.3.4.1 Le bois de compression 23
1.3.4.2 Le bois de tension 24
1.3.4.3 Le bois de réaction des branches et des nœuds 24
1.3.4.3.1 La fonction de soutien mécanique 25
1.3.4.3.2 La fonction hydraulique 26
2 Les extractibles dans le bois du tronc 27
2.1 Les familles d'extractibles 27

2.1.1 Les terpènes 27
2.1.2 Les phénols 30
2.1.2.1 Les lignanes 30
2.1.2.2 Les stilbènes 33
2.1.2.3 Les flavonoïdes 34
2.1.2.4 Les tanins 36
2.1.3 Les autres composés extractibles 37
2.2 Rôles des extractibles du bois 39
2.2.1 Durabilité du bois 39
2.2.1.1 Formation des extractibles : les réserves et les enzymes 39
2.2.1.2 Localisation des extractibles 41
2.2.1.3 Durabilité du bois conférée par les extractibles 41
2.2.1.4 Contribution biomécanique des extractibles 43
2.2.2 Formation des extractibles en réponse à une blessure 44
3 Les extractibles dans les nœuds et les branches 47
3.1 Fonction de défense des nœuds 47
3.2 Mise en place de la zone de protection de la branche 47
3.3 Composition chimique des nœuds et des branches 48
3.3.1 Les extractibles dans le duramen des branches 48
3.3.2 Les extractibles dans le duramen des nœuds 49
3.3.2.1 Variabilité inter-genres des extractibles nodaux 50
3.3.2.2 Variabilité inter-espèces des extractibles nodaux 52
3.3.2.3 Variabilité intra-arbre, inter-nœuds des extractibles nodaux 54
3.3.2.4 Variabilité intra-nœud des extractibles nodaux 55
3.3.3 Propriétés des extractibles des nœuds 56
Chapitre 2 Biodiversité interspécifique des extractibles nodaux 63
1 Introduction 63
2 Protocole expérimental 63
2.1 Echantillonnage des nœuds 63
2.2 Extraction des molécules 63
2.3 Identification et quantification des molécules 64
3 Résultats et discussion 65
3.1 Première campagne d'échantillonnage 65
3.1.1 L'extraction avec quatre solvants 66

3.1.1.1 Taux massiques d'extractibles dans les bois 66
3.1.1.2 Identification et quantification relative des molécules extraites..... 67
3.1.1.2.1 Identification des extractibles au dichlorométhane dans les bois des résineux.... 67
3.1.1.2.2 Identification des extractibles à l'acétone dans les bois des résineux..... 68
3.1.1.2.3 Identification des extractibles au dichlorométhane dans les bois des feuillus..... 71
3.1.1.2.4 Identification des extractibles à l'acétone dans les bois des feuillus..... 72
Article 1: Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species 74
3.1.2 L'extraction avec un seul solvant 83
3.2 Seconde campagne d'échantillonnage..... 84
3.2.1 Cas des résineux 86
3.2.1.1 Taux massiques d'extractibles dans les bois 86
3.2.1.2 Identification des extractibles au dichlorométhane dans les bois des résineux..... 87
3.2.1.3 Identification des extractibles à l'acétone dans les bois des résineux..... 89
3.2.2 Cas des feuillus 90
3.2.2.1 Taux massiques d'extractibles dans les bois 90
3.2.2.2 Identification des extractibles au dichlorométhane dans les bois des feuillus..... 91
3.2.2.3 Identification des extractibles à l'acétone dans les bois des feuillus..... 92
Article 2: Knotwoods of different wood species as potential sources of valuable natural phenolic compounds. 93
3.3 Effet de la variabilité interspécifique sur la toxicité des extractibles vis-à-vis de *Trametes versicolor* 93
Article 3: The GSTome reflects the chemical environment of white-rot fungi 94
4 Synthèse du chapitre 2 108
Chapitre 3 Biodiversité intraspécifique des extractibles nodaux..... 113
Article 4: Abies alba knot extractives: Variability according to silviculture, social status and position within the crown. 115
1 Abstract 115
2 Introduction..... 116
3 Material and methods..... 118
3.1 Field experiments data..... 118
3.2 Tree sample 120
3.3 Wood Material 122
3.4 Wood extraction and chromatographic analysis 122
3.5 Display of results and statistical analysis 123

4 Results 126
4.1 Knot extractives determination 126
4.1.1 Knot extractives in the living crown 126
4.1.2 Extractive concentrations in loose knots 126
4.2 Modelling the knot extractives in the living crown 127
4.3 Identification of the knot extractives 129
5 Discussion 130
5.1 About our methodology 130
5.2 About the occurrence of lignans in the fir knot extractives 130
5.3 About the within-tree variation 131
5.3.1 A conspicuous vertical profile of knot extractives in the living crown 131
5.3.2 High extractives content in the loose knots 132
5.4 About the between-tree variation: a silvicultural influence on knot extractives 133
5.4.1 Lessons from modelling 133
5.4.2 Between-plot variability 133
5.4.3 Within-plot variability 134
6 Conclusion and perspectives 135
Synthèse du chapitre 3 137
Conclusion générale et perspectives 141
Annexe A 151
Références bibliographiques 163
Résumé 187
Abstract 187

Liste des figures

Figure 1 : Illustration d'un nœud de pin sylvestre. 9
Figure 2 : Illustration de deux verticilles de branches. (Schéma : A. Benkeder) 10
Figure 3 : Un verticille de nœuds d'épicéa. 10
Figure 4 : Illustration d'un houppier trapu (à gauche) et d'un houppier réduit (à droite). (Schéma : A. Benkeder) 11
Figure 5 : Observation des étapes de différentiation des cellules chez le pin sylvestre. (Ph) phloème, (Cz) zone cambiale, (Ez) zone d'élargissement, (Lz) zone de lignification, (Mz) zone de maturation. (H. Cuny, Thèse 2013) 13
Figure 6 : Illustration de la portion adhérente et de la portion non adhérente d'un nœud d'épicéa. (Photo : F. Colin) 14
Figure 7 : Les différents tissus du tronc, exemple du Douglas. Grosser « Anatomie des Holzes » *In* Die Hölzer Mitteleuropas. Ein mikrophotographischer Lehratlas 1977, pp. 1-54, fig. 1. Reproduite avec l'aimable autorisation de Springer-Verlag, Heidelberg 15
Figure 8 : Motif de base de la cellulose : la cellobiose. 17
Figure 9 : Structure partielle de glucuronoxylanes de feuillus. 17
Figure 10 : Structure partielle d'arabinoglucuronoxylanes de résineux. 18
Figure 11 : Les monolignols de la lignine. 18
Figure 12 : Structure partielle de la lignine d'épicéa selon Adler. Adler « Lignin chemistry—past, present and future » *In* Wood Science and Technology, 11(3) 1977, pp. 169-218, fig. 30. Reproduite avec l'aimable autorisation de Springer-Verlag, Heidelberg. 19
Figure 13 : Structure de la paroi cellulaire et spécificité des lignines dans les différentes parties. Davin and Lewis « Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis » *In* Plant Physiology, 123(2) 2000, pp. 453-461, fig. 8. Reproduite avec l'aimable autorisation de American Society of Plant Biologists, Rockville MD. 20
Figure 14 : Exemple d'un plan ligneux de résineux : le mélèze du Japon. Hiroshi Saiki (1982) « The structure of domestic and imported woods in Japan - An atlas of scanning electron micrographs », fig. 7-1, p. 26. Reproduite avec l'aimable autorisation de Japan Forest Technologyl Association 21
Figure 15 : Exemple de plan ligneux de feuillus : le chêne du Japon. Hiroshi Saiki (1982) « The structure of domestic and imported woods in Japan - An atlas of scanning electron micrographs », fig. 29-1, p. 74. Reproduite avec l'aimable autorisation de Japan Forest Technology Association 22
Figure 16 : Eléments de vaisseaux disposés en zigzag dans la zone de jonction tronc-branche chez le chêne pédonculé. André « Organisation vasculaire des angiospermes : une vision nouvelle » 2002, fig. 3.1C – 3.1D, p.68. Reproduites avec l'aimable autorisation de INRA, Paris. 23
Figure 17 : Coupes transversales du bois de compression (à gauche) et du bois opposé (à droite) chez l'épicéa. M.-C. Trouy « Anatomie du bois, Formation, fonctions et identification » 2015, fig. 2-45, planche 6. Reproduite avec l'aimable autorisation de INRA, Paris 24
Figure 18 : Coupes transversales du bois de tension (à gauche) et du bois opposé (à droite) chez le peuplier. M.-C. Trouy « Anatomie du bois, Formation, fonctions et identification » 2015, fig. 2-46, planche 6. Reproduite avec l'aimable autorisation de INRA, Paris 24
Figure 19 : Exemple de terpènes répartis selon les différents groupes. 29
Figure 20 : Exemple de phénols simples. 30
Figure 21 : Alcool dehydrodiconiféryle. 30
Figure 22 : Exemple de lignanes. 32

Figure 23 : Exemple de norlignanes. 33
Figure 24 : Exemple de stilbènes. 34
Figure 25 : Structure de base des flavonoïdes. 34
Figure 26 : Exemple de flavonoïdes. 36
Figure 27 : L'acide gallique (à gauche) et l'acide ellagique (à droite). 37
Figure 28 : La castalagine. 37
Figure 29 : Structure de base des tanins condensés. 37
Figure 30 : Exemple de corps gras. 38
Figure 31 : Structure partielle de l'arabinogalactane du mélèze. 39
Figure 32 : Interaction entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Gershenzon and Engelberth « Secondary metabolites and plant defense » *In* Taiz and Zeiger (eds.) of Plant physiology, 5th edition, pp. 369-399, fig. 13.1. Reproduite avec l'aimable autorisation de Sinauer Associates, Sunderland MA 40
Figure 33 : Coupes longitudinale (a) et transversales (b-d) d'une zone de compartimentalisation d'une infection. Les différentes barrières (wall 1-4) délimitent la zone. Pearce « Antimicrobial defences in the wood of living trees » *In* New phytologist, 132(2) 1996, pp. 203-233, fig. 1. Reproduite avec l'aimable autorisation de Wiley-Blackwell, Hoboken NJ 45
Figure 34 : Décoloration de l'aubier suite à la mort des branches chez le mélèze. 47
Figure 35 : Zone de protection de la branche encerclée en rouge chez le sapin de Klein « Verkienung von Ästen am Beispiel der Weisstanne - Beobachtungen und Schlussfolgerungen » *In* Allgemeine forst- und jagdzeitung, 163(10) 1992, pp. 182-187, fig. 4. Reproduite avec l'aimable autorisation de J. D. Sauerländers Verlag, Bad Orb. 48
Chez l'épicéa et le chêne de VonAufsess « Some examples of wood discolorations related to mechanisms for potential protection of living trees against fungal attack » *In* IAWA Bulletin, 5(2) 1984, pp. 133-138, figs 1.a, 2.a. Reproduites avec m'aimable autorisation de Brill, Leiden 48
Figure 36 : Illustration de la diminution radiale de la concentration des lignanes ($mg.g^{-1}$) en fonction de la distance (cm) depuis la moelle du nœud de l'épicéa. Willför, Sundberg, Rehn, Holmbom, Saranpää «Distribution of lignans in knots and adjacent stemwood of Picea abies » *In* Holz als Roh- und Werkstoff, 63(5) 2005, pp. 353-357, fig. 2. Reproduite avec l'aimable autorisation de Springer, Heidelberg 55
Figure 37 : Illustration de la diminution longitudinale de la concentration des lignanes (mg.g-1) dans les nœuds de l'épicéa en fonction de la distance (cm) depuis la base du nœud située à 6-7 cm de profondeur). Le bois de compression (triangles) contient moins de lignanes que le bois opposé (losanges) et le bois de côté (carré). Willför, Hemming, Reunanen, Eckerman, Holmbom « Lignans and Lipophilic Extractives in Norway Spruce Knots and Stemwood » *In* Holzforschung, 57(1) 2003, pp. 27-36, figs. 1, 3. Reproduites avec l'aimable autorisation de De Gruyter, Berlin 56
Figure 38 : Taux massiques d'extractibles dans les nœuds, le duramen et l'aubier de douze essences forestières. 66
Figure 39 : Principales familles de composés extraits des résineux par le dichlorométhane et leurs proportions relatives. 67
Figure 40 : Principales familles de composés extraits des résineux par l'acétone et leurs proportions relatives. 68
Figure 41 : Principales molécules extraites des résineux. 70
Figure 42 : Principales familles de composés extraits des feuillus par le dichlorométhane et leurs proportions relatives. 71

Figure 43 : Principales familles de composés extraits des feuillus par l'acétone et leurs proportions relatives. 72
Figure 44 : Les principaux flavonoïdes identifiés dans les feuillus. 74
Figure 45 : Comparaison des taux d'extraits nodaux obtenus en une seule extraction utilisant l'acétone ou un mélange toluène/éthanol avec ceux obtenus en utilisant successivement plusieurs solvants de polarité croissante. 83
Figure 46 : Taux massiques d'extractibles dans les nœuds, le duramen et l'aubier des résineux. 86
Figure 47 : Principales familles de composés extraits des résineux par le dichlorométhane et leurs proportions relatives. 87
Figure 48 : Principales familles de composés extraits des résineux par l'acétone et leurs proportions relatives. 89
Figure 49 : Norlignane et lignanes détectés dans les résineux. 90
Figure 50 : Taux massiques d'extractibles dans les nœuds, le duramen et l'aubier des essences feuillues. 90
Figure 51 : Principales familles de composés extraits des feuillus par le dichlorométhane et leurs proportions relatives. 91
Figure 52 : Principales familles de composés extraits des feuillus par l'acétone et leurs proportions relatives. 92
Figure 53 : Concentrations of acetone extracts (left), hexane extracts (centre) and xD (right) versus the depth inside crown (DINC). Data collected in discs above the base of the crown (CB) are in dots while those below CB are in circles. 126
Figure 54 : Concentrations of acetone extracts in a) and hexane extracts in b) in the loose part and tight part of the knots which exhibit both parts. 127
Figure 55 : Predictions (mean and standard deviation of the mean) of concentrations in hexane extracts (left curve), acetone extracts (centre curve) and of xD (right curve) versus DINC for a co-dominant tree from the control stand C2.2 (a); for a dominant tree from the medium schedule M1.1 (b); for a dominant tree from the dynamic schedule S1.2 (c). 129

Liste des productions scientifiques

Liste des articles

Article1: Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin (2015) Annals of Forest Science 72:277-284.

Article 2: Knotwoods of different wood species as potential sources of valuable natural phenolic compounds. Z. Kebbi-Benkeder, N. Touahri, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin. Industrial Crops and Products. En preparation.

Article 3: The GSTome reflects the chemical environment of white-rot fungi. A. Deroy, F. Saiag, Z. Kebbi-Benkeder, N. Touahri, A. Hecker, M. Morel-Rouhier, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin, E. Gelhaye (2015) PLoSONE 10:1-13.

Article 4: Abies alba knot extractives: Variability according to silviculture, social status and position within the crown. Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, R. Manso, M. Fortin, S. Dumarçay, P. Gérardin. Forest Ecology and Management. En préparation.

Liste des présentations orales et affichées

Biodiversité interspécifique des extractibles nodaux. Z. Kebbi-Benkeder, N. Touahri, A. Deroy, E. Gelhaye, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin, GDR Bois 4 – 6 Novembre 2015, Clermont-Ferrand, France. (Poster avec flash-talk).

La sylviculture contrôle – t – elle la quantité de composés chimiques extractibles présents dans les nœuds ? Cas du sapin pectiné. Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin. REGEFOR 15 -17 Juin 2015, Nancy, France. (Poster avec présentation orale).

Valuable phenolic derivatives from knotwood of various tree species. Z. Kebbi-Benkeder, N. Touahri, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin, MESMAP 22-25 Avril 2015, Antalya, Turquie. (Poster).

Les extractibles dans les nœuds des arbres, quel avenir ? Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin. Séminaire annuel de l'école doctorale RP2E. 15 Janvier 2015, Nancy, France. (Présentation orale).

Variabilité intra-arbre des extractibles nodaux chez le sapin pectiné. Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin, GDR Bois 12-14 Novembre 2014, Nancy, France. (Poster).

Extractibles présents dans les nœuds de douze essences forestières françaises. Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin., GDR Bois 19-21 November 2013, Champs sur Marne, France. (Poster)

Secondary metabolites present in the knots of different tree species. Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, S. Dumarçay, P. Gérardin. Colloque WoodChem. 26 – 27 Septembre 2013, Nancy, France. (Présentation orale)

Introduction

Introduction

La forêt mondiale couvre un tiers des terres émergées (environ 4 milliards d'hectares) et constitue le principal réservoir de biodiversité de la planète (FAO 2014). Les services rendus par la forêt sont nombreux et continueront à être essentiels. Le principal service correspond à leur rôle dans l'atténuation du changement climatique. Le fonctionnement des forêts, essentiellement à travers les arbres qui les constituent, a un impact environnemental fondamental en participant et en régulant le cycle de l'eau et celui des éléments chimiques tels que l'azote, le phosphore et surtout le carbone (Suty, 2015). Créatrice d'emplois, la forêt joue également un rôle socio-économique et culturel important servant d'abris pour les populations, de lieux spirituels, de sources de nourriture, de matériaux et d'énergie.

Les végétaux en général, et les arbres en particulier, sont des organismes vivants remarquables en ce sens qu'ils survivent dans leur environnement où ils doivent assurer eux-mêmes leur nutrition, leur défense et donc leur longévité. Ce caractère autotrophe les a contraints à mettre en place et faire évoluer des mécanismes sophistiqués de défense. Ce sont les métabolites secondaires qui remplissent ce rôle de protection qui sera détaillé par la suite. Par ailleurs, ces métabolites secondaires sont également responsables de l'attraction des pollinisateurs et des disperseurs de graines et de la communication entre les plantes ou avec leurs symbiotes. La communication entre les plantes a été mise en évidence par une expérimentation avec des peupliers (Baldwin and Schultz, 1983) montrant que ces derniers relarguaient environ 1/5 du CO_2 fixé sous forme de volatiles pour la signalisation chimique (Baldwin, 2010). Plusieurs définitions existent pour définir un métabolite secondaire. Souvent ces définitions mettent les métabolites secondaires en opposition avec les métabolites primaires pour les désigner :

> Ce sont des molécules synthétisées dans un second temps après la mise en place de la structure primaire du végétal avec la matrice ligno-cellulosique.
>
> Ce sont des molécules simples de faible poids moléculaire par opposition aux polymères ligno-cellulosiques.
>
> Ce sont des molécules intervenant à un faible pourcentage dans la composition chimique du végétal (de l'ordre de 10 %) par opposition aux métabolites primaires qui représentent jusqu'à 90 % de la composition chimique.
>
> Ce sont des molécules appartenant à des familles chimiques très diverses et aux propriétés et rôles dans le végétal tout aussi vastes et non encore élucidés dans leur globalité.

> Ce sont des molécules qui varient en nature et en quantité d'un genre à un autre, d'une espèce à une autre, et même à l'intérieur d'un même individu par opposition aux métabolites primaires qui sont présents chez tous les végétaux.

Ces définitions laissent penser que ces métabolites secondaires ne sont pas primordiaux pour la croissance du végétal. Ces métabolites secondaires ont longtemps été considérés comme les déchets du métabolisme primaire de la plante. En 1998, Obst a soulevé la question de l'intérêt pour l'arbre de dépenser tant d'énergie pour synthétiser des composés dont il n'aurait pas besoin. Obst est convaincu de la pertinence de désigner ces composés par « métabolites spéciaux » comme l'a suggéré Gottlieb en 1990. Ce dernier parle du métabolisme général qui génère les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides. Le métabolisme spécial, quant à lui, empreinte les voies shikimique et benzylisoquinoline.

Les métabolites secondaires du bois sont communément appelés extractibles car ils sont facilement extraits par des solvants aqueux ou organiques, sans nécessiter des traitements chimiques lourds (hydrolyses acides ou basiques). Cette facilité pour les récupérer résulte de leur localisation dans le bois, à savoir dans les lumens des cellules ou dans la paroi cellulaire avec laquelle ces composés n'établissent pas de liaisons covalentes. Ces extractibles sont importants puisqu'ils confèrent au bois sa couleur, son odeur et sa durabilité naturelle. Ils sont également susceptibles d'influencer différents procédés de transformation du bois comme le séchage, l'usinage, le collage, l'application de finitions ou encore la production du papier.

La structure et la composition du bois ont permis d'inventer des produits très diversifiés. Du bois massif aux composés chimiques le constituant, l'Homme a peu à peu désassemblé ce matériau en blocs, en copeaux, en fibres et enfin en molécules pour fabriquer des produits qui répondent à ses besoins. La production de composés chimiques à partir du bois, tels que ceux produits dans le procédé Fischer Tropf, a été pratiquée à un niveau industriel avant d'être abandonnée, supplantée par la pétrochimie. Les extractibles ont des caractéristiques physico-chimiques intéressantes dans le domaine de la cosmétique, la parfumerie, la pharmaceutique, etc. Il existe de nombreux exemples de valorisation de ces composés chimiques (Hillis, 1986 ; Stevanovic and Perrin, 2008). Ainsi, le gemmage des pins permettait de récolter la résine dont les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les composants principaux de la térébenthine qui est la partie volatile de la résine. Les acides résiniques sont quant à eux les composés de la colophane, la partie non volatile de la résine. De même, les extraits diterpéniques, nommés taxanes, de l'if (*Taxus spp*) sont reconnus pour leur activité anticancéreuse ; ils sont commercialisés sous le nom Taxol®. Les diterpènes extraits du Ginkgo biloba sont aussi utilisés en pharmaceutique pour traiter des problèmes liés à l'asthme et à la

mauvaise circulation. Le latex est un polymère terpénique issu de *l'Hevea brasilienensis* blessé. Les tanins ont été utilisés pour tanner le cuir du fait de leur aptitude à précipiter le collagène en solution aqueuse, et ils sont utilisés dans le domaine vinicole. Les exemples pourraient être ainsi multipliés.

Le contexte socio-économico-environnemental actuel prône le recours à la chimie durable, à l'utilisation de matériaux peu polluants, au développement de bio-raffineries et de l'économie circulaire. L'exploitation forestière et les industries du bois ont plus que jamais un rôle à jouer pour réponde à ces nécessités de développement durable (Académie de l'agriculture, 2014 ; Pizzi, 2015 ; Turley et al., 2007). Par exemple, les sciures des scieries, autrefois considérées comme des déchets, sont récupérées pour fabriquer des granulés à destination des chaudières, un des moyens pour accroitre l'utilisation des énergies renouvelables. Guillemonat a publié « Le bois, matière première pour la chimie moderne » en 1942, mais au XXIème siècle, ce titre est plus que jamais d'actualité, où « chimie moderne » peut être remplacée par « chimie verte ». Ainsi, les tanins font l'objet de recherches pour les employer dans la fabrication de colles naturelles pour les panneaux de particules de bois à faible émission de composés organiques volatiles, ou pour la fabrication de mousses naturelles isolantes et ignifuges (Lacoste et al., 2015 ; Navarrete et al., 2013). Récemment, ce sont les nœuds des arbres, considérés comme le principal défaut du bois et éliminés lors du processus de mise en pâte, qui sont au cœur d'études visant à exploiter leur richesse en extractibles. Par exemple, il a été montré que les nœuds d'épicéa peuvent contenir jusqu'à 500 fois plus de lignanes que le bois du duramen (Willför et al., 2004a). Or ces lignanes, comme d'autres flavonoïdes et stilbènes quantifiés dans les nœuds, sont des composés phénoliques possédant des pouvoirs antioxydants particulièrement intéressants pour les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques (Cosentino et al., 2007 ; Eklund et al., 2005 ; Phelan et al., 2007 ; Willför et al., 2003c ; Yatkin et al., 2014).

Objectifs de la thèse

Le projet de cette thèse s'articule autour de l'analyse de la biodiversité interspécifique et intraspécifique des extractibles de nœuds de différentes essences forestières. Une telle analyse fournira un aperçu de la disponibilité des molécules d'intérêt en vue de potentielles valorisations industrielles en fonction de l'essence, de la position des nœuds dans l'arbre et des conditions de croissance de celui-ci. Parallèlement à la caractérisation de ces extractibles, la question de la formation et du rôle de ces derniers dans le bois de nœuds est également soulevée pour essayer de mieux comprendre les raisons de leur formation.

Ce manuscrit est constitué de quatre chapitres :

Le premier chapitre récapitule les éléments nécessaires à la compréhension de la formation des nœuds et de leurs caractéristiques anatomiques et chimiques. Puis la biosynthèse des extractibles et leurs rôles pour le bois sont détaillés. Enfin, l'état de l'art concernant spécifiquement les extractibles des nœuds termine ce chapitre bibliographique.

Le deuxième chapitre répond au besoin de caractériser la variabilité interspécifique des extractibles de nœuds. Elle présente un large spectre de molécules extraites du bois de nœud, mais également de l'aubier et du duramen de vingt-trois essences forestières : aulne, buis, cèdre de l'Atlas, charme, châtaignier, chêne pédonculé, chêne vert, cyprès chauve, douglas, épicéa, frêne, ginkgo biloba, hêtre, houx, if, mélèze, merisier, metasequoia, noyer, pin maritime, pin sylvestre, robinier, sapin. Ces extractions ont été réalisées par soxhlet avec quatre solvants de polarités croissantes et de manière successive pour solubiliser toutes les molécules lipophiles et hydrophiles. Ce sont ainsi 408 échantillons qui ont été extraits et analysés par chromatographie gaz couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) pour identifier les molécules qui ont été réparties en plusieurs familles chimiques : terpènes, lignanes, flavonoïdes, stilbènes, acides gras, sucres, etc. Puis, quatre-vingt-seize de ces échantillons ont été mis en contact avec les enzymes intracellulaires de *Tramestes versicolor* pour étudier l'interaction entre le champignon et les molécules présentes dans ces extraits.

Le troisième chapitre répond au besoin de caractériser les variabilités intraspécifique et intra-arbre des extractibles de nœuds. Le sapin blanc (*Abies alba*. L) a été choisi pour établir un profil vertical des concentrations d'extractibles nodaux en lien avec les conditions sylvicoles variables subies par les quinze sapins de cette étude. Ainsi, l'échantillonnage comprenait des arbres de trois statuts sociaux : dominés, co-dominants et dominants répartis selon trois densité de peuplement.

Le quatrième chapitre permet de discuter des raisons de la richesse des nœuds en extractibles. Toutefois, ces raisons restent des hypothèses étant donné le peu de littérature à ce propos. Les hypothèses évoquées servent aussi de perspectives pour de futures études à mener à ce sujet. Enfin des voies de valorisations des nœuds sont proposées en se basant sur les résultats détaillés dans les deux chapitres.

Chapitre 1 :

Etat de l'art

« If polysaccharides and lignins are the bones and flesh of woody tissue, it is the secondary metabolites that give wood plants their blood, soul and character », Obst, 1998.

Chapitre 1 Etat de l'art

1 Formation des branches et des nœuds

Les nœuds sont définis comme le prolongement des branches dans le tronc, ils sont donc invisibles lorsque l'arbre est sur pied. La limite entre le nœud et la branche qui le prolonge est communément placée au niveau de l'écorce de l'arbre sous la forme d'un bourrelet d'insertion (Figure 1). Cette limite est virtuelle puisque la branche est la continuité du nœud. De manière générale, les résineux ont bénéficié de plus d'études sur leurs branches et nœuds que les feuillus, en raison de la forme plus simple de ces derniers et de l'importance économique des conifères.

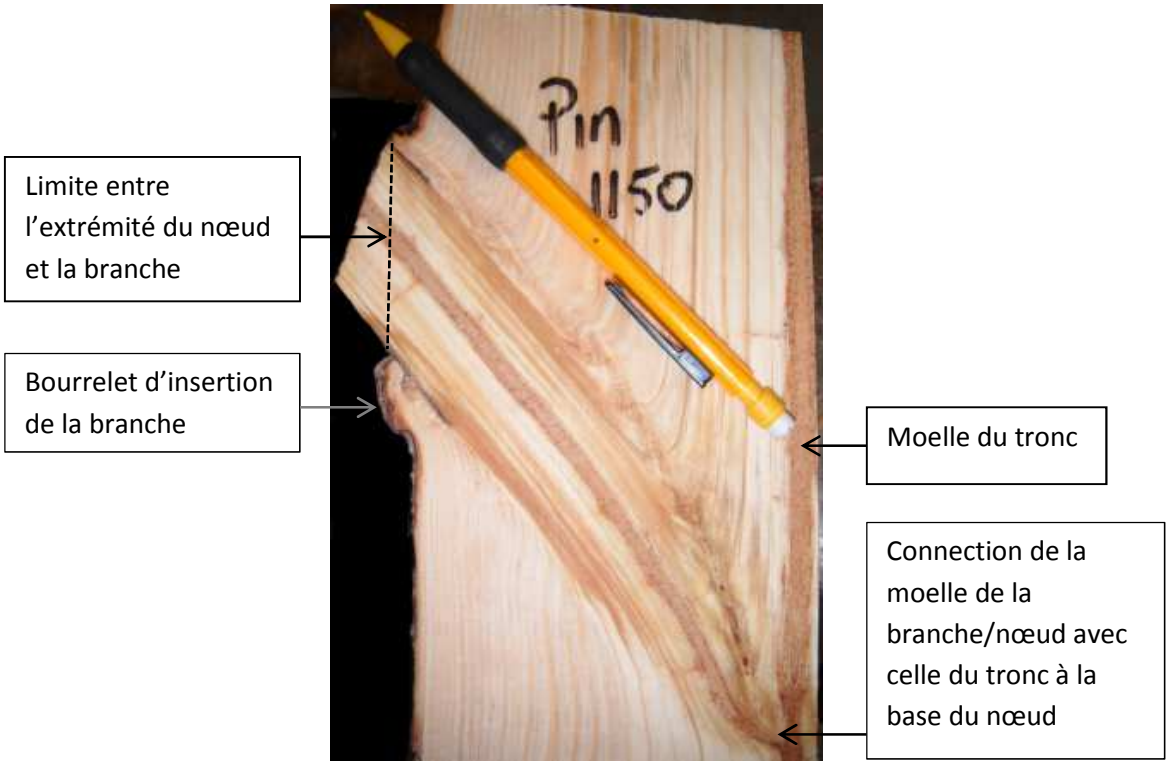


Figure 1 : Illustration d'un nœud de pin sylvestre.

1.1 Caractéristiques morphologiques des branches

La ramification des plantes est le processus permettant la formation de rameaux latéraux. Dans la suite, seuls les branches et les nœuds séquentiels seront évoqués (les nœuds des gourmands et des épicormiques ne seront pas abordés). Une branche séquentielle a pour origine un bourgeon axillaire se trouvant à l'aisselle d'une feuille et qui s'est développé l'année suivant sa mise en place. La branche ainsi formée est une tige feuillée dont la moelle est directement liée à la moelle du tronc (Figure 1). Les branches et donc les nœuds qui sont distribués à peu près dans le même plan transversal et en cercle autour de la moelle constituent un pseudo-verticille ou plus communément un verticille de branches/nœuds (Figures 2 et 3).

Les branches verticillaires sont celles qui ont été formées à partir des bourgeons déposés à la fin d'une unité de croissance (UC) ou d'une pousse annuelle (PA) par opposition aux branches interverticillaires formées à partir de bourgeons déposés entre deux limites de pousses annuelles.

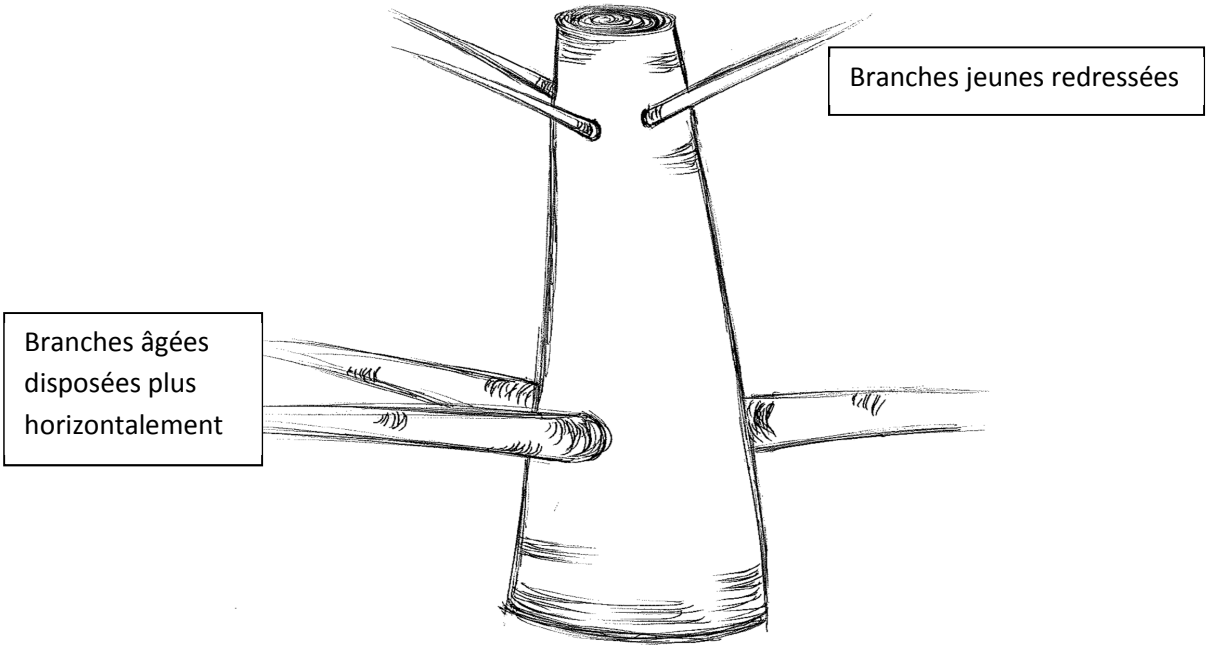


Figure 2 : Illustration de deux verticilles de branches. (Schéma : A. Benkeder)



Figure 3 : Un verticille de nœuds d'épicéa.

L'ensemble des branches vivantes d'un arbre forme le houppier vert (ou la couronne verte). Les branches sont le support des organes photosynthétiques et reproducteurs des arbres, et assurent aussi les fonctions hydrauliques et mécaniques tout en étant en compétition avec les branches du même arbre et celles des voisins ; il n'est donc pas possible pour l'arbre de s'en passer pour sa

croissance et sa survie. Ce sont les conditions de croissance qui déterminent les caractéristiques des branches. Ainsi, les besoins en lumière et espace créent des situations de compétition entre les houppiers d'arbres voisins et entre les branches d'un même arbre qui conditionnent leurs dimensions (longueur et largeur) et leur angle d'insertion dans le tronc (Hein et al., 2007, 2008; Lundqvist and Elfving, 2010; Spathelf, 2003). Par exemple, un arbre ayant poussé de manière isolée a de grosses branches surtout à la base du houppier qui est trapu (long et large) alors qu'un arbre issu d'un peuplement dense a un houppier réduit (court et étroit) avec des branches plus fines (Newton et al., 2012) (Figure 4). Ces caractéristiques morphologiques de la couronne reflètent l'acclimatation de l'arbre et de ses branches aux conditions environnementales.

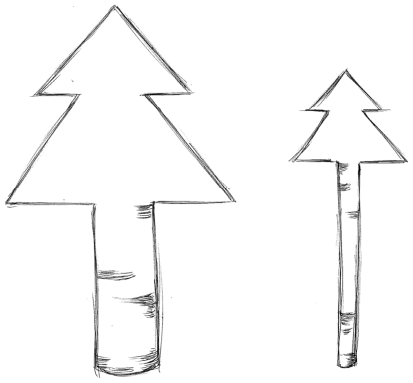


Figure 4 : Illustration d'un houppier trapu (à gauche) et d'un houppier réduit (à droite). (Schéma : A. Benkeder)

Les caractéristiques des branches déterminent celles des nœuds, du moins celles de l'extrémité des nœuds. Les branches situées dans la cime des arbres sont fines et redressées (Figure 2). Par conséquent, les nœuds connectés à ces branches ont une forme linéaire et un faible angle d'inclinaison par rapport au tronc (Duchateau et al., 2013). Puis le diamètre des branches et des nœuds augmente en se dirigeant vers la base du houppier pour atteindre un maximum vers les 2/3 de la longueur de la couronne vivante. Le diamètre se stabilise ou décroit légèrement au niveau de la base du houppier. Celle-ci est constituée par des branches âgées et plus chargées (rameaux, feuilles, fruits, vent, etc.) ; elles ont donc opéré un équilibrage de leur orientation pour satisfaire les fonctions hydraulique et mécanique. Ces branches sont plus rigides, les nœuds qui les maintiennent ont une forme courbée et sont orientés horizontalement (Courbet et al., 2012; Duchateau et al., 2013; Hein et al., 2007, 2008; Houllier et al., 1995; Kantola et al., 2007; Makinen et al., 2003). De plus, il semblerait que l'angle final qu'atteint une branche par rapport au tronc principal soit aussi contrôlé génétiquement (Fisher and Stevenson, 1981). Les branches en dessous du houppier déclinent soit naturellement par manque de lumière et de nutriments, soit parce qu'elles ont été coupées ou cassées (interventions sylvicoles, frottement avec les autres houppiers, vent, etc.). Dès lors, la

branche ne croit plus et meurt peu de temps après. Des microorganismes déjà présents sur la branche la dégradent progressivement depuis son extrémité jusqu'à sa base. Elle finit par disparaitre plus ou moins rapidement, c'est le phénomène d'élagage naturel.

1.2 Croissance radiale du tronc et des branches

La croissance des arbres est possible grâce aux apex se trouvant aux extrémités des tiges (tronc, branches et racines). La croissance en diamètre est quant à elle assurée essentiellement par un méristème secondaire latéral appelé cambium et situé sous l'écorce (Figure 5). En effet, il existe une autre assise génératrice dans l'écorce appelée phellogène formant le suber vers l'extérieur et du phelloderme vers l'intérieur. Seuls les végétaux pérennes et possédant une assise cambiale peuvent former du bois, encore appelé xylème secondaire. Les plus anciennes traces de début de formation du bois ont été identifiées sur un spécimen retrouvé en France dont la datation remonte à environ 407 millions d'années. Les auteurs soutiennent que le bois a été mis en place par ces plantes d'abord dans le but d'augmenter la conduction hydraulique (Gerrienne et al., 2011).

1.2.1 Le cambium

A chaque saison de végétation, le cambium forme, par divisions périclinales, du xylème secondaire vers l'intérieur (en direction de la moelle) et du phloème secondaire (liber) vers l'écorce ; d'où l'appellation « assise génératrice libéro-ligneuse » pour désigner le cambium (Figure 7). L'arbre possède un seul cambium durant toute sa vie. Les cellules initiales fusiformes, orientées longitudinalement, sont des cellules cambiales qui formeront le xylème (bois) ou le liber (phloème) par divisions cellulaires. Le cambium possède aussi des cellules initiales isodiamétriques, moins nombreuses que les précédentes, qui donneront naissance aux rayons ligneux ou libériens orientés radialement. La division cellulaire cambiale est initiée par des hormones (l'auxine, la cytokinine et les gibbérellines) qui contrôlent tout le cycle cellulaire. Les divisions périclinales permettent à l'arbre d'accroitre son diamètre alors que les divisions anticlinales lui permettent d'augmenter sa circonférence. C'est la croissance du xylème secondaire qui contribue le plus à la croissance radiale globale de l'arbre. En effet, les cellules de bois sont plus nombreuses et s'accumulent durant la vie de l'arbre contrairement aux cellules de phloème secondaire (Cuny and Rathgeber, 2014).

1.2.2 Formation d'un cerne d'accroissement

Lors de la division de la cellule cambiale fusiforme pour donner lieu à deux cellules filles, une cloison les séparant se met en place à partir de vésicules de l'appareil de Golgi, elle deviendra plus tard la membrane plasmique des cellules. Les vésicules continuent de fournir des précurseurs pour former la lamelle moyenne et la paroi primaire. Les cellules nouvellement formées dans la région cambiale entrent dans un processus de différentiation pour prendre leur forme finale (trachéides dans les résineux, fibres et vaisseaux dans les feuillus). D'abord la cellule subit un élargissement irréversible

par entrée d'eau et grossissement de la vacuole qui se remplit d'eau et de solutés. S'en suit alors le dépôt de la paroi secondaire constituée de trois couches S1, S2 et S3 disposées de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Figure 13). La lignification de l'ensemble (lamelle moyenne, parois primaire et secondaire) est l'ultime étape de cette différentiation cellulaire et qui confère à la paroi sa rigidité et son hydrophobicité (Figure 5). Finalement, la cellule se vide de son contenu lors de la mort cellulaire programmée et finit par former une cellule mature et fonctionnelle pour le soutien mécanique et le transport de la sève. L'ensemble des cellules formées lors d'une saison de végétation (du printemps à l'automne dans les régions tempérées) constitue un cerne annuel de croissance cylindrique qui s'accumule de manière concentrique. Pour les essences des régions tempérées, ces cernes sont visibles sur une coupe transversale (Figure 7).

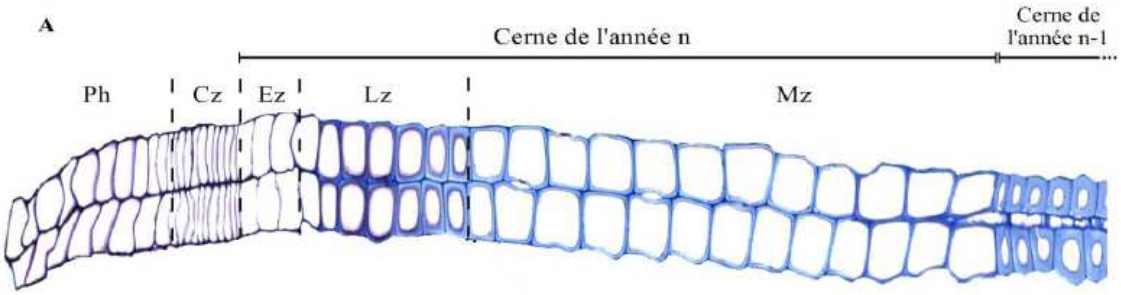


Figure 5 : Observation des étapes de différentiation des cellules chez le pin sylvestre. (Ph) phloème, (Cz) zone cambiale, (Ez) zone d'élargissement, (Lz) zone de lignification, (Mz) zone de maturation. (H. Cuny, Thèse 2013)

La croissance radiale du tronc englobe progressivement la base de la branche vivante, c'est ainsi que se met en place le nœud.

1.2.3. La formation du nœud

Le nœud se forme initialement par le prolongement des cernes du tronc par les cernes de la branche. Les limites supérieures et inférieures du nœud peuvent être tracées dans un plan radial-longitudinal en rejoignant les points de plus forte courbure des cernes du tronc se prolongeant dans les branches. Ce nœud, dit adhérent, est également souvent qualifié de jonction branche-tronc. Lorsque la branche meurt, elle ne forme plus de cernes de bois. Par conséquent, le cerne de bois du tronc n'est plus prolongé par un cerne dans la branche et la courbure mentionnée plus haut n'est plus présente. Une séparation nette se met en place entre le nœud et le tronc, parfois remplie d'écorce de la branche. Les cernes du tronc rencontrent cet espace pratiquement à angle droit, signe que la jonction avec la branche n'est plus assurée. Le nœud devient non adhérent (Figure 6). Il doit être précisé que cette partie non adhérente du nœud a été formée évidemment lorsque la branche était encore vivante mais la non-adhérence est apparue lorsque la branche est devenue morte.

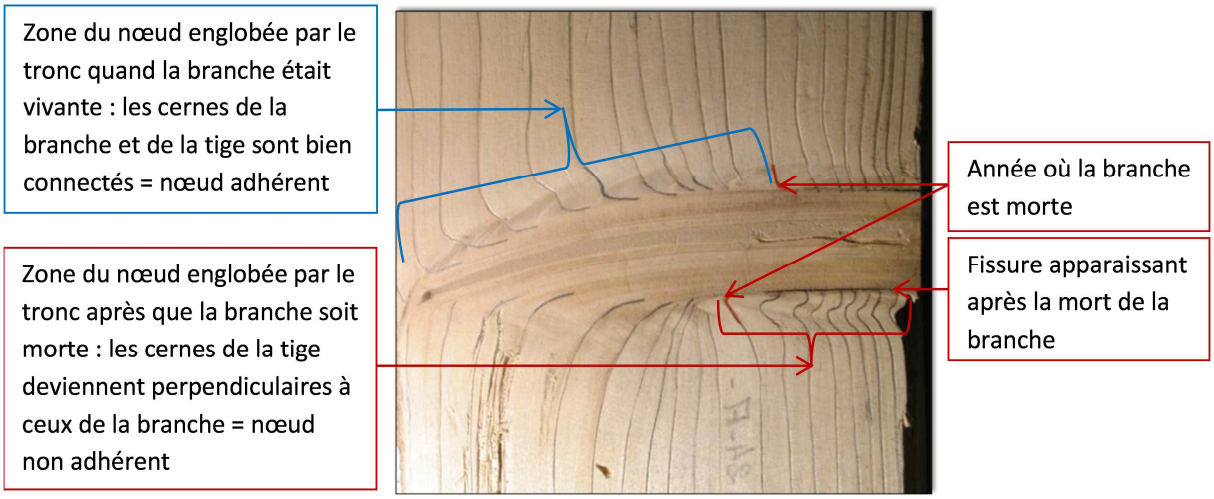


Figure 6 : Illustration de la portion adhérente et de la portion non adhérente d'un nœud d'épicéa. (Photo : F. Colin)

1.2.4. L'aubier et le duramen dans le tronc et les branches

Les cernes récents forment un anneau (souvent clair) en périphérie de la tige appelé aubier (Figure 7). Ce bois contient des cellules vivantes constituant le parenchyme qui sert au stockage de produits de réserves tels que l'amidon. Ce dernier rend l'aubier particulièrement vulnérable aux pathogènes. La partie la plus externe de l'aubier (les cernes les plus récents) sert au transport de la sève brute constituée d'eau et de nutriments depuis les racines jusqu'aux feuilles. Ce transport est possible grâce à l'évapotranspiration qui se produit au niveau des stomates des feuilles. En moyenne, un arbre pompe et rejette 350 litres d'eau en 24 heures (Suty, 2015). La sève élaborée (qui contient en plus les produits de la photosynthèse) circule par le phloème, et les rayons libériens et ligneux servent à la diriger radialement.

Les cernes se trouvant au centre de la tige sont les plus anciens et forment le duramen (ou bois parfait) dont les cellules de parenchyme sont mortes (Figure 7). La transformation de l'aubier en duramen est considérée comme la seconde différentiation du xylème se manifestant dans la zone de transition située à l'interface entre l'aubier et le duramen déjà formé. Cette transformation débute à la fin de l'été et se poursuit jusqu'au début de l'hiver (pour une revue voir Hillis, 1971; Magel, 2000; Taylor et al., 2002). Il s'agit d'un processus complexe impliquant plusieurs phénomènes physiologiques et aboutissant à la mort cellulaire du parenchyme. D'ailleurs, les cellules de parenchyme sont lignifiées dans cette zone de transition comme ultime étape de leur différentiation avant leur mort (Bergström, 2003; Zheng et al., 2014a, 2014b). Même si les liens et l'ordre chronologique entre ces évènements métaboliques, anatomiques et chimiques ne sont pas encore totalement élucidés, des propositions de déroulement ont été formulées. La déshydratation des cernes âgés de l'aubier, l'altération de la respiration des cellules de parenchyme sous l'action de

phytohormones, telle que l'éthylène sont des éléments déclencheurs de la sénescence du parenchyme (Huang et al., 2013; Nakada and Fukatsu, 2012; Nelson, 1978; Shain and Hillis, 1973a; Spicer and Holbrook, 2007).

La duraminisation se caractérise aussi par la fermeture des voies de circulation (les ponctuations) par embolie et la manifestation de la thylose (cellules de parenchyme se proliférant vers l'intérieur des vaisseaux chez les feuillus comme le chêne, le robinier et le châtaignier), ce qui rend le bois plus imperméable (Hillis, 1971; Magel, 2000; Taylor et al., 2002). L'évènement ultime lors de la duraminisation est la formation de composés bioactifs, dits extractibles. Ces composés sont biosynthétisés et stockés dans les cellules de parenchyme, puis ils sont libérés lorsque ces cellules meurent dans la zone de transition (Baldwin, 2010; Gachon et al., 2005; Gershenzon and Engelberth, 2010; Shain and Hillis, 1971; Stockigt and Klischies, 1977). Ce sont ces composés qui procurent à certains duramens une coloration particulière qui permet de les distinguer de l'aubier. C'est le cas des pins, des mélèzes, du douglas, des chênes, du robinier, etc. Dans les autres cas, on parle de bois blancs : sapins, épicéas, hêtre, charme, etc. Les parties 2 et 3 de ce chapitre sont consacrées aux extractibles du bois du tronc et des nœuds respectivement. L'ensemble de ces caractéristiques anatomiques, mécaniques et esthétiques expliquent l'utilisation du duramen en tant que matériau technologique, contrairement à l'aubier.

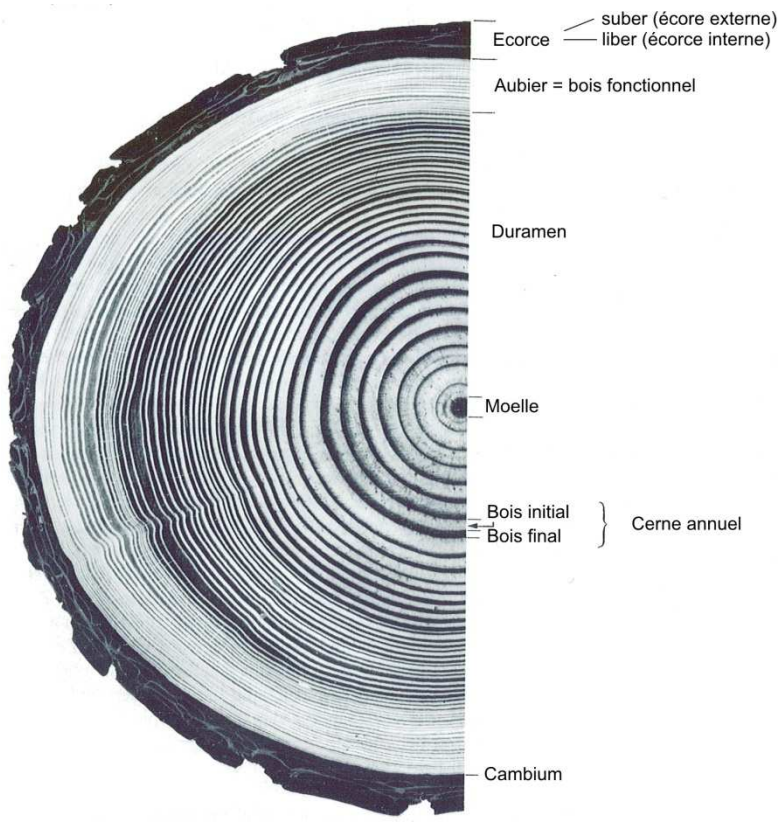


Figure 7 : Les différents tissus du tronc, exemple du Douglas. (©Springer, Heidelberg 1977)

Dans le tronc, le profil vertical de la répartition du duramen montre une plus forte proportion dans la base de l'arbre et une diminution plus ou moins linéaire jusqu'à sa cime (Backlund et al., 2014; Climent et al., 2003; Kantola et al., 2007; Knapic and Pereira, 2005). Caron et al., (2013) n'ont pas mis en évidence un tel profil chez l'épicéa de Sitka. Dans les branches, Schweingruber (1978) soutient qu'il n'y a presque jamais de duramen, mais Kyker-Snowman and Wilson (1988) ont déterminé que le duramen se formait dans les branches quand celles-ci ont 5 à 8 ans d'âge chez le pin blanc (*Pinus strobus*), l'épicéa rouge (*Picea rubens*) et le hemlock du Canada (*Tsuga canadensis*). Le premier cerne de duramen peut même apparaitre dès la première année de croissance de la branche chez l'épicéa rouge. Ces auteurs ainsi que Makela and Vanninen (2001) ont aussi établi que la proportion de duramen dans les branches est positivement corrélée à l'âge de celles-ci, il existe donc un profil vertical de duraminisation des branches lié à la position de la branche le long du tronc. Kramer et al., (2014) ont aussi observé que les branches de séquoia âgées de moins de onze ans ne contiennent pas de duramen. La proportion de duramen dans les branches augmente aussi lorsqu'elles ont une mauvaise exposition à la lumière. En effet, les auteurs ont détecté que les branches bien exposées au soleil produisent plus d'aubier comparativement au duramen. Nakaba et al., (2012) ont observé que la duraminisation des branches de robinier commençait au niveau des cellules du parenchyme axial proche de la moelle des branches lorsque les branches atteignaient quatre ans.

1.2.5 Constitution de la paroi d'une cellule de bois

Du point de vue chimique, le bois est composé majoritairement de carbone essentiellement présent dans les parois de ses cellules sous forme de polymères ligno-cellulosiques : deux polysaccharides que sont la cellulose et les hémicelluloses auxquels s'ajoute un polymère phénolique qui est la lignine (Fengel and Wegener, 1984; Salmen and Burgert, 2009; Stevanovic and Perrin, 2009).

1.2.5.1 La cellulose

La cellulose est le composé naturel le plus répandu sur Terre, et 80 % de la ressource mondiale en cellulose se trouve dans les forêts. Le bois contient entre 40 et 45 % de cellulose et 90 % de la cellulose est répartie dans les couches S2 et S3 de la paroi secondaire. La cellulose est un polymère de monosaccharides : D-glucopyranoses $C_6H_7O_2(OH)_3$ (Figure 8), il s'agit donc d'un homo-polysaccharide (comme l'amidon). C'est un polymère linéaire dont les unités sont reliées par une liaison osidique β-(1,4) qui est une liaison rigide de type structurale contrairement à la liaison α qui est de type réserve (c'est le cas de l'amidon). L'alignement parallèle des chaînes forme les microfibrilles de cellulose. Les degrés de polymérisation des monomères d'anhydro-glucopyranonses sont variables d'une espèce à une autre.

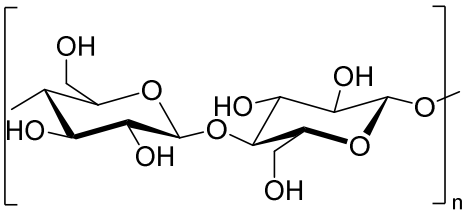


Figure 8 : Motif de base de la cellulose : la cellobiose.

L'appareil de Golgi et le plasmalemme (membrane plasmique) approvisionnent le protoplasme cellulaire en chaînes cellulosiques préformées pour leur mise en place dans la paroi. Ces chaines se polymérisent et s'allongent par liaisons covalentes, puis les liaisons hydrogène lient les chaînes d'un même plan en microfibrilles qui s'orientent dans les parois selon des angles différents (10° dans S2 et jusqu'à 90° dans S1 et S3) conférant ainsi au bois ses propriétés mécaniques.

Dans cette structure cristalline, des zones amorphes apparaissent et peuvent accueillir des molécules d'eau (l'hydrolyse de la cellulose commence dans ces régions), et elles sont aussi accessibles aux agents pathogéniques.

1.2.5.2 Les hémicelluloses

Ce sont des polysaccharides ramifiés d'une plus faible masse que la cellulose et ils représentent 20 à 35 % du bois. D'ailleurs les hémicelluloses, contrairement à la cellulose, sont des polymères hétérosides dont les monomères majoritaires sont des pentoses (le xylose, l'arbinopyranose), des hexoses (le glucose, le mannose), des acides hexuroniques (l'acide méthylglucuronique, l'acide galacturonique) et des désoxy hexoses (le désoxy-mannose, le désoxy-galactose). Ces polysaccharides de structure sont reliés par des liaisons osidiques β-(1,4).

Les hémicelluloses du bois sont majoritairement des xylanes et des mannanes, c'est-à-dire des polymères de xyloses et de mannoses, respectivement. Ainsi, les bois de feuillus se caractérisent par des hémicelluloses de type glucuronoxylanes acétylés et de glucomannanes, et les hémicelluloses de résineux sont de type galactoglucomannanes acétylés et d'arabinoglucuronoxylanes (Figures 9 et 10). De manière générale, les hémicelluloses de résineux comportent plus d'unités mannose et galactose, alors que les hémicelluloses de feuillus comportent plus d'unités xylose et des groupements acétyles.

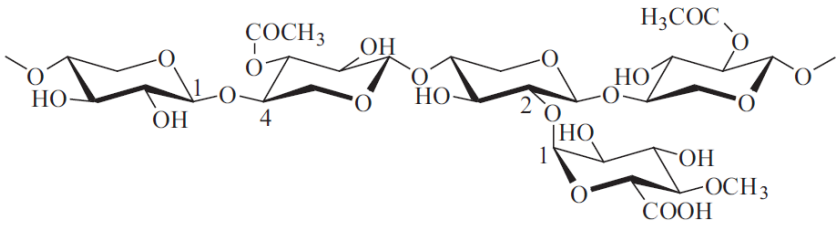
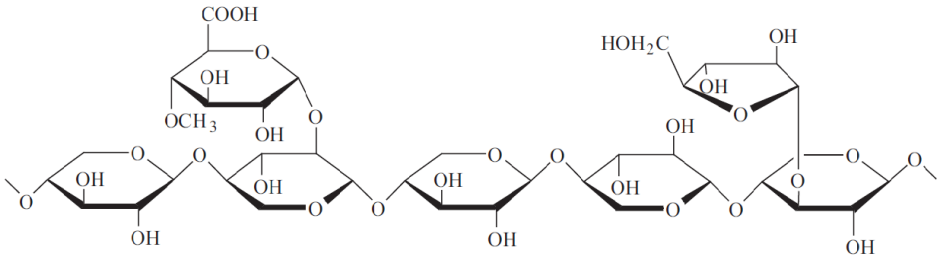


Figure 9 : Structure partielle de glucuronoxylanes de feuillus.


COOH
OH
OCH3
OH
HOH2C
OH
OH
OH

réticulée lorsqu'elle se lie aux mannanes (Lawoko et al., 2005; Monties, 2005). D'autre part, des éléments minéraux (calcium) ou physiologiques (auxine) influenceraient le processus de lignification (Fengel and Wegener, 1984). La lignine de la lamelle moyenne est majoritairement constituée des unités coumariques (Figure 13). Les lignines de résineux sont presque exclusivement constituées d'unités gaïacyles et contiennent plusieurs sous-structures condensées impliquant des liaisons carbones covalentes et formant un ensemble plus rigide ; on parle alors de lignine G (Figure 12). Les lignines de feuillus sont un mélange d'unités gaïacyles et d'unités syringyles qui empêchent la condensation ; on parle de lignine SG et la proportion des unités S peut varier de 20 à 60 %. Plus précisément, la lignine des éléments de vaisseaux est de type G alors que la lignine des fibres est de type S (Davin and Lewis, 2005a, 2005b; Nimz et al., 1981).

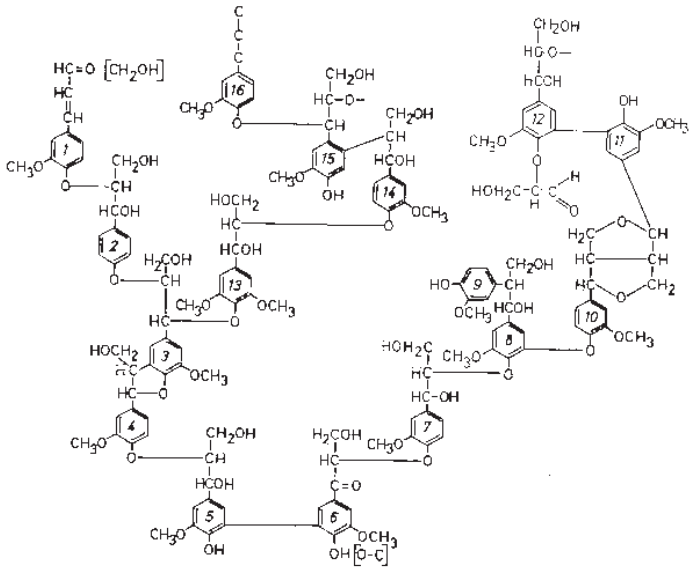


Figure 12 : Structure partielle de la lignine d'épicéa selon Adler (©Springer, Heidelberg 1977)

Ces spécificités soulèvent la question de l'assemblage aléatoire des monolignols pour former les lignines qui représentent 20 à 30 % de la matière organique terrestre. D'une part, des études récentes ont prouvé l'existence d'enzymes dirigeantes impliquées dans le processus de couplage des monolignols dans les cellules de xylème (Davin and Lewis, 2005a, 2005b; Gang et al., 1999). D'autre part, le paradigme actuel de l'occurrence de la lignine uniquement dans les plantes terrestres semble être bousculé par la découverte de lignine dans les cellules calcifiées d'une algue rouge (*Calliarthron cheilosporioides*) qui n'avait visiblement pas besoin d'un renfort mécanique ni d'un transport hydraulique supplémentaire. Les auteurs ont alors attribué à la lignine un rôle de protection contre les attaques microbiennes ou les radiations UV (Martone et al., 2009).

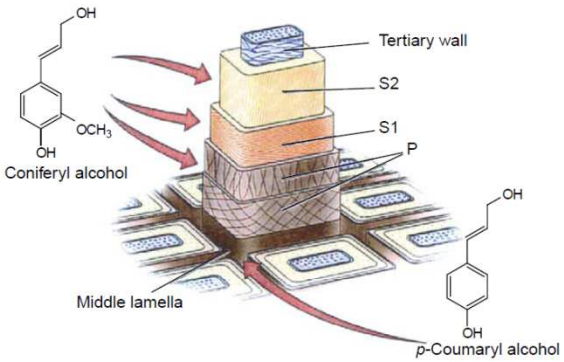


Figure 13 : Structure de la paroi cellulaire et spécificité des lignines dans les différentes parties. (©American Society of Plant Biologists, Rockville MD 2000)

Ces trois polymères structuraux dans le bois des branches et des nœuds ont fait l'objet de très peu d'études. De plus, leurs proportions et leurs caractéristiques sont liées à la présence du bois de réaction et seront donc traités dans la partie consacrée à ce bois.

En plus des polymères évoqués précédemment, le bois contient des molécules simples regroupées en deux groupes : les composés organiques ou extractibles, et les composés inorganiques communément désignés par « cendres ». Ces derniers représentent 0.1 à 0,5 % du bois et regroupent des éléments tels que le calcium, le magnésium, le potassium, etc. (Fengel and Wegener, 1984; Stevanovic and Perrin, 2009).

1.3 Les différents types de bois

En fait il existe des bois, et tout est opposition : bois de résineux / bois de feuillus ; bois de cœur (parfait) / bois d'aubier ; bois de réaction/ bois opposé. Ces différents types de bois sont conditionnés par l'espèce et les conditions de croissance de l'arbre, et chacun a des traits et des propriétés macroscopiques, microscopiques et chimiques spécifiques permettant de les identifier. Les principales caractéristiques de ces différents bois sont évoquées dans la suite de ce paragraphe.

1.3.1 Le bois de résineux

Le terme « résineux » est communément utilisé pour désigner les gymnospermes car les résineux représentent la majorité des espèces d'arbres de cet ordre. Les résineux sont les arbres les plus primitifs et possèdent un bois homoxylé constitué majoritairement de trachéides longitudinales (90 à 95 % du bois de résineux). Ces cellules peu spécialisées assurent à la fois le soutien mécanique grâce à leur paroi et la conduction de la sève via leur lumen et leurs ponctuations. La continuité de la circulation des fluides se fait, d'une part, par des ponctuations aréolées se trouvant aux extrémités et sur les faces radiales des trachéides, et d'autre part, par les ponctuations de champs de croisement se trouvant entre une trachéide longitudinale et une cellule de parenchyme d'un rayon ligneux. En effet, le bois de résineux est parcouru de rayons ligneux orientés radialement et constitués soit de

cellules de parenchyme radial soit d'un mélange de parenchyme radial et de trachéides radiales (Figure 14).

Les résineux ont des canaux résinifères longitudinaux ou radiaux tapissés de cellules sécrétrices de résines : les cellules éphithéliales. Les canaux sont normaux chez les genres *Pinus*, *Picea*, *Larix* et *Pseudotsuga*, c'est-à-dire formés par les cellules initiales de cambium à chaque saison de végétation, par opposition aux canaux traumatiques formés par le cambium de manière ponctuelle et localisée suite à une blessure. C'est le cas du sapin, du cèdre et de l'if et les membres de la famille des cupressus qui ne forment que des canaux traumatiques.

Dans un cerne formé durant une année donnée, le bois initial est formé au printemps, au début de la saison de végétation alors que le bois final est formé à la fin de la saison. Le bois initial des résineux se caractérise par des trachéides à parois minces et lumens larges pour assurer la conduction de la sève. Le bois final a des trachéides à parois épaisses destinées principalement au soutien mécanique.

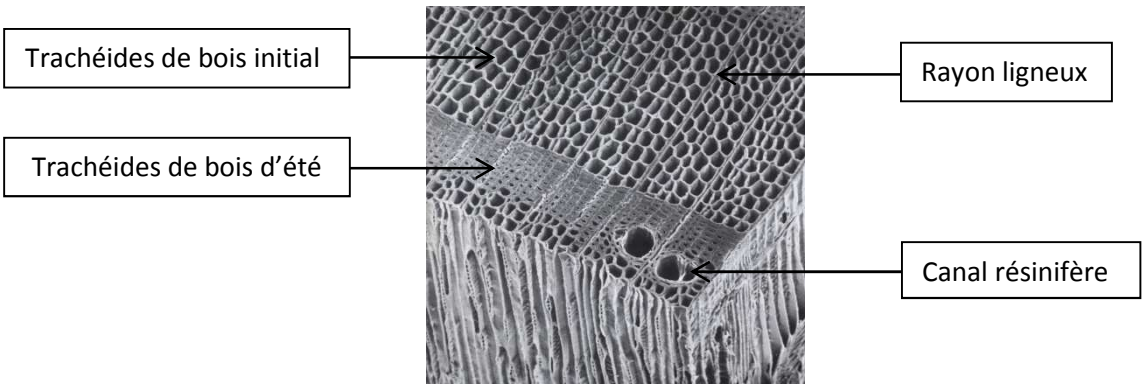


Figure 14 : Exemple d'un plan ligneux de résineux : le mélèze du Japon. (©Japan Forest Technology Association, Tokyo 1982)

1.3.2 Le bois de feuillus

Le bois de feuillus est plus élaboré que celui des résineux avec plusieurs éléments anatomiques qui permettent l'identification des espèces. Chez les feuillus, le soutien mécanique est assuré par les fibres qui sont les responsables principaux de la densité de ces bois. Les vaisseaux sont des cellules à parois moins épaisses que les fibres ; ils servent à la conduction de la sève via des perforations (aux extrémités des éléments de vaisseau) et des ponctuations (entre deux vaisseaux accolés ou entre un élément de vaisseau et une cellule de parenchyme). Le bois des feuillus possède aussi des rayons ligneux et du parenchyme longitudinal indépendant ou associé aux vaisseaux (Figure 15).

La différentiation entre le bois initial et le bois final des feuillus se fait au niveau de la répartition (nombre et taille) des vaisseaux et elle diffère d'une espèce à une autre. Les essences dites « à zone initiale poreuse » ont beaucoup de gros vaisseaux uniquement dans le bois initial. C'est le cas des

chênes, châtaigniers, ormes, robinier, etc. Le noyer et le merisier sont dits à « zone semi-poreuse ». Mais la majorité des bois de feuillus sont homogènes, c'est-à-dire que la répartition des vaisseaux est constante entre le bois de printemps et le bois d'été. C'est le cas des hêtres, aulnes, charmes, peupliers, bouleau, érables, etc.

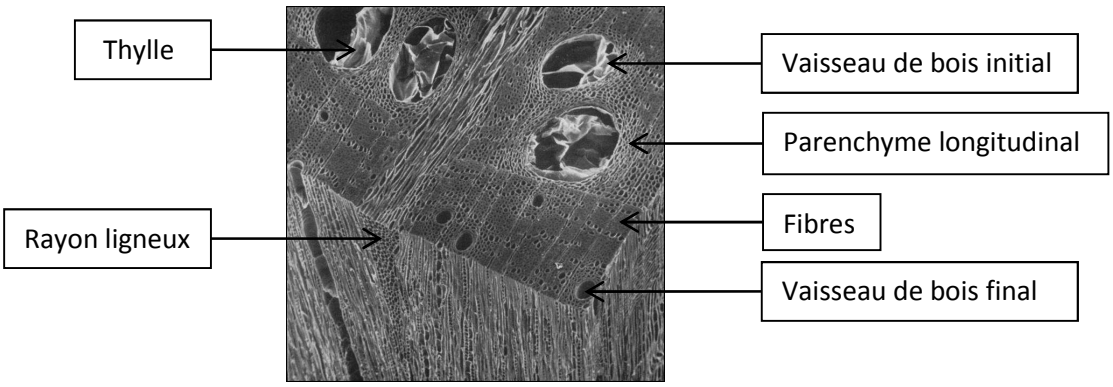


Figure 15 : Exemple de plan ligneux de feuillus : le chêne du Japon. ((©Japan Forest Technology Association, Tokyo 1982)

1.3.3 Le bois des branches et des nœuds

La plupart des caractéristiques microscopiques du bois du tronc sont retrouvées dans le bois de la branche et du nœud, i.e. trachéides, vaisseaux, fibres, rayons, etc. Des auteurs ont toutefois rapporté des différences, notamment l'absence plus fréquente de cernes de croissance (probablement liée aux conditions environnementales locales parfois difficiles), la modification de la largeur et la forme des rayons ligneux, la répartition des vaisseaux, la structure des parois des cellules de parenchyme, les caractéristiques du phloème, l'occurrence de canaux traumatiques (Fisher and Stevenson, 1981; Kramer et al., 2014; Kyker-Snowman and Wilson, 1988; Lee and Eom, 1988; Lev-Yadun and Aloni, 1990; Meredieu and Caraglio, 2002; Newton et al., 2012; Schweingruber, 1978; Sellin et al., 2008). La forme de la moelle semble un critère de reconnaissance du bois de branche car la moelle occupe une grande proportion du volume du nœud (Schweingruber, 1978).

Lev-Yadun and Aloni (1990) ont mis en évidence la formation de zones de xylème en forme de spirales au-dessus de la jonction tronc-branche chez des feuillus et des résineux, et ce xylème contient des vaisseaux ou des trachéides circulaires caractéristiques de la réorientation du fil de bois. Kramer and Borkowski (2004) ont mis en évidence le rôle de l'auxine dans l'orientation des cellules fusiformes du cambium autour des branches (Neely, 1991). Par ailleurs, les vaisseaux sont organisés en zigzag au niveau des jonctions (André, 2002) (Figure 16) et cette organisation donne l'illusion que les extrémités des vaisseaux se situent toujours dans les nœuds comme rapporté précédemment par Zimmermann (1983). Enfin, selon Shigo (1985, 1990), l'activité dans les tissus des branches

commence plus tôt dans l'année que celle dans le tronc, probablement grâce à la mobilisation précoce des réserves stockées l'année précédente.



Figure 16 : Eléments de vaisseaux disposés en zigzag dans la zone de jonction tronc-branche chez le chêne pédonculé. (©INRA, Paris 2002)

1.3.4 Le bois de réaction

Le bois de réaction se forme pour redresser la tige qui a subi une inclinaison, c'est un bois dont les cernes sont excentriques et n'a aucune valeur marchande contrairement au bois normal. Le bois de réaction des résineux est dit « bois de compression » alors que chez les feuillus, ce bois est dit « bois de tension » (Pour des revues voir Fagerstedt et al., 2014; Ruelle, 2014).

1.3.4.1 Le bois de compression

Le bois de compression des résineux se forme sur la face inférieure des tiges inclinées. Sur le plan anatomique, les trachéides dans ce tissu sont plus courtes avec des parois plus épaisses et, surtout, elles ont une section transversale arrondie; par conséquent, il y a des vides inter-trachéides. A cause de ces méats intercellulaires, la cohésion entre les cellules n'est plus assurée (Figure 17). Lee and Eom (1988) ont rapporté l'occurrence de canaux résinifères traumatiques dans le bois de compression d'une branche de *Pinus koraiensis* ; mais il semblerait que ceci ne soit pas une caractéristique générale du bois de compression (Ruelle, 2014). Enfin, le bois de compression n'a pas de couche S3. Sur le plan chimique, ce bois est surtout caractérisé par un fort taux de lignine déposée dans la couche S2 et riche en p-hydroxyphényles (unités H) qui se condensent fortement et procurent sa rigidité à ce bois. D'autre part, comparativement au bois normal, le bois de compression a moins de cellulose. Celle-ci y est moins cristalline et possède un fort angle de microfibrilles dans les couches S1 et S2. Le bois de compression possède moins d'hémicelluloses avec surtout une diminution des galactoglucomannanes et l'apparition du galactane et du glucane.

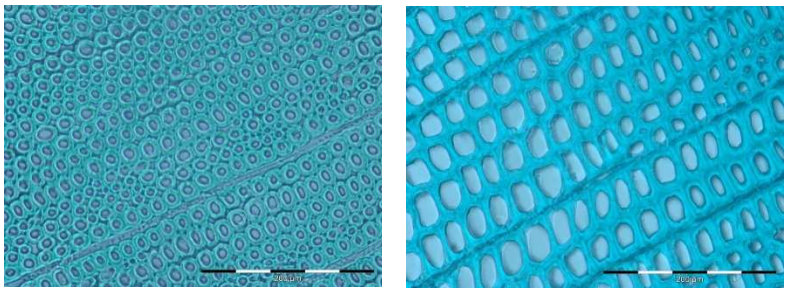


Figure 17 : Coupes transversales du bois de compression (à gauche) et du bois opposé (à droite) chez l'épicéa. (Photo : M.-C. Trouy, échelle 200 µm. (©INRA, Paris 2015)

1.3.4.2 Le bois de tension

Le bois de tension des feuillus se forme sur la face supérieure des tiges inclinées. Sur le plan anatomique, ce bois est caractérisé par une forte proportion de fibres par rapport aux vaisseaux, plus de rayons mais moins de parenchyme axial. C'est surtout la présence d'une couche gélatineuse (couche G) qui caractérise le plus souvent le bois de tension (Figure 18). Toutefois, certains bois de tension ne contiennent pas cette couche G ou présentent un autre type de d'organisation de la paroi. Au niveau chimique, le bois de tension contient moins d'hémicelluloses (xyloglucane, galactane, arabinogalactane, …) et moins de lignines dont la structure est surtout dominée par les monolignols syringyles. Cette diminution de la lignine semble être reliée à la lignification partielle des fibres (Pilate et al., 2004). Ce qui caractérise surtout le bois de tension est la grande contribution de la cellulose dans la couche G. Dans cette couche, la cellulose est cristalline et orientée dans la direction de la fibre. La couche G peut être peu ou pas lignifiée et elle peut contenir des pectines.

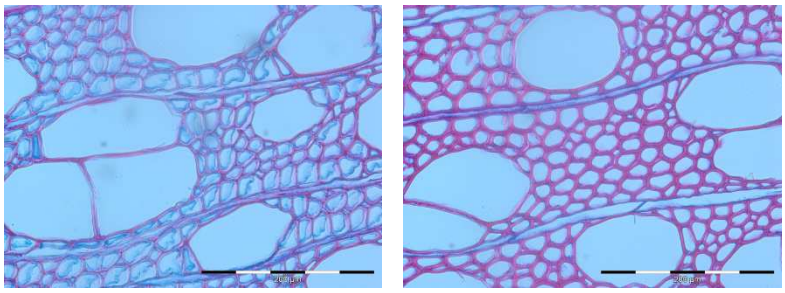


Figure 18 : Coupes transversales du bois de tension (à gauche) et du bois opposé (à droite) chez le peuplier. (Photo M.-C. Trouy, échelle 200 µm. ©INRA, Paris 2015)

1.3.4.3 Le bois de réaction des branches et des nœuds

De par l'inclinaison des branches, du bois de réaction se développe unilatéralement et de façon permanente pour maintenir un équilibre d'orientation et maximiser l'exposition à la lumière (et/ou prendre la place du tronc principal dans le cas d'une fourche) (Fisher and Stevenson, 1981; Huang et al., 2010). Ce bois est donc responsable des caractéristiques des branches et des nœuds par rapport au tronc qui serait formé de bois normal.

Les trois rôles principaux du bois sont : la conduction de l'eau et des nutriments des racines vers les feuilles, le support mécanique des axes leur permettant une croissance longitudinale, et le stockage des réserves dans les seules cellules vivantes du xylème : les cellules de parenchyme qui peuvent être orientées axialement ou radialement. Les fonctions hydrauliques et mécaniques font l'objet de compromis de la part du bois pour les assurer conjointement, même s'il semblerait que la fonction mécanique l'emporte sur la fonction hydraulique (Badel et al., 2015; Dahle and Grabosky, 2009; Lachenbruch and McCulloh, 2014). Ces compromis doivent être encore plus difficiles à trouver et accomplir dans les nœuds tant cette jonction subit un changement d'orientation du fil, occupe un faible volume et possède des cernes très étroits. De plus, les arbres sont soumis à des stress « exceptionnels » (vent, neige, gel, chute des feuilles, sécheresse, éclaircies, etc.) qui affectent intensément les branches et qui nécessitent constamment une acclimatation des caractéristiques de leur bois (Kane et al., 2008; Lemoine et al., 2002; Watt et al., 2005; Westing, 1965). Enfin, les nœuds doivent assurer la fonction de défense contre l'entrée de pathogènes dans le tronc. Cette fonction étant attribuée aux extractibles, elle sera traitée en détail dans la partie 3 de ce chapitre.

1.3.4.3.1 La fonction de soutien mécanique

Cette fonction assurée par les nœuds est possible grâce aux caractéristiques du bois de réaction énoncées précédemment. Dans le cas des résineux, un fort angle des microfibrilles du bois de compression procure à la branche plus de flexibilité pour contrer un moment de flexion important subi à sa base. Ainsi, la forme et les propriétés mécaniques du nœud sont optimisées pour répartir les contraintes de façon homogène sur toute la section transversale de la base de la branche (Burgert and Jungnikl, 2004; Farber et al., 2001; Jungnikl et al., 2009; Muller et al., 2006). Les auteurs ont aussi mis en évidence que le bois opposé (situé sur la face supérieure) joue un rôle essentiel dans le maintien de la position de la branche puisque celui-ci possède des angles de microfibrilles très faibles, voir nuls, ce qui procure de la rigidité et empêche la branche de s'affaisser sous son propre poids.

Dans le cas des nœuds de feuillus, c'est la couche G dans la face supérieure qui procure au bois ses caractéristiques mécaniques. Toutefois, le rôle de cette couche n'est pas encore totalement élucidé. D'une part, tous les bois de tension ne forment pas une couche G (Fisher and Stevenson, 1981). D'autre part, l'occurrence de bois de tension avec une couche gélatineuse sur les faces supérieure et inférieure des branches de certains feuillus a été rapportée, mais uniquement lorsqu'elles étaient jeunes, puis ce bois de tension est « repassé » sur la face supérieure lorsque ces branches sont devenues âgées (Aloni et al., 1997; Fisher and Stevenson, 1981). Enfin, l'analyse du bois des branches de plusieurs angiospermes a révélé que ce bois a une croissance très excentrique dans la partie inférieure des branches (Tsai et al., 2012; Wang et al., 2009), alors que dans certains cas, ce bois

excentré n'est ni du bois de tension ni du bois de compression. Ses caractéristiques anatomiques (angle de microfibrilles, nombre de vaisseaux, épaisseur des parois) sont similaires dans le bois excentré et dans le bois opposé. Dans d'autres cas, la couche G est répartie en bandes discontinues, surtout dans la face supérieure et légèrement sur la face inférieure.

1.3.4.3.2 La fonction hydraulique

Le bois de compression constitué de trachéides courtes à parois épaisses (Lee and Eom, 1988; Spicer and Gartner, 1998a), et le bois de tension possédant des fibres à parois épaisses et moins de vaisseaux qui sont plus courts sont extrêmement défavorables à la circulation hydraulique. De plus, les vaisseaux et les trachéides circulaires qui sont dans les zones de jonction ne conduisent pas l'eau, ou du moins faiblement (Aloni et al., 1997; Lev-Yadun and Aloni, 1990; Zimmermann, 1978). Les ponctuations et les perforations qui permettent le passage d'un élément de trachéide ou de vaisseau vers un autre contribuent aussi à la résistance hydrique (Lee and Eom, 1988; Tyree and Ewers, 1991). Tous ces éléments renforcent l'effet « goulot d'étranglement » que constituent les nœuds dans la circulation des fluides. De plus, la position des branches le long du houppier vert détermine leurs caractéristiques hydrauliques. Les branches situées en bas du houppier présentent une plus grande résistance à la circulation de la sève brute comparativement aux branches de la cime. Ces dernières subissent plus d'évapotranspiration à cause d'une plus forte exposition au soleil et la montée de la sève y est donc facilitée, d'autant plus que leur angle d'inclinaison par rapport au tronc est faible (Dahle and Grabosky, 2009). Les nœuds du bas ont une direction perpendiculaire à l'axe du tronc et opposent davantage de résistance à la circulation (Eisner et al., 2002a).

Les résineux possèdent beaucoup plus de conduits (trachéides) que les feuillus mais leurs diamètres sont extrêmement faibles, et ce que ce soit dans le tronc ou dans les branches (McCulloh et al., 2010). Ceci s'explique par le fait que les fonctions mécanique et hydraulique sont assurées chez les résineux par les mêmes cellules, les trachéides. La contribution hydraulique des trachéides est donc plus difficile à isoler. Dans le cas des branches de l'épicéa, du sapin et du Douglas, le bois de compression conduit moins bien l'eau que le bois opposé à cause d'une faible portion de lumens conducteurs (Klein, 1992; Mayr and Cochard, 2003; Mayr et al., 2005; Spicer and Gartner, 1998a). Les larges cernes dus à l'excentricité du bois de compression ne semblent pas être suffisants pour améliorer sa conductivité. D'autant plus que le bois opposé ne présente pas de caractéristiques particulières qui pourraient contrebalancer celles du bois de compression en termes d'amélioration de la conductivité (Spicer and Gartner, 1998a). A moins qu'une partie de la réponse ne viennent des trachéides normales présentes dans le bois de compression des branches. En effet, il a été mis en évidence que les premières trachéides formées chaque année ont une forme rectangulaire, avec de fines parois et de larges lumens qui contribueraient à la conductivité hydrique (Mayr et al., 2005). De

plus, ces trachéides normales dans le bois de compression ont trois fois plus de ponctuations qui sont 1,7 fois plus larges que le reste des cellules arrondies de ce bois. Ces ponctuations sont aussi plus nombreuses que dans le bois opposé (1,6 fois plus de ponctuations). Ces trachéides seraient donc particulièrement impliquées dans le transport hydrique dans le bois de compression.

Dans le cas des feuillus, les essences ont adopté différentes stratégies pour assurer la circulation des fluides (Tyree and Ewers, 1991). Les nœuds possèdent moins de vaisseaux (au détriment des fibres), qui sont aussi plus étroits, dans la face supérieure comparativement aux nombreux et larges vaisseaux de la face inférieure des branches chez le chêne, le bouleau et l'érable (Aloni et al., 1997; Sellin et al., 2008). Chez le chêne, les fluides circulent essentiellement dans la partie inférieure des branches via les vaisseaux d'été dans les cernes les plus récents. Chez le bouleau et l'érable, la circulation se fait dans toute la circonférence de la branche grâce à des cernes plus larges (Aloni et al., 1997; Sellin et al., 2008). Ces différences sont certainement liées à la porosité de ces espèces : diffuse (bouleau, érable) ou à zone initiale (chêne) (McCulloh et al., 2010).

Les nœuds ont aussi un rôle de prévention de l'entrée d'air qui causerait l'embolie et perturberait la circulation de l'eau dans le tronc principal (Eisner et al., 2002a). Les conduits avec un faible diamètre sont plus résistants à l'embolie (Dahle and Grabosky, 2009). Le fait que les nœuds de la cime aient des vaisseaux de faibles diamètres par rapport aux nœuds de la base de l'arbre pourrait être corrélé au besoin accru de sécurité hydrique pour les branches et les feuilles de la cime subissant une évapotranspiration plus intense (Zimmermann, 1978). Toutefois, il a été trouvé que le bois de compression avec de faibles diamètres des trachéides et des lumens étroits est plus sensible à l'embolie (Mayr and Cochard, 2003). Les conséquences du bois de compression sur la fonction hydraulique ne sont donc pas si évidentes et mériteraient d'être précisées (Spicer and Gartner, 1998a, 1998b).

2 Les extractibles dans le bois du tronc

2.1 Les familles d'extractibles

Les extractibles du bois des arbres dans les régions tempérées sont principalement de nature terpénique et phénolique (Fengel and Wegener, 1984 ; Stevanovic and Perrin, 2008).

2.1.1 Les terpènes

Les terpènes sont synthétisés par les cellules épithéliales (tissu spécialisé du parenchyme) qui bordent les canaux résinifères. Leur synthèse peut avoir lieu de manière régulière ou bien lors d'une blessure. Ainsi les canaux résinifères sont dits, respectivement, normaux ou traumatiques.

Les terpènes sont synthétisés à partir de l'unité de base qui est l'isoprène (2-methylbuta-1,3-diène). Les terpènes se subdivisent en plusieurs groupes selon le nombre d'unités isoprènes mises en jeu. Ainsi, les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les sesterpènes, les triterpènes et les tétraterpènes sont respectivement le résultat d'assemblage de deux, trois, quatre, cinq, six et huit isoprènes (Figure 19). Les résineux contiennent toutes ces classes de terpènes hormis les sesterpènes qui sont rares. Quant aux feuillus, ils contiennent plutôt des terpènes lourds (diterpènes et triterpènes). On parle de terpénoïdes lorsque les molécules sont fonctionnalisées par des substitutions avec des groupes OH, C=O, COOH, etc.

Les monoterpènes sont des composés lipophiles et volatiles. Ils peuvent être acycliques (le myrcène), monocycliques (le limonène), bicycliques (les pinènes) ou tricycliques (le tricyclène). Les sesquiterpènes sont aussi des composés volatiles qui peuvent se présenter sous des formes diverses : acycliques (le farnésol), monocycliques (le germacrene), bicycliques (le cadinène). Les tropolones sont des monoterpènes ou des sesquiterpènes monocycliques dont le cycle comporte sept atomes de carbone et elles sont surtout présentes chez les *Cupressaceae* (thuya). Les tropolones sont considérées comme des composés responsables de la durabilité naturelle de certains bois tels que l'if (*Taxus spp*).

Les diterpènes et les acides diterpéniques constituent les parties non volatiles des oléorésines de bois de résineux. Les diterpènes peuvent être des hydrocarbures purs (le pimaradiène), ou des dérivés sous forme d'alcools (le larixol), d'aldéhydes (le levopimaral) ou d'oxydes (le manoyloxide). Les dérivés carboxyliques, dits acides résiniques, sont souvent tricycliques (l'acide pimarique). Enfin, certains diterpènes contiennent un anneau phénolique tel que le ferruginol extrait du duramen de *Cryptomeria japonica*.

Le squalène est un triterpène acyclique, considéré comme le précurseur des triterpènes cycliques qui sont les plus répandus. Les stéroïdes tels que le β-sitosterol et le campestérol sont des triterpènes tétracycliques alors que le bétulinol et l'acide bétulonique sont des triterpènes pentacycliques identifiés respectivement dans les écorces et le bois de bouleau blanc. Les triterpènes et les stéroïdes glycosilés sont dits saponines et l'aescine en est un exemple extrait du châtaignier.

Certains terpènes font partie du processus physiologique primaire des plantes et sont donc toujours présents. Ainsi le phytol est un diterpène qui fait partie de la structure de la chlorophylle ; les caroténoides sont des tétraterpènes présents dans les tissus photosynthétiques et qui les protègent de la photo-oxydation. Les stérols sont des composés de la membrane cellulaire participant à sa stabilisation. On trouve aussi des hormones végétales telles que l'acide abscissique (sesquiterpène) et les gibbérélines (diterpènes).

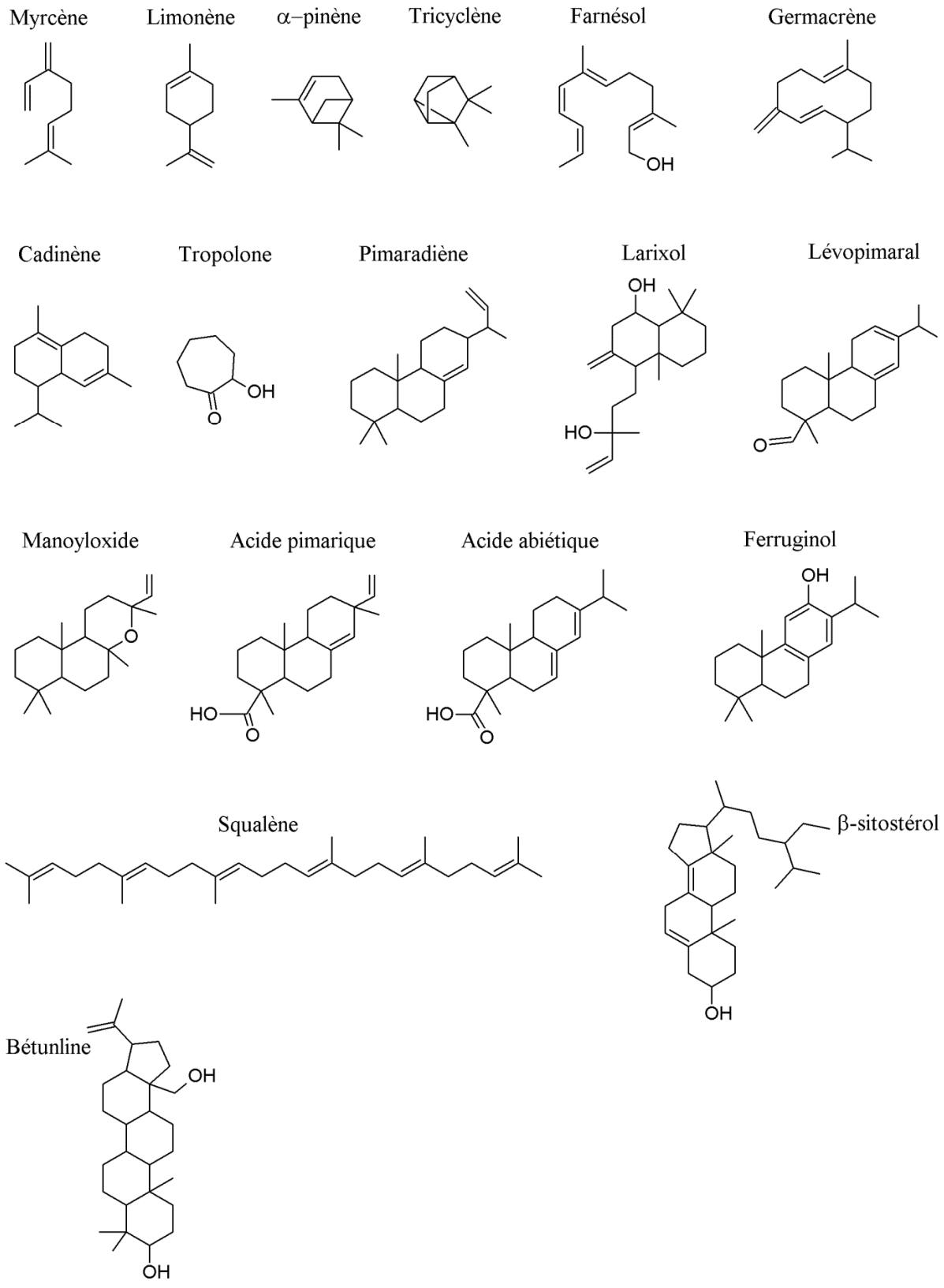


Figure 19 : Exemple de terpènes répartis selon les différents groupes.

2.1.2 Les phénols

Les phénols simples tels que l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide ferrulique, la vanilline, le syringaldehyde, le sinapaldéhyde, le coniferylaldéhyde, l'eugenol sont présents dans le bois (Figure 20). Dans la suite, il sera question de composés plus élaborés renfermant plusieurs noyaux aromatiques.

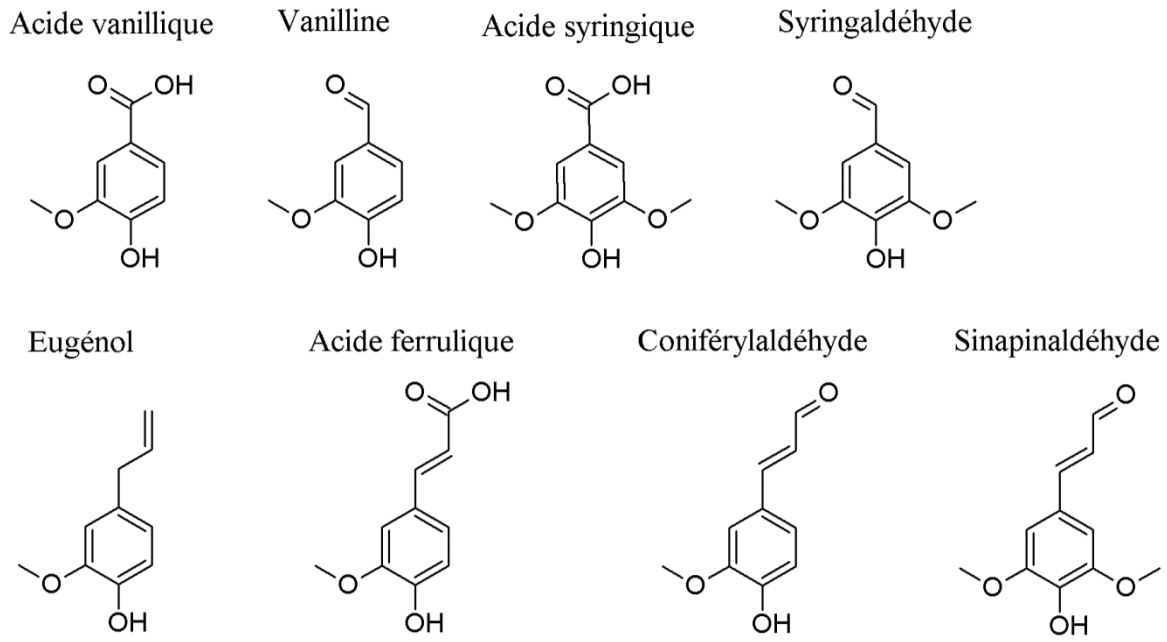


Figure 20 : Exemple de phénols simples.

2.1.2.1 Les lignanes

Les lignanes sont des dimères constitués par deux unités phenylpropane (C6 – C3) reliées par une liaison β – β au niveau du carbone C8 (Castro et al., 1996; Suzuki and Umezawa, 2007; Umezawa, 2003). Ils constituent le groupe de composés le plus représentatif des lignanoides comprenant en plus les néolignanes et les norlignanes. Les néolignanes sont des dimères phenylpropanoïdes liés par une liaison autre que β – β. Parmi ces derniers, il y a l'alcool dehydrodiconiféryle (chez *Aglaia foveolata,* Figure 21) et le cedrusin. Les trimères et les tétramères de phénylpropanes sont dits sesqui- et dilignanes respectivement (Umezawa, 2003).

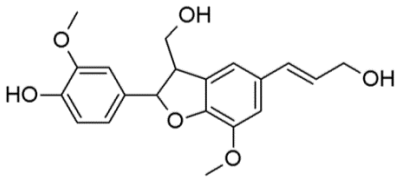


Figure 21 : Alcool dehydrodiconiféryle.

Les lignanes sont biosynthétisés à partir de l'alcool conifé rylique sous l'action de protéines dirigeantes (Davin and Lewis, 2000, 2005b; Gang et al., 1999). Le pinorésinol est supposé être le premier lignane formé puis la pinorésinol/laricirésinol réductase le réduit en laricirésinol. Ce dernier donne naissance au secoisolaricirésinol qui est lui-même transformé en matairésinol par la secoisolaricirésinol dehydrogénase. Il est admis que tous les autres lignanes sont biosynthétisés à partir de ces quatre composés et suivant le même ordre : furofurane -> furane -> dibenzylbutane –> dibenzylbutyrolactone (Suzuki and Umezawa, 2007; Umezawa, 2003).

Les lignanes se subdivisent en huit catégories selon l'endroit où a lieu l'oxydation et la cyclisation des deux monolignols (Tableau 1 et Figure 22). Enfin, quatre sous-groupes existent suivant le degré d'oxydation des carbones C9 et C9' (absence d'oxygène, présence d'un seul oxygène ou d'un acide dicarboxylique) ; les lignanes avec un oxygène en C9 (C9') sont les plus répandus (Castro et al., 1996; Suzuki and Umezawa, 2007; Umezawa, 2003).

Groupes de lignanes	**Exemples**
Furofurane	Pinorésinol
Furane	Laricirésinol
Dibenzylbutane	Secoisolaricirésinol
Dibenzylbutyrolactone	Matairésinol Nortrachelogénine
Dibenzylbutyrolactol	Dibenzylbutyrolactolignane
Dibenzocyclooctadiène	Kadsuranine
Arylnaphtalène	Dehydrodéoxypodophyllotoxine
Aryltetraline	Isolaricirésinol α-conidendrine

Tableau 1 : Exemples de lignanes répartis selon les différents groupes.

Les lignanes sont souvent décrits dans les résineux car ils ont été isolés chez toutes les familles de l'ordre conifère (podocarpaceae, araucariaceae, cupressaceae, taxodiaceae, pinaceae, mais pas chez les cephalotaxaceae).

Les feuillus en contiennent aussi mais souvent sous forme glycosides avec du rhamnose ou du xylose. Les plus courants sont le syringarésinol et le lyonirésinol. Ils ont été identifiés dans le bois de bouleau (Hiltunen et al., 2004, 2006). Le syringarésinol et le cycloolivil ont été identifiés chez *Salix sachalinensis* et dans le bois de l'olivier respectivement (Lee et al., 1993; Perez-Bonilla et al., 2006). Le dimethoxyisolariciresinol xyloside a été identifié chez l'aulne glutineux (Freudenberg and Weinges, 1959) et le *Sorbus decora* (Narasimhachari and Rudloff, 1962). L'acide thomasique se trouve dans le bois de l'orme (Hostettler and Seikel, 1969; Seikel et al., 1968). Différents lignanes ont été détectés dans le bois du noisetier japonais (*Corylus sieboldiana*) (Watanabe et al., 1992), dans le phloème de plusieurs frênes (Eyles et al., 2007) et dans l'écorce de bouleau (Liimatainen et al., 2012).

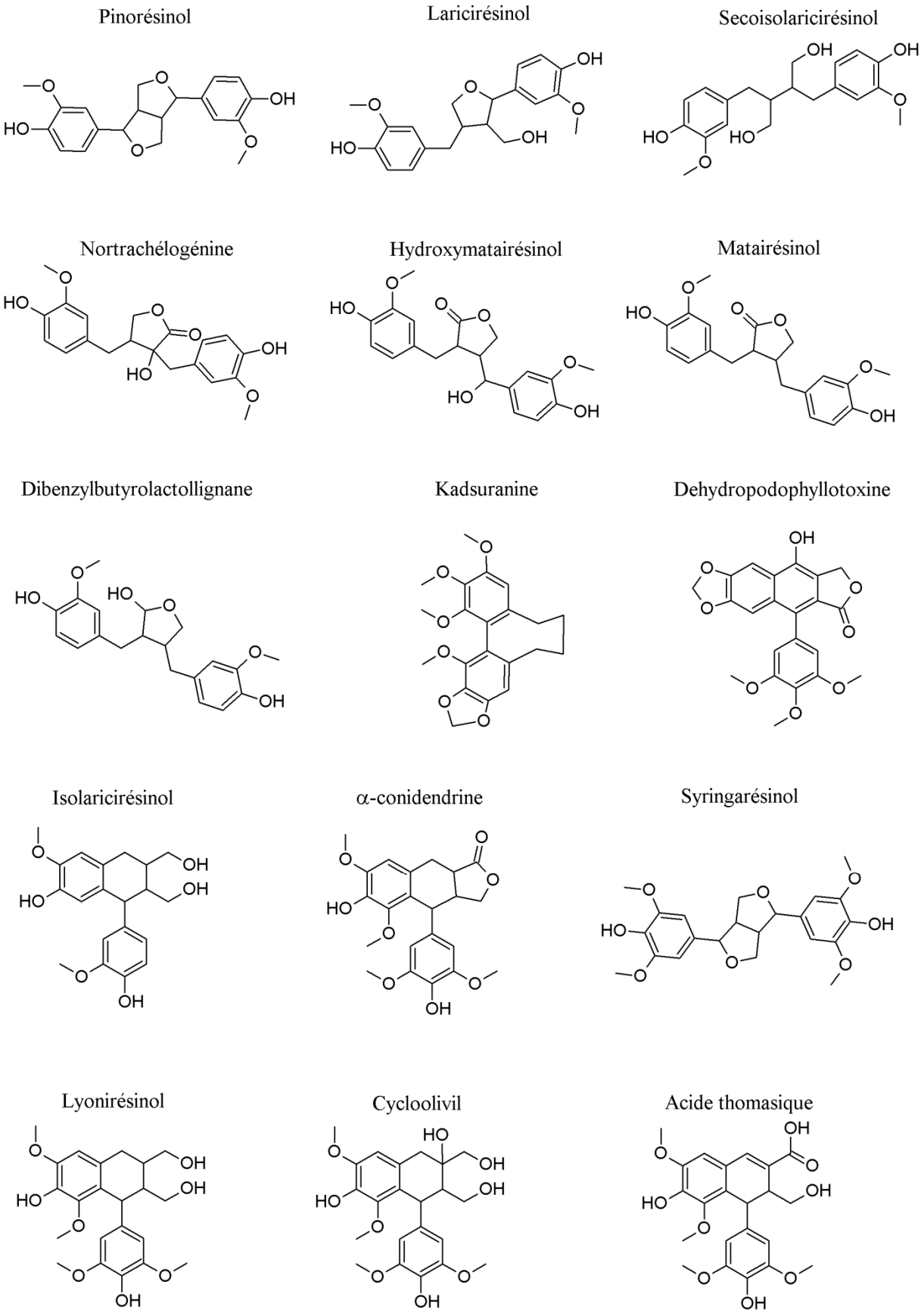


Figure 22 : Exemple de lignanes.

Les norlignanes sont des diphénylpentanes issus d'un phénylpropane et d'un phényléthane reliés par trois types de liaisons (C7-C8', C8-C8' ou C9-C8'). Ces composés semblent être exclusifs des conifères et ils sont surtout présents chez les taxodiaceae, les cupressaceae et les araucariaceae. Ils n'ont pas été identifiés chez les genres formant la famille des pinaceae (pins, épicéas, sapins, mélèzes, …) (Castro et al., 1996; Suzuki and Umezawa, 2007; Umezawa, 2003). L'hinokirésinol semble être le norlignane précurseur des autres tels que l'agatharésinol et la sequirine C chez le cèdre japonais (Bito et al., 2011) (Figure 23) et la sequirine D chez le sequoia toujours vert (Suzuki and Umezawa, 2007).

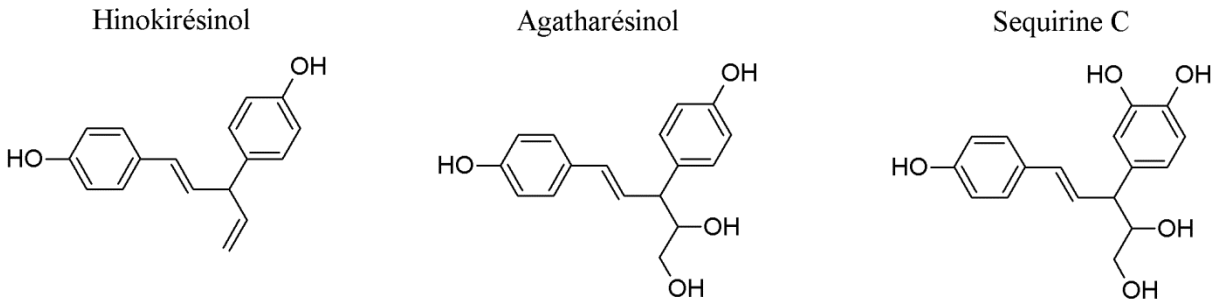


Figure 23 : Exemple de norlignanes.

Jusqu'à maintenant les lignanes ont été considérés comme de simples métabolites secondaires des plantes, mais de récentes études ont mis en lumière un lien étroit entre le processus de lignification et la voie des phénylpropanoïdes aboutissant à la biosynthèse des lignanes (Vander Mijnsbrugge et al., 2000; Villalobos et al., 2012). En plus, par le fait que les lignanes et les lignines partagent les mêmes précurseurs, des enzymes dirigeantes de la voie des phénylpropanoïdes sont exprimées dans le jeune xylème en cours de différentiation, donc en cours de lignification, mais aussi dans le parenchyme axial des troncs inclinés de peuplier et dans le bois de compression du pin. Les lignanes auraient un rôle primaire dans le développement des arbres et/ou de protection contre le stress oxydatif causé par la polymérisation des monolignols en lignine (Vander Mijnsbrugge et al., 2000; Villalobos et al., 2012).

2.1.2.2 Les stilbènes

Ce sont des composés dont le squelette principal est un diphényléthylène dérivé de l'acide coumarique via le métabolisme des phénylpropanoïdes (Figure 24). Les stilbène synthases sont un groupe d'enzymes qui catalysent la production du resvératrol à partir duquel sont dérivés les autres stilbènes. Ces enzymes font partie de la famille des enzymes chalcone synthases, impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes. Malgré cette connexion avec la biosynthèse des lignanes et des flavonoïdes ; rares sont les arbres dont le bois synthétise des stilbènes (Chong et al., 2009; Reinisalo et al., 2015). La pinosylvine, le monométhyl éther de pinosylvine et le diméthyl éther de pinosylvine en sont les représentants les plus abondants et synthétisés surtout par le bois du genre Pinus (Figure

24). Sergent et al., (2014) ont identifié le resvératrol et le picéatanol dans le duramen du robinier. Le bois d'Eucalyptus formé après une blessure et celui des branches contiennent plusieurs stilbènes glycosides (resvératrol, picéatanol, etc.) alors que le bois sain n'en contient pas (Eyles et al., 2003; Tian et al., 2012). Le resvératrol est surtout connu pour ses propriétés antioxydantes dans les raisins et les vins rouges. L'autre source de stilbène est l'écorce d'épicéa qui contient plusieurs molécules : le piceatanol et ses dérivés, l'isorhapontigenine, l'isorhapontine, le piceide, l'astringine (Jyske et al., 2014; Krogell et al., 2012).

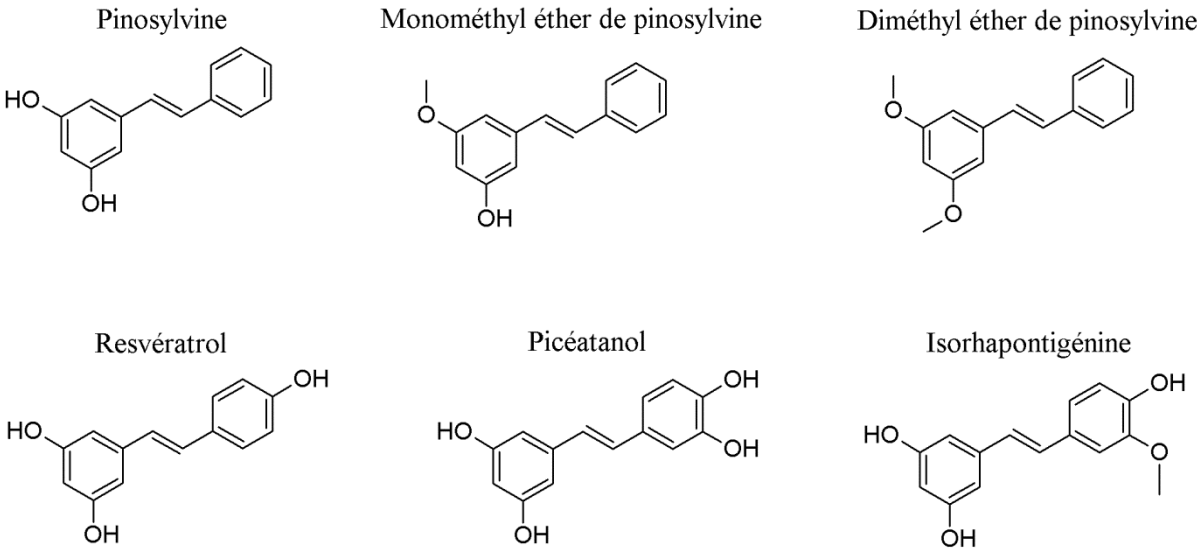


Figure 24 : Exemple de stilbènes.

2.1.2.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont composés de 2 cycles aromatiques (cycles A et B) reliés par un cycle pyrone (cycle C) ; seules les chalcones ont leur cycle pyranique ouvert (Figure 25). La biosynthèse des flavonoïdes emprunte deux voies métaboliques : celle de l'acide shikimique et celle de l'acide malonique. Il existe plusieurs classes de flavonoïdes selon le degré d'oxygénation du cycle C (Tableau 2, Figure 26). Enfin, le type de substitution (hydroxylation, glycosilation, méthylation, etc.) des cycles aromatiques distingue les composés d'une même classe (Gottlieb, 1990).

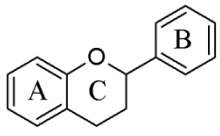


Figure 25 : Structure de base des flavonoïdes.

Groupes de flavonoïdes	Exemples
Flavone	Apigénine
Flavonol	Kaempférol
Flavanone	Naringénine
Flavanonol	Taxifoline
Aurone	Sulfuretine
Chalcone	Robteine chalcone
Dihydrochalcone	Dihydronaringénine chalcone
Flavan-3-ol	Catéchine
Flavan-3,4-diol (Leucoantho-cyanidine)	Téracacidine
Anthocyanidine	Cyanidine

Tableau 2 : Exemples de flavonoïdes répartis selon les principaux groupes.

Les flavonoïdes sont souvent substitués avec un dérivé hydroxyl, méthoxyl ou gallate dans le cas des flavan-3-ols. La glycosylation est aussi très fréquente pour les flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, dihydrochalcones, flavan-3-ols et les anthocyanidines. L'exemple de l'apigénine, un flavone aglycone qui a plusieurs formes glycosilées : l'apigenin 7-glucoside, Apigenin 7-O-β-glucuronide**,** Apiin, Apigenin 7-O-neohesperidoside. Les formes glycosylées des anthocyanidines sont couramment appelées les anthocyanines. La glycosylation augmente la stabilité du composé et sa solubilité dans l'eau. *A contrario*, les groupes méthyl éther rendent le flavonoïde plus lipophile (Gachon et al., 2005; Gershenzon and Engelberth, 2010).

Les flavonoïdes sont très répandus dans les plantes et ce dans divers organes tels que les feuilles, les bourgeons et les racines. A ce jour plus de 4000 molécules sont décrites. Les flavonoïdes ont plusieurs rôles importants dans la plante en participant à l'attraction des pollinisateurs, à la communication entre les plantes et à l'établissement des mycorhizes (interaction entre les racines de la plante et les bactéries du sol) pour la fixation de l'azote (Gershenzon and Engelberth, 2010).

Les anthocyanines sont des flavonoïdes rouges ou bleus qui absorbent la couleur verte et protègent les chloroplastes. Ils sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits, d'où leur utilisation comme pigments et colorants (V. Dellus et al., 1997). Les autres flavonoïdes sont incolores ou jaunes dont le rôle consiste à protéger la plante des UV. Les flavones sont présents dans le pollen et ont un rôle dans la reproduction des plantes et le développement des graines (Gershenzon and Engelberth, 2010).

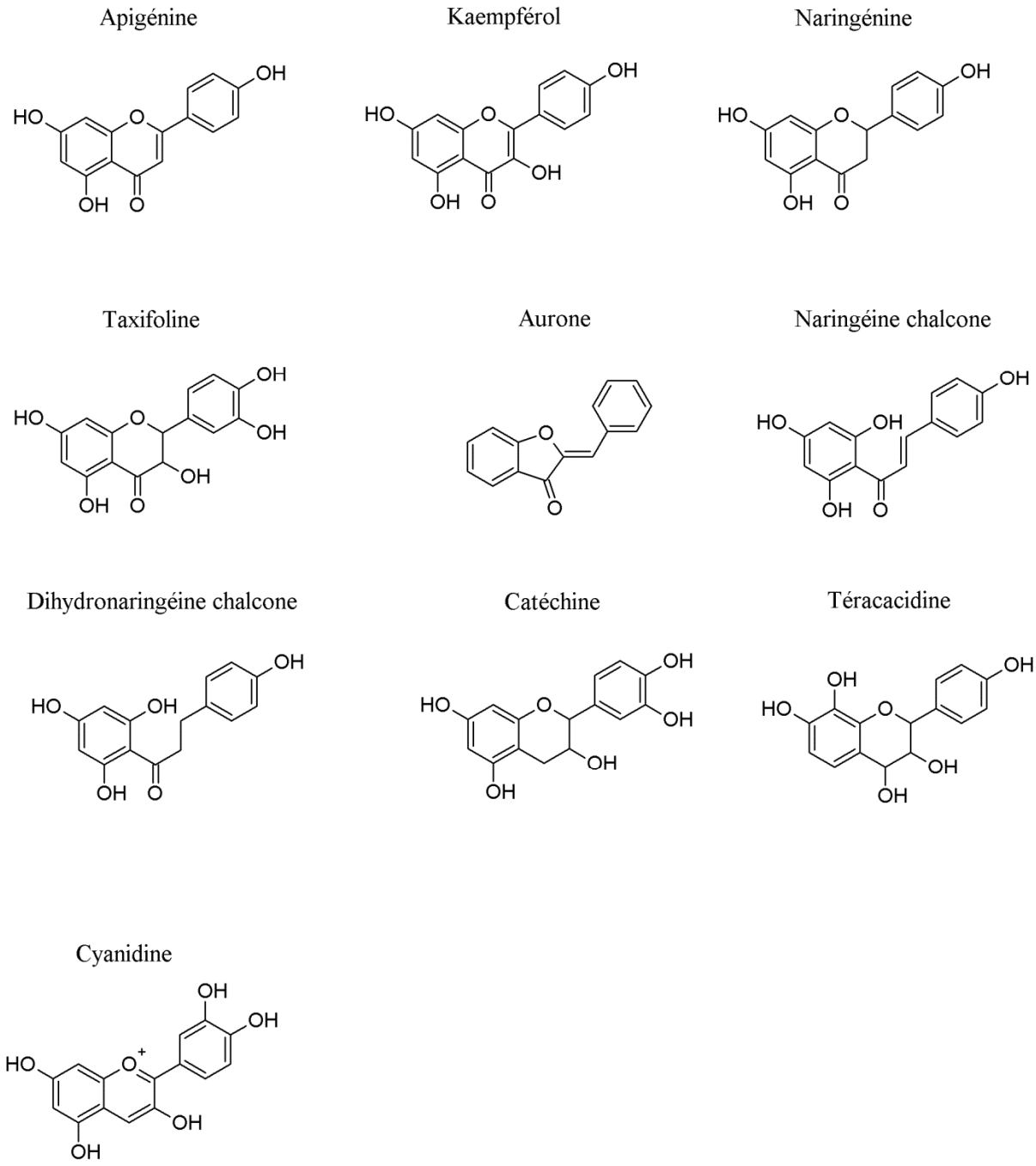


Figure 26 : Exemple de flavonoïdes.

2.1.2.4 Les tanins

Les esters de monomères phénoliques avec des monosaccharides (surtout le glucose) forment les tanins hydrolysables. On parle de gallotanins lorsque les monomères de base sont l'acide gallique et l'acide digallique. On parle de d'ellagitanins (castalagine et la vescalagine) lorsque l'acide ellagique est le monomère de base (Figures 27 et 28). Les espèces les plus riches en tanins hydrolysables appartiennent aux genres *Quercus*, *Castanea*, *Acacia* et *Eucalyptus*. Toutefois, cette catégorie de tanins est moins fréquente dans le bois que les tanins condensés (Mueller-Harvey, 2001).

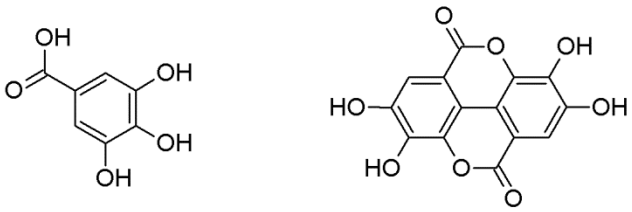


Figure 27 : L'acide gallique (à gauche) et l'acide ellagique (à droite).

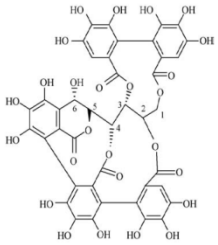


Figure 28 : La castalagine.

Les tanins condensés sont des polymères de flavan-3-ols et de flavan-3,4-diols et sont souvent appelés les proanthocyanidines (Figure 29). Ils sont quasiment toujours retrouvés accompagnés de la catéchine et de l'épicatéchine. Les tanins condensés sont surtout des extractibles des écorces (pins, épicéa, acacia) et du bois des espèces *Acacia* et *Schinopsis* (quebracho) (Hammerbacher et al., 2014; Krogell et al., 2012; Schofield et al., 2001; Yazaki and Hillis, 1977).

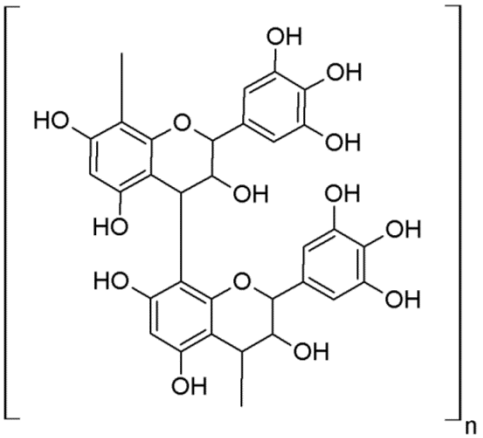


Figure 29 : Structure de base des tanins condensés.

2.1.3 Les autres composés extractibles

Les acides gras sont des hydrocarbures à longues chaines aliphatiques saturées ou non, pouvant contenir de 10 à 30 carbones, toujours en nombre paire. Les composés les plus répandus dans le bois sont l'acide palmitique et l'acide stéarique qui sont saturés alors que l'acide oléique, l'acide

linoléique et l'acide linolénique sont insaturés. Les esters d'acides gras avec le glycérol forment les graisses dont la composition est majoritairement sous forme de triglycérides (Figure 30).

Les alcools gras sont des hydrocarbures à longues chaines saturées tels que le docosanol ($C_{22}H_{45}OH$), le tetracosanol ($C_{24}H_{49}OH$) et l'octacosanol ($C_{28}H_{57}OH$). Enfin, les esters d'alcools gras et d'acides gras forment les cires. Dans ce cas, les corps gras peuvent aussi être des stérols et d'autres alcools terpéniques lourds (Figure 30).

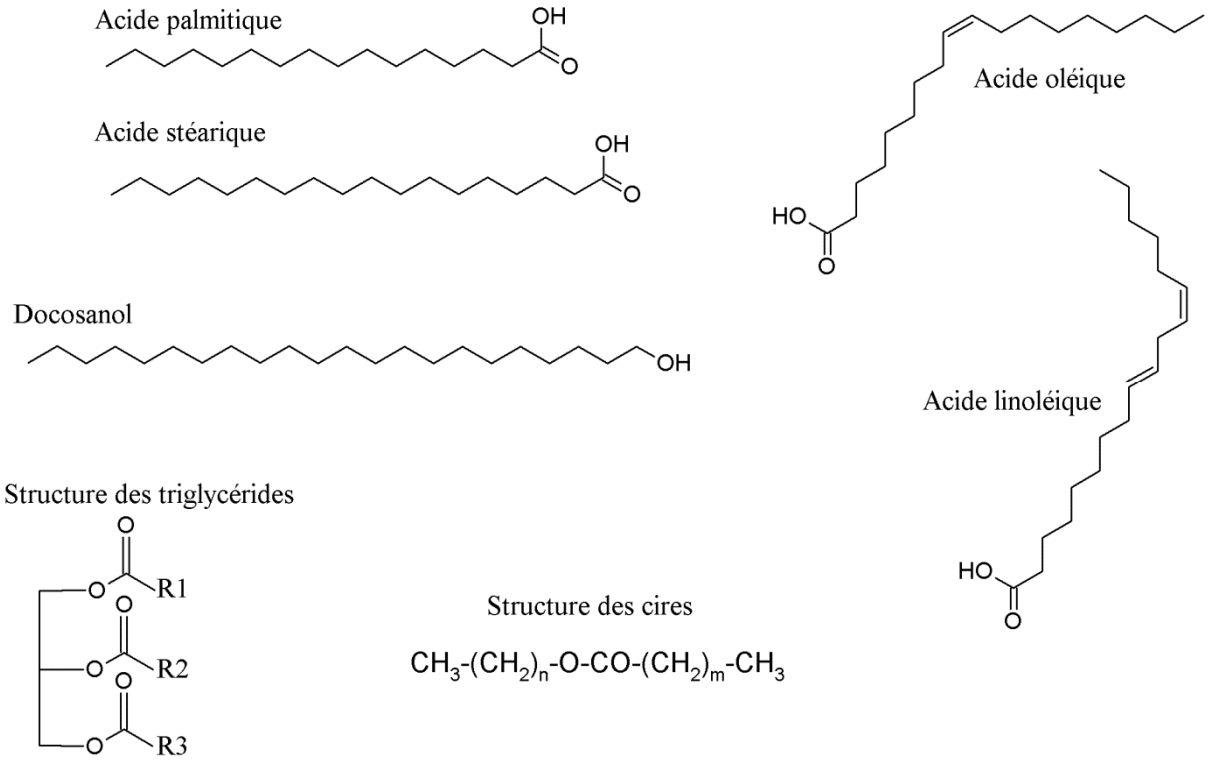


Figure 30 : Exemple de corps gras.

Les carbohydrates non structuraux désignent des glucides simples solubles dans l'eau chaude qui peuvent être sous forme de mono ou d'oligosaccharides ou bien appartenir aux pectines. Ces dernières sont des homo-polysaccharides d'acide galacturonique présents surtout dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules ainsi que dans les jeunes tissus du bois, c'est-à-dire le bois juvénile. Les gommes sont aussi des polysaccharides extractibles dont la structure est constituée d'unités galactopyrannoses liées par des liaisons β-(1,3). L'arabinogalactane dans le mélèze est aussi considéré comme extractible (Côté et al., 1966). Il s'agit d'un polymère très ramifié dont le monomère est le galactopyranose (Figure 31).

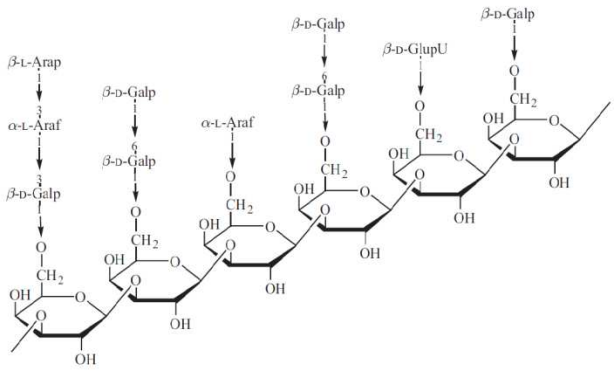


Figure 31 : Structure partielle de l'arabinogalactane du mélèze.

Enfin l'amidon est un polysaccharide de glucose dont la liaison α-osidique est plus facile à rompre que la liaison β-(1,4) de la cellulose. L'amidon est considéré comme le principal composé de réserve et se présente sous forme de granules solubles dans l'eau.

2.2 Rôles des extractibles du bois

Dans le bois, la duraminisation et la réaction de défense face à une blessure sont deux évènements déclenchant la synthèse des extractibles qui participeraient à la résistance du bois grâce à leurs propriétés de biocides, d'antioxydants et/ou de chélateurs de métaux (Singh and Singh, 2012).

2.2.1 Durabilité du bois

Les extractibles formés lors de la duraminisation sont souvent spécifiques à une essence, probablement induits par des pathogènes au cours de l'évolution et ont été transmis par hérédité. Il existe deux types de duraminisation : celle suivant le modèle du robinier (elle est majoritaire chez les arbres) où le processus de synthèse des flavonoïdes se déroule dans la zone de transition. Dans la duraminisation de type « noyer » (chez le noyer, le merisier et le pin), les extractibles sont synthétisés à partir de précurseurs accumulés dans l'aubier mature (Beritognolo et al., 2002; Burtin et al., 1998; Magel et al., 1994, 2001a).

2.2.1.1 Formation des extractibles : les réserves et les enzymes

La formation des extractibles lors de la duraminisation nécessite la mobilisation des réserves accumulées dans les cellules de parenchyme vivantes. Hillis and Hasegawa (1963) ont injecté du glucose marqué au ^{14}C au niveau du phloème et ils ont observé que dix-neuf jours après, ce glucose a atteint la zone de transition entre l'aubier et le duramen et a servi dans la synthèse de polyphénols chez l'eucalyptus. Cette interaction entre le métabolisme primaire et secondaire a été depuis confirmée. Ainsi les quantités d'amidon sont maximales dans l'aubier et elles diminuent jusqu'à la zone de transition et elles sont quasi nulles dans le duramen externe (Bergström, 2003; Magel, 2000; Magel et al., 1994). Concernant les autres carbohydrates, leurs quantités ainsi que les gènes et les enzymes les régulant sont aussi remarquables dans la zone de transition (Hauch and Magel, 1998;

Magel et al., 1994; Yang et al., 2004). D'autre part, la voie des pentoses phosphates oxyde le glucose pour produire des précurseurs de nucléotides, d'acides aminés aromatiques et de métabolites secondaires. Les enzymes de cette voie s'expriment en avril lors de la différentiation du xylème et servent à former la paroi cellulaire, et en septembre dans la zone de transition (Magel et al., 2001b).

Enfin, le métabolisme général de l'acide shikimique convertit les carbohydrates simples issus de l'hydrolyse des réserves en trois acides aminés aromatiques qui sont la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. La plupart des phénols végétaux dérivent de la phénylalanine (PAL). PAL est alors une enzyme clé dans la biosynthèse des phénols dont l'activité est influencée par le niveau de nutriments, de lumière et par les infections fongiques. L'enzyme chalcone synthase (CHS) déclenche la condensation de 4-coumaryol-CoA et de malonyl-CoA pour former une chalcone qui est à l'origine de la synthèse des flavonoïdes (Figure ci-dessous). Ces deux enzymes s'expriment dans la zone de transition aubier-duramen entre septembre et novembre (Beritognolo et al., 2002; De Filippis and Magel, 2012; Gershenzon and Engelberth, 2010; Magel, 2000; Magel and Hübner, 1997; Magel et al., 1991).

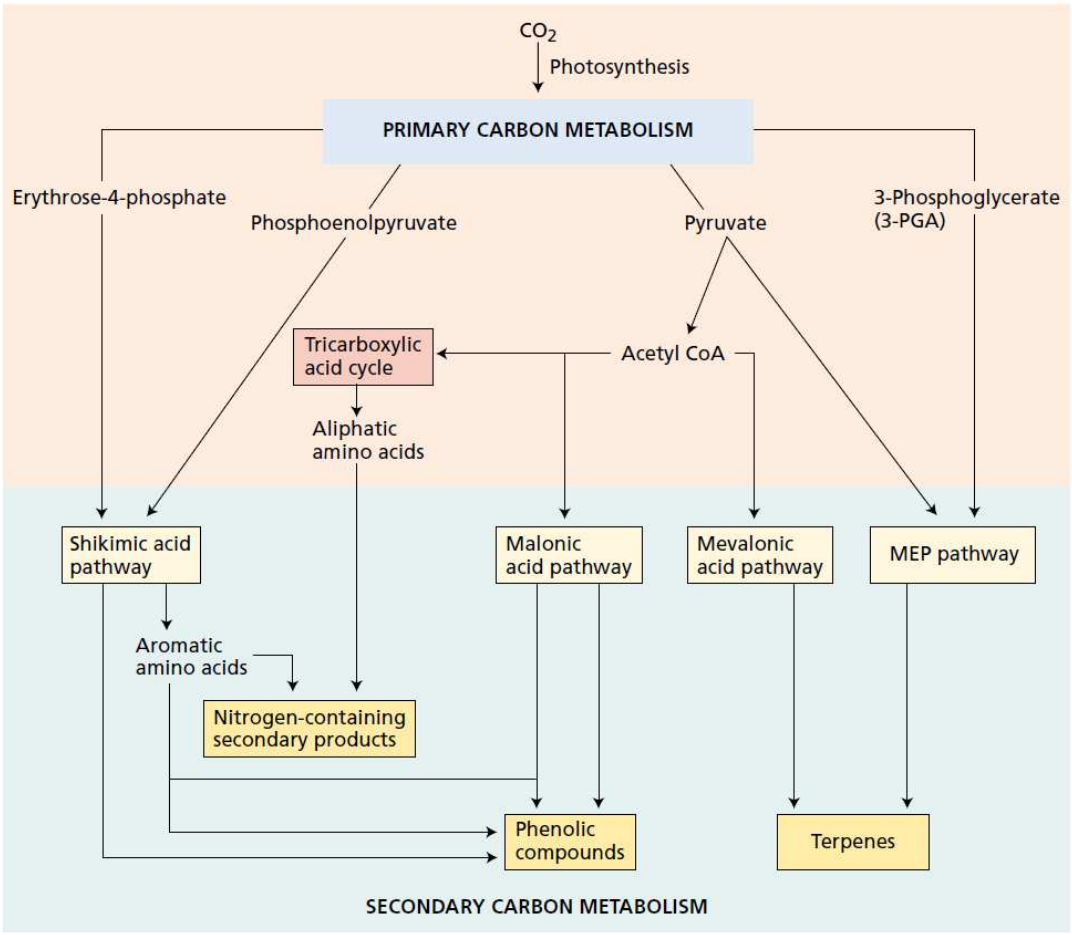


Figure 32 : Interaction entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. (©Sinauer Associates, Sunderland MA 2010)

2.2.1.2 Localisation des extractibles

Les activités de PAL et de CHS ont été précisément localisées dans le bois de printemps de l'aubier mature en cours de transformation en duramen (Kuroda et al., 2014; Magel and Hübner, 1997; Magel et al., 1991). Dans le cas du mélèze, Côté et al., (1966) ont localisé les extraits phénoliques dans la zone de transition duramen-aubier uniquement dans les cellules de rayons et non pas dans les trachéides. La biosynthèse des extractibles commencerait donc dans le parenchyme du bois initial. Par ailleurs, Kuo and Arganbright (1980a, 1980b) ont démontré que les extractibles du duramen externe sont surtout présents dans les cavités des cellules du sequoia et du cèdre, alors que les extractibles du duramen intermédiaire sont surtout localisés dans les parois cellulaires. Il y a donc une imprégnation progressive des lumens puis des parois végétales par les extractibles. Les lumens des trachéides de printemps étant plus larges, il est alors possible que les extractibles commencent par diffuser dans ces espaces faciles d'accès (Kuo and Arganbright, 1980a, 1980b). La solubilité des composés conditionne probablement la localisation des extraits. Ainsi, les molécules apolaires restent dans les lumens et les espaces intercellulaires et les substances polaires, souvent glycosilées, diffusent plus facilement dans les parois (Golpayegani et al., 2012; Hernandez, 2007a).

Par la suite, les concentrations en extractibles diminuent depuis la zone de transition en se dirigeant vers la moelle (Bergström, 2003; Beritognolo et al., 2002; Côté et al., 1966; Hillis, 1960, 1971; Kuo and Arganbright, 1980b; Magel et al., 1994; Nault, 1988; Pâques et al., 2012). Cette diminution dans le duramen mature est associée au vieillissement des extraits subissant des modifications, des oxydations et de la polymérisation. De plus, le taux d'extractibles est dépendant des cellules de parenchyme formées et présentes dans la zone de transition au début de synthèse des molécules ainsi que des réserves disponibles, et donc des conditions environnementales ayant permis de produire plus de biomasse ou plus de composés de stockage (Kuroda et al., 2014; Magel, 2000; Taylor et al., 2002).

2.2.1.3 Durabilité du bois conférée par les extractibles

Le processus de duraminisation et surtout l'imprégnation du duramen par des composés bioactifs fait partie du mécanisme de défense constitutif des arbres vivants. Les essences les plus durables sont souvent celles qui contiennent le plus d'extractibles telles que les bois tropicaux, mais aussi les essences des zones tempérées à aubier différencié (mélèze, douglas, pins, if, robinier, chêne) alors que les essences à aubier non différencié sont réputées non durables (hêtre, épicéa, sapin) (Daniewski et al., 1998; Gierlinger et al., 2003, 2004; Guleria et al., 2011; Kirker et al., 2013; Niamke et al., 2011; Srinivasan et al., 1999). Le dépôt des extractibles mais aussi les caractéristiques anatomiques du duramen (thyloses, fermeture des ponctuations, etc.) rendent le bois de cœur plus résistant aux attaques pathogéniques, plus dense et plus imperméable.

Toutefois, si un pathogène attaque l'arbre par le duramen, ce dernier n'est qu'une barrière passive contre la progression du champignon, car il est dépourvu de cellules de parenchyme vivantes pour réagir, et peut donc devenir une ressource de carbone (Schwarze et al., 1997; Taylor et al., 2002). Dans plusieurs études il n'a pas été permis de relier les extractibles à la durabilité du bois dans l'arbre vivant (Curnel et al., 2008; Hart, 1979; Kelsey and Harmon, 1989; Manter et al., 2007; Srinivasan et al., 1999; Taylor et al., 2002). Pour exemple, des bois malaysiens présentent des résistances insuffisantes aux pathogènes malgré leur fort taux d'extractibles (Kawamura et al., 2010). Beal et al., (2010) ont aussi mené une étude de résistance du bois laissé en forêt après abattage et ils ont constaté que l'épicéa (*P. abies* et *P. sitka*) est moins susceptible aux champignons de coloration que le bois de pin (*P. sylvestris* et *P. contorta*). De manière générale, le pin sylvestre sur pied répond moins efficacement aux attaques que l'épicéa commun (Nagy et al., 2000, 2006) alors que le pin possède un duramen coloré.

Ces différences de résistance des arbres aux pathogènes peuvent être expliquées par plusieurs facteurs. La distribution des extractibles dans les différentes zones du duramen et dans les différents types de cellules évoquée précédemment peut plus ou moins bloquer la progression des champignons (Taylor et al., 2002). Les microorganismes ont aussi la capacité d'éviter les zones riches en composés toxiques ou les zones dépourvus de nutriments tels que l'amidon (Hudgins et al., 2005; Little et al., 2010; Taylor et al., 2002). Enfin, les pathogènes peuvent aussi détoxiquer les composés présents dans le bois (Baldwin, 2010; Dorado et al., 2000; Hudgins et al., 2005). Ainsi, quand le champignon *Raffaelea quercivora* (transporté par *Platypus quercivorus*) attaque le chêne *Q. crispula*, il dégrade les tanins hydrolysables avec son enzyme : la tananse. Cette réaction produit de l'acide gallique en grande quantité, mais le champignon l'oxyde rapidement avec la laccase pour le rendre inoffensif pour sa croissance (Imai et al., 2009a, 2013). Néanmoins, le nouveau produit (l'acide purprogallin) est responsable de l'apparition d'une coloration jaunâtre qui agirait comme répulsif contre les insectes et éviterait ainsi une sur-contamination. En fait, les essais antifongiques et antioxydants sont menés *in vitro* loin des conditions réelles en forêt, par conséquent il est difficile de conclure quant aux rôles des extractibles dans la résistance des arbres (Chong et al., 2009; Shain and Hillis, 1971; Taylor et al., 2002). Hart (1979) a ainsi démontré que l'efficacité des stilbènes en tant que fongicides est réduite de 50 à 100 % en passant des tests sur agar aux tests sur bois.

Le moyen de défense le plus important du bois, et surtout du cambium, est l'écorce qui l'entoure (Hudgins et al., 2003). En effet, très peu de pathogènes peuvent l'attaquer directement car elle est riche en subérine, un polymère aliphatique d'acides gras hydrophobe et très durable. L'écorce contient aussi des composés terpéniques et phénoliques, tels que les tanins (Ferreira et al., 2015; Kelsey and Harmon, 1989). Les tanins sont des répulsifs et ils sont capables de se lier aux protéines

des herbivores et inhiber leurs enzymes digestives et former ainsi un composé indigeste. D'autre part, l'aubier, qui est la partie vitale de l'arbre, est protégé par sa faible oxygénation et sa forte humidité loin de l'optimum de survie des champignons comprise entre 30 et 50 %. L'aubier peut aussi réagir aux infections car il contient des cellules vivantes contrairement au duramen. Ces modes de prévention rendent l'aubier des arbres en forêt plus durable face aux microorganismes que le duramen (Pearce, 1996). Gottlieb (1990) soutient que le rôle protecteur des métabolites secondaires est apparu par accident de l'évolution et ne serait pas prédéterminé.

2.2.1.4 Contribution biomécanique des extractibles

Les extractibles n'ont pas de rôle biomécanique à proprement dit mais leur localisation dans les parois et les cavités cellulaires peut influencer les propriétés mécaniques du duramen. Les extractibles contribuent à la densité du bois à cause de leur apport massique. Ainsi les arabinogalactanes, les principaux composés extraits du bois de mélèze, augmentent la densité de ce bois malgré leur localisation dans le lumen et non pas dans les parois des trachéides (Côté et al., 1966; Grabner et al., 2005a). La présence d'extractibles a aussi été corrélée à plusieurs propriétés mécaniques du bois tel que le module d'élasticité et la résistance à la compression, l'amortissement, le retrait volumique (Arganbright, 1970; Bremaud et al., 2010, 2012; Golpayegani et al., 2012; Grabner et al., 2005b; Hernandez, 2007a, 2007b; Kuo and Arganbright, 1980a; Luostarinen and Heräjärvi, 2013; Morgan and Orsler, 1969a, 1969b; Song et al., 2014; Tomppo et al., 2009; Yano, 1994). Les extractibles participent aussi à l'amélioration de la stabilité dimensionnelle du duramen. En effet, les extractibles réduisent l'humidité d'équilibre du duramen en s'insérant dans les zones amorphes des parois et en occupant les sites des liaisons hydrogène (Hernandez, 2007c; Hillis, 1971; Kuo and Arganbright, 1980a, 1980b; Song et al., 2014; Torelli et al., 2006). Enfin, la robinétine et le kaempférol sont des flavonoïdes qui ont été localisés dans les membranes des ponctuations permettant la communication entre les vaisseaux et le parenchyme ; ils participent alors au caractère imperméable du duramen (Koch et al., 2006).

Il a été prouvé que les stimuli mécaniques impliquent les mêmes réponses de la part des cellules que des stimuli biologiques (Jayaraman et al., 2014; Oven and Torelli, 1994; Pearce, 1996; Witzell and Martin, 2008). Ainsi, la réalisation de trous dans le xylème de pin maritime vivant a induit la sécrétion de résines par le tronc et l'augmentation de phénols dans les aiguilles (Moreira et al., 2012). Le pin sylvestre synthétise aussi des stilbènes et des lignanes suite à des perforations artificielles de son xylème (Harju et al., 2009). L'haubanage de pins radiata a montré la réduction de la survenue de poches de résine, probablement due à la réduction des blessures du cambium causées par le balancement au vent (Watt et al., 2009).

2.2.2 Formation des extractibles en réponse à une blessure

Il existe plusieurs modes d'attaque du bois par les champignons : les plus virulents sont ceux qui attaquent l'aubier sain par une pénétration directe ou en profitant d'une blessure (infection par les herbivores, les nœuds, zone d'abscission des feuilles, fissures causées par le gel, etc.) ; d'autres moins spécialisés s'installent progressivement dans l'arbre vivant. Certains pathogènes (rares) pénètrent par l'écorce et d'autres s'attaquent au bois en dépérissement car plus fragile (Deflorio et al., 2008; Pearce, 1996).

Après une infection, plusieurs réactions se déclenchent. L'arbre détecte la présence d'un microorganisme via des molécules élicitrices que ce pathogène émet (toxines et enzymes extracellulaires, espèces réactives à l'oxygène). L'arbre synthétise et accumule des éléments chimiques, des molécules et des enzymes (calcium, potassium, magnésium, éthylène, chitinase, les peroxydases, PAL, CHS, jasmonates, etc.) qui déclenchent les modifications anatomiques et chimiques pour faire face (Aufsess, 1984; Fink, 1986; Fossdal et al., 2006; Hudgins et al., 2003; Krokene et al., 2008; Nagy et al., 2004; Pearce, 1996; Ralph et al., 2006; Shain and Hillis, 1973b). Chez les résineux, l'aubier et le phloème réagissent en produisant des canaux résinifères traumatiques pour synthétiser de la résine (Fink, 1986; Hudgins and Franceschi, 2004; Hudgins et al., 2003, 2004; Krokene et al., 2008; Nagy et al., 2000). Nagy et al., (2000) et Krekling et al., (2004) ont observé la présence de canaux fonctionnels respectivement 18 et 16 jours après le traitement d'induction. Les canaux sécrètent des terpènes avec de multiples propriétés. Les monoterpènes sont efficaces pour lutter contre les insectes, surtout les scolytes qui sont des vecteurs d'autres microorganismes. Les monoterpènes et les sesquiterpènes agissent aussi comme répulsifs de par leur volatilité. La juvabione est un sesquiterpène oxygéné, identifié dans le genre *Abies*, qui imite des hormones juvéniles d'insectes et provoque l'inhibition de la croissance des coléoptères (Yang et al., 2008).

Plus intéressante est la composition de cette résine issue des canaux traumatiques. Haworth and Kelly (1937) ont identifié le laricirésinol et ses dérivés (lignanes) comme les constituants de la résine traumatique du mélèze. Nagy et al., (2000) ont constaté que l'enzyme PAL est localisée dans les cellules épithéliales de ces canaux. Ces derniers sont aussi entourés par davantage de cellules de parenchyme dans lesquelles des colorations chimiques ont mis en évidence la présence de phénols. Holmbom et al., (2008) ont étudié la composition des résines issues des canaux normaux et traumatiques. Les premières sont constituées uniquement par des terpènes (acides résiniques) alors que les résines « traumatiques » contiennent davantage de lignanes et peu de terpènes. Ce recours aux phénols est certainement destiné à augmenter la toxicité des résines « normales » (Nagy et al., 2000).

Suite à une infection, l'arbre tente de l'isoler en provoquant la mort des cellules adjacentes pour priver le pathogène de nutriments. Oven and Torelli (1994) ont détecté la présence d'un tissu nécrosé 6 à 9 jours après une infection. La compartimentalisation de l'infection et la formation d'une zone de réaction ont été proposées par Shain and Hillis (1971) et Shigo (1985) sous forme de barrière statique pour créer un environnement hostile à la propagation du pathogène (Figure 33). Le bois formé suite à une infection est dit « bois blessé » caractérisé par un cal cicatriciel et un bois altéré riche en phénols et terpènes souvent absents du bois sain (Aufsess, 1984; Deflorio et al., 2008; Eyles et al., 2003; Hillis, 1975; Pearce, 1996; Vek et al., 2013). Les extractibles agiraient alors comme des phytoalexines. Les phytoalexines sont des substances antimicrobiennes de familles chimiques différentes et qui s'accumulent rapidement autour de l'infection bactérienne ou fongique alors qu'ils sont absents dans les tissus sains (Gershenzon and Engelberth, 2010; Marouf and Reynaud, 2007).

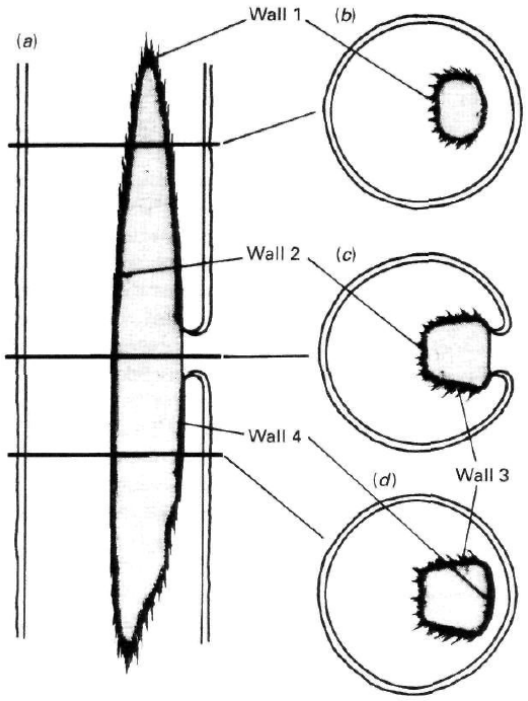


Figure 33 : Coupes longitudinale (a) et transversales (b-d) d'une zone de compartimentalisation d'une infection. Les différentes barrières (wall 1-4) délimitent la zone. (©Wiley-Blackwell, Hoboken NJ 1996)

L'aubier et le phloème réagissent aussi en formant plus de cellules de parenchyme qui synthétisent des phénols (Eyles et al., 2003; Nagy et al., 2004; Vek et al., 2013). Les gènes et les protéines dirigeantes impliqués dans la synthèse des métabolites secondaires sont détectés dans les zones entourant l'infection (Ralph et al., 2006, 2008; Suzuki and Umezawa, 2007) et l'accumulation des phénols est observée quelques jours après l'infection (Hillis and Hasegawa, 1963; Krekling et al., 2004; Nagy et al., 2006; Oven and Torelli, 1994). Les propriétés de chélation des métaux peuvent être

le moyen d'action des phénols puisque les champignons ont besoin de ces métaux pour générer des radicaux libres et endommager la paroi végétale (Goodell et al., 1997; Schultz and Nicholas, 2000, 2002; Schultz et al., 2007). Les capacités antioxydantes des extractibles sont alors probablement un autre moyen de lutte contre le champignon. Selon Schultz and Nicholas (2000), les extractibles auraient donc un rôle dans les premiers stades de développement du pathogène.

De plus, la lignification et la subérification des cellules sont d'autres réactions qui forment des polymères hydrophobes et plus résistants aux champignons (Eyles et al., 2003; Oven and Torelli, 1994; Pearce, 1996). La subérine se dépose aussi dans les tyloses qui sont déjà un mécanisme de défense constitutif. De plus, ces polymères formeraient une couche d'étanchéité pour éviter la déshydratation de l'aubier et son oxygénation, ce qui formerait un environnement favorable au développement fongique. Witzell and Martin (2008) soutiennent que le rôle primaire des extractibles du bois n'est pas d'être des antifongiques mais peut être de contribuer à la résistance de manière indirecte, en servant de précurseurs à la lignine, aux tanins, à la subérine qui eux sont de réels moyens de défense. Enfin, les extractibles participeraient au renforcement de la paroi cellulaire en établissant des liaisons entre les polymères (Chong et al., 2009; Eyles et al., 2003; Song et al., 2014).

La résistance d'un arbre aux pathogènes est certainement une équation à plusieurs variables dont les plus importantes sont la densité du bois (liée principalement à la lignification des parois), la teneur en eau et les extractibles. L'hétérogénéité de ces derniers, leurs propriétés physico-chimiques, leur action synergétique et leur localisation dans les cellules (parois ou lumens) ne font qu'augmenter le spectre de leurs modes d'actions. La synthèse des extractibles peut être spécifique ou non spécifique contre un pathogène spécialisé ou non. Les extractibles en tant qu'ensemble de composés chimiques avec des propriétés différentes agiraient de manière active et synergétique pour être le plus efficace possible contre le grand nombre de prédateurs (champignons, bactéries, insectes, herbivores, etc.). La biosynthèse des extractibles sert aussi de signal chimique en direction du reste de l'arbre et des arbres voisins pour prévenir du danger, ou même d'attracteur des prédateurs du pathogène lui-même (Baldwin, 2010; Baldwin and Schultz, 1983; Baldwin et al., 2002; Chong et al., 2009; Eyles et al., 2010; Moreira et al., 2012; Witzell and Martin, 2008).

Par ailleurs, les réactions de défense dépendent aussi de l'espèce ligneuse (génétique, provenance des espèces), du mode d'attaque du pathogène et des conditions environnementales. Enfin, de manière plus générale, les plantes répondent aux stress abiotiques par l'augmentation de la synthèse de composés secondaires. Les facteurs les plus étudiés sont la température, l'ozone, les UV, le CO_2, la sécheresse, le gel, la fertilité des sols, la situation géographique, etc. (Guchu et al., 2006; Prida and Puech, 2006; Ramakrishna and Ravishankar, 2011; Rosemann et al., 1991; Taylor et al., 2002).

3 Les extractibles dans les nœuds et les branches

3.1 Fonction de défense des nœuds

En plus des fonctions mécanique et hydraulique évoquées précédemment, les nœuds doivent aussi assurer la fonction de protection de l'arbre surtout quand les branches sont mortes ou coupées. Il est probable que le changement d'orientation du fil du bois dans les nœuds soit une sorte de barrière à la prolifération des pathogènes. Le rôle protecteur des jonctions entre les branches et le tronc a été surtout étudié dans le but de comprendre et d'optimiser le mode d'élagage artificiel des branches pour éviter une infection du tronc sain (voir O'Hara, 2007 pour une revue ; Chen et al., 2015). En effet, la coupe d'une branche provoque une aspiration d'air et l'aspiration des spores qu'il transporte. Ceci peut provoquer des réactions oxydatives et surtout la prolifération des pathogènes (Grosclaude, 1993). Le ratio entre le diamètre de la branche et celui du tronc est un bon indicateur de l'ampleur de la décoloration possible dans le tronc (Eisner et al., 2002b; Gilman and Grabosky, 2006), (Figure 34). D'autre part, il a été démontré que les nœuds d'érable présentant une forte conductivité hydrique et ceux dont la moelle est directement connectée à celle du tronc, sont plus susceptibles de causer une décoloration dans le tronc principal si les branches sont coupées (Eisner et al., 2002a, 2002b). L'ampleur de la décoloration est plus prononcée chez les espèces à bois blanc que chez les espèces à duramen coloré et ce dans la direction longitudinale par rapport aux deux autres directions (Deflorio et al., 2007, 2008). Enfin, Shigo (1985) a observé que le bourrelet d'insertion des branches âgées et larges n'est pas complètement connecté au tronc sur la face inférieure. Par conséquent, le phellogène (méristème secondaire à l'extérieur du cambium) peut être directement exposé à l'air et aux pathogènes.



Figure 34 : Décoloration de l'aubier suite à la mort des branches chez le mélèze.

3.2 Mise en place de la zone de protection de la branche

Quand une branche décline, des communautés fongiques la dégradent progressivement (Boddy and Rayner, 1984; Boddy and Thompson, 1983; Boddy et al., 1987; Chapela and Boddy, 1988a, 1988b), il

est donc essentiel que ces pathogènes ne pénètrent pas dans l'arbre. Par la suite, une fois la branche morte, le nœud non adhérent n'est plus relié au tronc à cause des fissures apparaissant autour du nœud. Des réactions chimiques se produisent à la base de la branche pour l'isoler du reste du tronc sain et prévenir l'entrée d'air, d'eau et de pathogènes. Dans le cas des résineux, cette zone rougeâtre est délimitée par un cône au niveau du nœud et dans lequel le xylème est très concentré en résines imperméabilisantes. Dans le cas des feuillus, c'est une zone de protection sombre enrichie en composés chimiques qui se met en place au niveau des nœuds (Aufsess, 1984; Gilman and Grabosky, 2006; Klein, 1992; Shigo, 1985) (Figure 35). Klein (1992) soutient que ces zones chimiquement riches à la base des branches sont toujours présentes quel que soit l'état de vigueur de la branche.

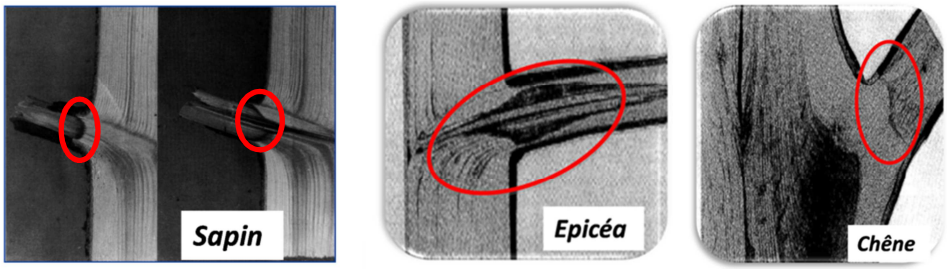


Figure 35 : Zone de protection de la branche encerclée en rouge chez le sapin (©J. D. Sauerländers Verlag, Bad Orb 1992) et chez l'épicéa et le chêne (©Brill, Leiden 1984)

Ainsi, dans les jonctions blessées, les vaisseaux du chêne noir ont été bouchés par des thylles alors que ceux d'érables, de bouleau et de peuplier l'ont été par des gommes (Aloni et al., 1997; Zimmermann, 1978). Le dépôt de thylles ou de gommes dépend de la largeur des ponctuations des vaisseaux. Ainsi les thylles se mettent en place pour des diamètres supérieurs à 10 µm ; sinon en deçà, ce sont les gommes qui imprègnent les vaisseaux (Grosclaude, 1993).

3.3 Composition chimique des nœuds et des branches

3.3.1 Les extractibles dans le duramen des branches

L'étude de la composition du duramen des branches a reçu peu d'intérêt par rapport au duramen du tronc. Toutefois, les rares études traitant de ce sujet montrent des singularités chimiques. Hasegawa and Shirato (1959) ont détecté de l'isoolivil dans le bois de branche du merisier attaquée par *Coriolus versicolor* ; or ce lignane n'a jamais été rapporté chez cette espèce. Par ailleurs, les flavonoïdes habituellement caractéristiques du merisier (l'isosakuranine et l'isosakuranetine) étaient absents du bois de cette branche. McNulty et al., (2009) ont aussi détecté de la catéchine et du dihydrokaempférol dans les branches du merisier alors qu'ils sont absents du duramen du tronc (Vinciguerra et al., 2003). De plus, ces branches se caractérisent par l'absence de pinocembrine, de pinostrobine et de chrysine habituellement présents dans le tronc (Vinciguerra et al., 2003). Le lyonirésinol a été détecté dans les branches de l'*Eucalyptus maideni* (Tian et al., 2012). Côté et al.,

(1966) ont comparé les taux d'arbainogalactane dans différents bois de mélèze et la plus forte concentration a été retrouvée dans la partie inférieure des branches (20,8 %). Cette partie inférieure est constituée par du bois de compression alors que les auteurs ont trouvé que le bois de compression du duramen du tronc ne contenait que (7,03 %). Deflorio et al., (2007) ont rapporté que l'aubier des branches contient 4,7 à 6,3 fois plus de phénols que l'aubier du tronc chez deux espèces d'Eucalyptus. Hsieh and Chang (2010) ont établi que le diamètre des branches d'acacia confusa avait un effet positif sur les concentrations en phénols et le pouvoir antioxydant de ces derniers. Morikawa et al., (2012, 2014) ont trouvé que le duramen des branches du cyprès du Japon (*Chamaecyparis obtusa*) contiennent 1,6 à 12,1 fois plus d'extraits que le duramen du tronc. De plus, les extraits des branches sont composés de terpènes, de lignanes et de norlignanes ; or ces phénylpropanoïdes sont très peu détectés dans le tronc. Les auteurs ont mis en évidence l'action synergétique des extraits car les terpènes causent la mortalité des termites alors que les lignanes et les norlignanes n'ont pas cette propriété létale bien qu'ils soient d'excellents répulsifs. Si et al., (2013) ont identifié un nouveau composé : un lignane glucoside nommé phyllirine-6''-α-rhamnoside, extrait du bois de branche du pin gris (*Pinus banksiana*) en plus de quatre autres composés phénoliques connus mais jamais répertoriés pour cette essence (isoconiférine, l'acide caféique, la cedrusine et la phillyrine). Backlund et al., (2014) ont quantifié les extraits dans différentes parties du pin tordu (*Pinus contorta*) et les résultats montrent que les branches possèdent plus d'extraits lipophiles (7,4 ± 1,7 %) que le tronc (1,6 ± 1,4 et 0,8 ± 0,4 %). L'analyse de ces extraits a permis d'identifier les acides résiniques (acide abiétique, acide pimarique et acide dehydroabiétique) uniquement dans les branches.

3.3.2 Les extractibles dans le duramen des nœuds

La richesse des nœuds en composés chimiques a été certainement remarquée de longue date dans les papeteries et les usines à pâtes (Trendelenburg, 1936), et/ou supposée à cause de la présence de la zone de protection de la branche (Aufsess, 1984; Shigo, 1985), mais peu d'études traitent de ce sujet. Köester (1934) avait trouvé que les nœuds d'épicéa contiennent dix fois plus de résines que le duramen du tronc (rapporté par (O'Hara, 2007)). Anderegg and Rowe (1974) ont analysé les nœuds d'araucaria du Brésil (pin de Paraná) demeurés en forêt sans se dégrader. Leur composition chimique a révélé des concentrations élevées (30 % d'extraits) majoritairement sous forme de lignanes (secoisolaricirésinol, isolaricirésinol, pinorésinol, hinokirésinol). Ohashi et al., (1992) ont complété la composition des nœuds de cette espèce avec l'identification de deux norlignanes (cryptorésinol et 2,3-Bis-(p-hydroxyphény)-2-cyclopentene-1-one) et d'une dihydroxychalcone. La composition chimique des nœuds de chêne (sessile et pédonculé) montre la richesse de ce bois en extractibles, en lignines, en hémicelluloses et en minéraux mais une diminution de la cellulose (Krutul and Sacharczuk, 1997; Krutul et al., 2004, 2007). Les nœuds du pin contiennent des quantités

importantes de minéraux comparativement au duramen et à l'aubier (Krutul, 1996). Caron et al., (2013) ont aussi constaté que les nœuds de l'épicéa de Sitka contiennent dix fois plus d'extraits à l'acétone que le duramen et l'aubier. Récemment, plusieurs études ont été consacrées à l'identification de composés dans les nœuds de plusieurs espèces (Ekman et al., 2002; Neacsu et al., 2007a; Smeds et al., 2012a; Willför et al., 2005a, 2006).

Dans la suite, une revue des études menées récemment sur cette thématique est présentée. Les travaux sur la caractérisation des extractibles dans les nœuds ne sont qu'à leur balbutiement, il est donc difficile de dégager des tendances et des conclusions quant à la présence et la répartition des composés extractibles dans les nœuds. Toutefois, la principale conclusion de ces études est la richesse du bois de nœuds en extractibles par rapport aux bois du tronc (aubier et duramen). Par ailleurs, il existe de fortes variabilités quantitatives et qualitatives des extraits nodaux, que ce soit entre espèces, entre arbres et même entre les nœuds d'un même arbre.

3.3.2.1 Variabilité inter-genres des extractibles nodaux

Plusieurs genres, essentiellement des régions tempérées, ont été étudiés pour en identifier les extractibles nodaux. Plus spécialement ce sont les bois servant habituellement à la fabrication des pâtes à papier qui ont été les plus étudiés : *Picea*, *Pinus*, *Abies* mais aussi *Eucalyptus*. D'autres résineux tels que *Larix*, *Pseudotsuga*, *Thuja*, *Tsuga*, et quelques feuillus tels que *Fagus*, *Acacia*, *Populus*, *Salix, Betula*, etc. sont maintenant bien documentés pour la richesse de leurs nœuds.

Une des principales conclusions de ces études est la distinction des principales familles d'extractibles entre les nœuds de résineux et les nœuds de feuillus. En effet, les lignanes ont été quasi exclusivement détectés dans les nœuds de résineux. Seuls Lindberg et al., (2004) ont répertorié des lignanes dans les nœuds du bouleau et du hêtre sans en préciser le(s) composé(s). Hartonen et al., (2007) ont extrait des lignanes des nœuds du peuplier uniquement sous certaines conditions opératoires. Ainsi l'eau pressurisée chauffée à 200-250 °C a permis de détecter des traces de syringarésinol et d'isolaricirésinol, alors que l'eau à 150-200 °C a extrait le mediorésinol, et l'eau à 50-150 °C a extrait le pinorésinol. Les stilbènes ont été rapportés principalement dans le genre *Pinus*. Enfin, les flavonoïdes ont été détectés dans plusieurs genres, avec une dominance chez les feuillus.

Les molécules individuelles majoritaires dans les extractibles des nœuds diffèrent aussi d'un genre à l'autre. La nortrachelogénine est le lignane majoritaire chez le genre *Pinus* et *Pseudotsuga*, et elle est présente en traces chez quelques espèces d'épicéa (*Picea omorika* et *P. pungens)* et de sapins (*Abies amabilis*) (Willför et al., 2003a, 2004a, 2004b). L'hydroxymatairésinol est le lignane majoritaire dans les nœuds de nombreux épicéas et des Tsuga (*T. canadensis* et *T. heterophylla*) (Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003b, 2004a) ; seuls les sapins en possèdent en plus petites quantités. Enfin, le

secoisolaricirésinol est le lignane majoritaire chez les sapins, les mélèzes et le Douglas (Willför et al., 2004b, 2003c). Les autres lignanes présents dans des proportions plus ou moins grandes sont le matairésinol, le laricirésinol, l'isolaricirésinol, la conidendrine, l'acide conidendrique ainsi que des lignanes non identifiés (Holmbom et al., 2003).

En plus de ces lignanes, les nœuds des résineux étudiés contiennent des oligolignanes, définis comme des sesquilignanes (tri-phénylpropanoïdes), des dilignanes (tétra-phénylpropanoïdes) et d'autres molécules avec plus de quatre unités phénylpropanes. Les sesquilignanes ont une unité éther de guaiacylglyceryle supplémentaire liée au lignane de base par une liaison β-O-4 ; il peut donc exister autant d'oligolignanes que de lignanes par polymérisation de phénylpropanes (Willför et al., 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2004c). Les nœuds des thuya (*Thuja occidentalis* et *T. plicata*) contiennent de la tujalignane alors que les nœuds de *Juniperus* ne contiennent pas des lignanes mais des néolignanes sous forme d'oligomères (Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2007, 2003c).

Le dihydrokaempférol est un flavonoïde majoritaire dans les nœuds des peupliers et dans une moindre quantité dans le saule. La catéchine est présente dans les nœuds de saule et de hêtre. La taxifoline et la naringénine sont aussi présentes dans les nœuds de peupliers, du saule et de l'*acacia crassicarpa*. Enfin, les nœuds d'eucalyptus contiennent essentiellement des tanins (Neacsu et al., 2007b; Pietarinen et al., 2005, 2006a, 2006b; Pohjamo et al., 2003). Des hydrolyses enzymatiques ont été employées dans certains cas (peuplier) pour récupérer les aglycones des flavonoïdes car les nœuds contenaient essentiellement les flavonoïdes glucosides (Pietarinen et al., 2006b).

Certains genres ont des particularités quant à la nature de leurs extractibles. Ainsi les pins sont les seuls à avoir des molécules de la famille des stilbènes en fortes concentrations (Lindberg et al., 2004; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003a, 2003c). La pinosylvine et la pinosylvine monométhyl ether en sont les composés représentatifs ; leurs dérivés dihydroxylés sont détectés dans le pin de Weymouth. Les stilbènes ont été rapportés dans les nœuds de *Thuja occidentalis* (cèdre blanc du Nord) sans préciser le nom des molécules et à l'état de traces chez des épicéas, sapins, douglas, mélèzes (Lindberg et al., 2004) et dans le peuplier (Hartonen et al., 2007). Les sapins possèdent des sesquiterpènes détectés dans toutes les espèces étudiées : la juvabione et la dehydrojuvabione (Willför et al., 2004b). Ces molécules sont aussi plus concentrées dans les nœuds (0,06 à 26 $mg.g^{-1}$ de poudre de bois) comparativement à l'aubier et au duramen (0,01 à 5,9 $mg.g^{-1}$ de poudre de bois). Elles ont été détectées en très faibles quantités dans les nœuds du *Juniperus*, du cèdre du Liban et du Douglas (Lindberg et al., 2004; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2007, 2003c).

Enfin, les extraits lipophiles solubles dans l'hexane ont été peu analysés (Lindberg et al., 2004). Ce fut le cas du pin sylvestre dont les nœuds sont particulièrement riches en acides résiniques (jusqu'à

298 mg.g^{-1}), et dans une moindre mesure, en triglycérides (jusqu'à 12 mg.g^{-1}) et en acides gras (jusqu'à 5,8 mg.g^{-1}) (Hovelstad et al., 2006; Willför et al., 2003a). Les nœuds morts d'épicéa commun contiennent aussi des proportions élevés d'acides résiniques (jusqu'à 17,1 mg.g^{-1}) et d'alcools diterpényles (7,9 mg.g^{-1}) (Willför et al., 2003b). C'est surtout le bois d'aubier et le duramen de ces essences qui contiennent des quantités importantes de composés lipophiles (triglycérides, acides gras, alcools gras, stérols, etc.). Enfin, les nœuds du sapin blanc contiennent plusieurs classes de terpènes (mono-, sesqui- et diterpènes) alors que les nœuds du sapin baumier (*Abies balsamea*) contiennent principalement des diterpènes (Sekine et al., 2013).

3.3.2.2 Variabilité inter-espèces des extractibles nodaux

Des études plus approfondies ont échantillonné plusieurs espèces d'épicéa, de pin et de sapin. Ainsi selon les méthodes d'échantillonnage des nœuds, les concentrations des lignanes dans neuf espèces d'épicéa (*Picea abies*, *P. glauca*, *P. koraiensis*, *P. mariana*, *P. omorika*, *P. sitchensis, P. pungens*, *P. orientalis*, *P. smithiana*) varient entre 0,5 et 397 mg.g^{-1} ! La plus faible a été relevée dans le cerne le plus externe du bois de nœuds d'un épicéa commun ; la plus forte était dans les nœuds d'un épicéa de Sitka (*Picea sitchensis*). Le duramen le plus riche en lignanes était celui de l'épicéa commun avec une concentration de 12 mg.g^{-1}. Le liovile est le lignane dominant dans les nœuds des *P. pungens* et *P. sitchensis* (2,4 à 12,6 mg.g^{-1}). La nortrachelogénine et le secoisolaricirésinol dominent respectivement les lignanes dans les nœuds de *P. orientalis* (2,9 – 3,2 mg.g^{-1}) et de *P. smithiana* (4,2 mg.g^{-1}). Ailleurs, la nortrachelogénine est soit absente des nœuds d'épicéas, soit présente en l'état de traces chez *P. omorika*, *P. pungens* et *P. smithiana*. L'hydroxymatairésinol prédomine dans les autres épicéas (4,1 à 89 mg.g^{-1}). Quelques flavonoïdes sont présents en traces (taxifoline, catéchine, dihydrokaempférol) (Lindberg et al., 2004; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003b, 2004a, 2007, 2003c, 2005b).

Les dix espèces de sapin investies ont été *Abies alba*, *A. lasiocarpa*, *A. balsamea*, *A. sibirica*, *A. concolor*, *A. amabilis*, *A. veitchii*, *A. sachalinensis*, *A. bornmülleriana* et *A. cilicia*). Les concentrations des lignanes varient entre 2,4 et 128 mg.g^{-1} respectivement dans les nœuds du sapin des Rocheuses (*A. lasiocarpa*) et du sapin gracieux (*A. amabilis*). Alors que dans les duramens les concentrations s'échelonnent entre 0,18 (sapin de Veitch) à 8,0 mg.g^{-1} dans le sapin gracieux. Le secoisolaricirésinol domine les lignanes des nœuds des sapins avec de fortes variabilités : 0,83 – 69 mg.g^{-1} chez *A. lasiocarpa* et *A. bornmülleriana* (sapin de Turquie). Les différences entre les espèces résident dans la présence de certains lignanes chez quelques-uns des sapins. Ainsi la nortrachelogénine est présente uniquement dans les nœuds du sapin blanc (*A. alba*) et du sapin gracieux. Le duramen de ce dernier est le seul à contenir l'hydroxymatairésinol (3,4 mg.g^{-1}) – majoritaire dans les nœuds d'épicéa – et de la conidendrine (1,8 mg.g^{-1}). Le liovile est majoritaire dans le duramen du sapin blanc (1,7 mg.g^{-1}) et

du sapin de Colorado (4,4 mg.g^{-1}) (Lindberg et al., 2004; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2004b, 2007, 2003c).

Enfin, ce sont neuf pins qui sont étudiés en vue de dresser un tableau de la ressource en extractibles nodaux : *Pinus sylvestris*, *P. banksiana*, *P. strobus*, *P. resinosa*, *P. contorta*, *P. sibirica*, *P. nigra*, *P. brutia* et *P. merkusii*. Les nœuds des pins contiennent des stilbènes (la pinosylvine et ses dérivés) et des lignanes. Ainsi, plusieurs arbres de pin sylvestre ont été étudiés et les concentrations de stilbènes dans leurs nœuds s'échelonnaient entre 12,4 et 71,6 mg.g^{-1} alors que les concentrations de lignanes ne dépassaient pas 28 mg.g^{-1}. Les duramens présentaient aussi de fortes proportions de stilbènes (12,7 mg.g^{-1}) par rapport aux lignanes (< 0,05 mg.g^{-1}). Généralement la nortrachelogénine est le lignane dominant dans les nœuds des pins avec des concentrations allant de 1,2 à 92 mg.g^{-1} dans le pin de Turquie (*P. brutia*) et dans le pin noir (*P. nigra*), respectivement. La seule exception est le pin de Turquie (*P. brutia*) qui n'a que deux lignanes : le pinorésinol (27 – 39 mg.g^{-1}) et la nortrachelogénine (1,2 – 1,4 mg.g^{-1}). Il est donc probable que cet arbre échantillonné était jeune et que la synthèse des extractibles était en cours puisque le pinorésinol se trouve au début de la voie de biosynthèse des lignanes. Le laricirésinol domine dans les nœuds du pin de Weymouth (*P. stobus*), et une mixture de todolactol domine les lignanes des nœuds du pin rouge (*P. resinosa*). Enfin des flavonoïdes (pinocembrine, binobanksine et dihydrokaempférol) sont présents dans des proportions variables (Pietarinen et al., 2006a; Wijayanto et al., 2015; Willför et al., 2003a, 2007, 2003c).

Il a été observé que le mélèze européen (*L. decidua*) est plus riche en extractibles nodaux que le mélèze de Sibérie et celui d'Amérique (*Larix sibirica* et *L. lariciana*). Cette richesse se traduit au niveau des quantités mais aussi des molécules individuelles. La taxifoline domine les flavonoïdes des nœuds des mélèzes, mais le dihydrokaempférol est présent en grandes quantités dans les nœuds du mélèze européen. Ce dernier est aussi le seul à contenir le laricirésinol, alors que le secoisolaricirésinol et la taxifoline sont présents en faibles quantités les nœuds des deux autres mélèzes (Lindberg et al., 2004; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003c; Yashunsky et al., 2014).

Les acacias étudiés sont *Acacia mangium* et *A*. *crassicarpa* (Indonésie) et leurs nœuds sont très riches en teracacidine et melacacidine respectivement ; et chaque essence ne possède pas le flavonoïde de l'autre espèce (Pietarinen et al., 2005, 2006a). Enfin, ce sont trois peupliers qui ont fait l'objet d'investigations pour leurs extraits nodaux (*Populus tremula, P. tremuloides, P. grandidentata*). Les différences sont moins remarquables entre ces espèces que dans le cas des acacias sauf dans le cas du peuplier *tremula* qui a subi une extraction à l'eau pressurisée et qui contenait des traces de molécules (flavonoïdes, stilbène, lignanes, etc.) qui n'ont pas été identifiées par des extractions au soxhlet (Hartonen et al., 2007).

3.3.2.3 Variabilité intra-arbre, inter-nœuds des extractibles nodaux

Piispanen et al., (2008) ont mené une étude pour déterminer le profil vertical des concentrations de lignanes dans les nœuds d'un même arbre. Les résultats ont démontré une forte variabilité avec les plus fortes concentrations au niveau des branches vertes les plus basses, là où la biomasse des branches était la plus élevée. Les lignanes diminuent ensuite drastiquement vers le collet de l'arbre là où se trouvent les nœuds morts alors que les extraits lipophiles (acides résiniques et alcools terpéniques) augmentaient dans ces nœuds morts. Au-dessus de la première branche verte, les concentrations de lignanes diminuent de nouveau en allant vers le haut de l'arbre mais cette diminution est moins spectaculaire que celle vers la base de l'arbre. Les auteurs attribuent ce profil au chargement mécanique subi par les branches. Celles situées au milieu du houppier sont celles qui supportent le plus de biomasse.

Les épicéas de l'étude précédente étaient issus de deux endroits différents de Finlande. Le site au nord de la Finlande avait des conditions de croissance moins favorables que celles du site méridional. Or, ce sont les nœuds de ces arbres du nord qui contenaient le plus de lignanes. Ce résultat a été interprété par le fait que les conditions climatiques défavorables (les branches sont constamment chargées d'une épaisse couche de neige) et le manque de nutriments peuvent avoir déclenché le métabolisme secondaire de ces arbres. D'autre part, quelques-uns de ces arbres étaient prélevés sur des sites régulièrement fertilisés. La fertilisation a provoqué l'augmentation de la croissance (diamètre et hauteur des arbres) uniquement dans le site au nord de la Finlande. Toutefois, ce traitement n'a pas eu d'effet positif sur les concentrations des lignanes dans les nœuds des arbres du nord. Les auteurs ont donc mis en évidence un effet géographique et un effet hauteur de la branche sur les concentrations en lignanes dans les nœuds de l'épicéa (Piispanen et al., 2008).

Enfin, l'état vivant ou mort du nœud a aussi une grande influence sur les concentrations d'extractibles. Deux nœuds morts de l'*Acacia crassicarpa* contiennent respectivement 2,2 et 37 $mg.g^{-1}$ de flavonoïdes (Pietarinen et al., 2005). Les nœuds morts de l'*Acacia mangium* contiennent 0,66 et 7,9 $mg.g^{-1}$ de flavonoïdes alors que les nœuds vivants en contiennent 19 et 35 $mg.g^{-1}$ (Pietarinen et al., 2005). Toutefois, le nombre limité de nœuds par arbre ne permet pas de conclure quant à la richesse des nœuds morts ou vivants. Par exemple, les nœuds vivants sont plus riches en lignanes chez *Picea mariana*, *Pinus nigra*, *Abies balsamea*, *A. amabilis*. A l'opposé, les nœuds morts sont plus riches chez *Picea glauca*, *Abies alba*, *A. sibirica*, *Pinus sylvestris* et *P. brutia* (Willför et al., 2004a, 2004b, 2007). Enfin, il ne faut pas oublier que les solvants, les durées et les températures d'extraction sont des facteurs influant le taux de composés extraits ainsi que leur pureté (Fang et al., 2013).

3.3.2.4 Variabilité intra-nœud des extractibles nodaux

Les cernes d'accroissement des nœuds d'épicéa commun ont été prélevés individuellement pour analyser les taux de lignanes et de terpènes. Les concentrations sont maximales dans les cernes internes, c'est-à-dire les plus proches de la moelle, puis elles diminuent progressivement en allant vers l'extérieur du nœud (Figure 36). Le profil des concentrations de diterpénoïdes est exactement l'inverse de celui des lignanes : l'aubier des nœuds contient plus de diterpènes que le duramen (Willför et al., 2005b).

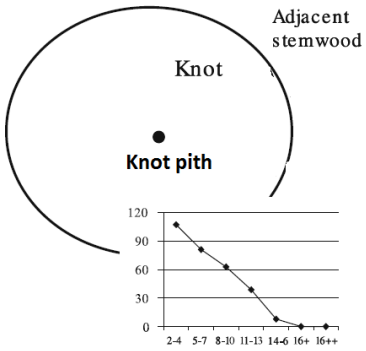


Figure 36 : Illustration de la diminution radiale de la concentration des lignanes (mg.g^{-1}) en fonction de la distance (cm) depuis la moelle du nœud de l'épicéa. (©Springer, Heidelberg 2005)

L'échantillonnage d'éprouvettes de bois de nœuds de pin sylvestre et d'épicéa dans l'axe longitudinal du nœud révèle une variation des concentrations des lignanes. Les taux de lignanes tendent à diminuer légèrement de la base du nœud (lieu de croisement des moelles du nœud et du tronc) vers l'extrémité externe du nœud et le début de la branche (la limite étant l'écorce du tronc). Les lignanes diminuent drastiquement dans la branche jusqu'à disparition à 20 cm de l'écorce (Figure 37). Le même profil intra nœud a été relevé pour les concentrations des stilbènes présents uniquement chez le pin (Willför et al., 2003a, 2003b, 2005b).

L'étude des bois de compression, opposé et de côté (bois normal) d'un même nœud révèle aussi des différences de concentrations en lignanes et stilbènes chez l'épicéa et le pin. Dans tous les cas, le bois de compression est celui qui contient le moins d'extraits. Le bois opposé contient légèrement plus de lignanes que le bois normal de l'épicéa (Figure 37) (Willför et al., 2003a, 2003b, 2005b). Une interprétation de ce constat pourrait être l'allocation des photosynthétats au profit de la lignification intensive du bois de compression et moins pour leur stockage et la formation d'extractibles. Aucune étude n'a porté sur les extractibles du bois de tension dans les nœuds des feuillus, mais une diminution des concentrations par rapport au bois opposé pourrait être envisagée puisque ce bois de tension consommerait les carbohydrates pour la formation de la couche G et non pas pour la formation d'extractibles (Côté et al., 1966; Fagerstedt et al., 2014; Taylor et al., 2002). Les

photosynthétats sont aussi probablement mobilisés pour l'activité cambiale accrue dans le bois de réaction pour former davantage de cellules responsables de l'excentricité de ce bois (Ruelle, 2014).

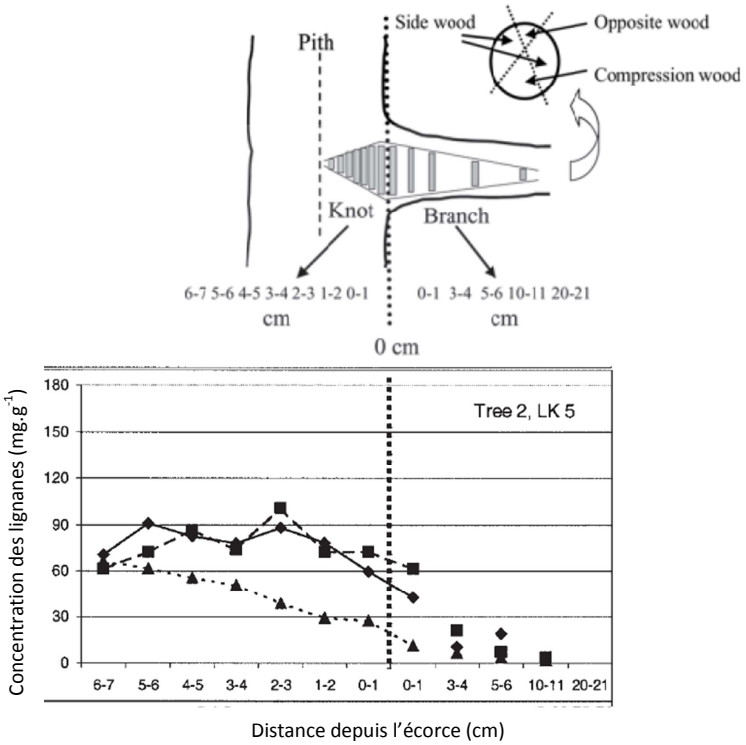


Figure 37 : Illustration de la diminution longitudinale de la concentration des lignanes (mg.g^{-1}) dans les nœuds de l'épicéa en fonction de la distance (cm) depuis la base du nœud située à 6-7 cm de profondeur). Le bois de compression (triangles) contient moins de lignanes que le bois opposé (losanges) et le bois de côté (carré). (©De Gruyter, Berlin 2003)

3.3.3 Propriétés des extractibles des nœuds

Il n'y a pas d'études pour comprendre les raisons précises de la présence de tant d'extractibles dans le bois de nœuds par rapport au bois du tronc. Les principales hypothèses sont liées d'une part à la localisation des nœuds et à la possibilité de constituer une entrée pour des pathogènes en cas de casse de la branche (Lindberg et al., 2004; Välimaa et al., 2007). D'autre part, le nœud maintient l'ensemble branche – feuilles – fruits assujetti aux vents, à la pluie et à la neige. La base de la branche a donc besoin d'un renforcement mécanique supplémentaire (Piispanen et al., 2008; Willför et al., 2003a, 2003b). Enfin, le mouvement incessant des branches génère des radicaux libres dans les nœuds et les extractibles joueraient le rôle d'antioxydant pour réduire les dommages (Neacsu et al., 2007b; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003c).

Pour exploiter cette nouvelle ressource de biomolécules, la caractérisation de leurs propriétés est indispensable. Ainsi, plusieurs études ont déterminé les pouvoirs antimicrobiens, antifongiques et antioxydants des extractibles de nœuds des principales essences industrielles. Les tests de pouvoir antioxydant ont été menés par détermination de la capacité des extraits (molécules pures ou en

mélange) à inhiber la peroxydation des lipides, à capter des radicaux pyroxyles ou superoxides. Les extraits bruts (sans purification et isolation des molécules individuelles) de nœuds de plusieurs essences (*Acacia crassicarpa*, *A. mangium*, *Betula pendula*, *Abies alba*, *A. sibirica*, *A. balsamea*, *Picea abies*, *P. glauca*, *P. sitchensis*, *Pinus sylvestris*, *P. contorta*, *Larix sibirica*, *Tsuga canadensis et T. heterophylla*) sont de meilleurs inhibiteurs de la peroxydation lipidique que les molécules simples (secoisolaricirésinol, nortrachelogénine, hydroxymatairésinol, matairésinol, laricirésinol, dihydrokaempferol, taxifoline, pinocembrine, melacacidine, teracacidine et pinosylvine). Or, ces molécules sont les composés dominants dans les extraits des essences citées ci-dessus. Il est donc évident que les molécules présentes en faibles quantités dans les extraits bruts jouent aussi un rôle important (Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003c).

A contrario, les extraits nodaux bruts de *Picea mariana*, *Larix decidua*, *L. lariciana*, *Pinus banksiana*, *P. resinosa*, *Abies lasiocarpa*, *Fagus sylvatica* et d'eucalyptus ont des pouvoirs d'inhibition similaires à ceux de la nortrachelogénine, de l'hydroxymatairésinol, du matairésinol, de la taxifoline et de la pinosylvine purs. Enfin le laricirésinol, le dihydrokaempférol et la pinocembrine ainsi que les extraits bruts du peuplier (*Populus tremuloides* et *P. tremula*) et des *Pinus strobus* et *P. sibirica* ont un très faible pouvoir (IC_{50} > 100 µg.L^{-1} alors que la référence Trolox® a un IC_{50} = 5 µg.L^{-1}). Les seules molécules ayant un fort pouvoir d'inhibition de la peroxydation sont l'isolaricirésinol et le pinorésinol (IC_{50} = 17 et 20 µg.L^{-1}, respectivement) (Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003c).

Les extraits bruts et les molécules pures semblent avoir davantage un pouvoir de capter les radicaux libres. Ainsi, la taxifoline, l'isolaricirésinol, le secoisolaricirésinol et les extraits bruts de plusieurs essences (*Acacia crassicarpa*, *Pinus contorta*, *Abies sibirica*, *A. balsamea*, *Betula pendula*) ont une meilleure capacité de captage des radicaux que le Trolox®. Pour les autres extraits et molécules, les propriétés de capteurs de radicaux libres sont dans les mêmes ordres de grandeur que le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003c).

Toutefois, quelques grandes variabilités subsistent tels que les stilbènes des nœuds du pin cembro (*Pinus cembra*) et les oligolignanes de nœuds d'épicéa commun qui ont un meilleur pouvoir de capteurs des radicaux superoxides que des radicaux peroxyles et de pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (Willför et al., 2003c). D'autre part, les extraits de deux Douglas de même âge ont montré des comportements différents. Le premier contient 9 % de lignanes et 42 % de flavonoïdes et possède de bien meilleures capacités antioxydantes par rapport au deuxième qui possède 45 % de lignanes et 1 % de flavonoïdes (Willför et al., 2003c). Enfin, les glycosides de flavonoïdes tels que le dihydrokaempferol 7-O-β-glucoside et la naringenine 7-O-β-glucoside extraits des nœuds du peuplier tremble sont moins antioxydants que les aglycones correspondants (Neacsu

et al., 2007a, 2007b). Les degrés de méthylation, d'hydroxylation et d'oxydation ainsi que leur localisation sur les cycles aromatiques expliquent les différences de pouvoir antioxydant. Les lignanes comportant une substitution de type 3,4-dihydroxy ont les meilleurs résultats pour les tests de pouvoir antioxydant (Eklund et al., 2005).

Les tests de pouvoir antibactérien ont montré que seuls les extraits nodaux de pins (*Pinus sylvestris*, *P. resinosa*, *P. contorta* et *P. banksiana*) avaient un effet notoire sur l'inhibition de la croissance des bactéries. Les nœuds de pins sont les seuls à contenir des stilbènes, par conséquent, cette activité antibactérienne est attribuée à la pinosylvine et à ses dérivés. Il semble y avoir une corrélation entre la concentration en stilbènes et le degré de toxicité puisque les extraits du pin sylvestre sont les plus concentrés et les plus efficaces (Lindberg et al., 2004; Välimaa et al., 2007). Les tests contre les micororganismes du secteur alimentaire (e.g. *Escherichia coli, Salmonella infantis, Listeria monocytogenes*) mettent aussi en évidence l'efficacité des extraits de pins, y compris la pinocembrine, alors que les lignanes n'ont aucun effet sur l'inhibition de la croissance des bactéries et des champignons testés (Välimaa et al., 2007).

Plus encore que la nature des molécules présentes dans les extraits, la synergie entre ces molécules est probablement une explication à leur pouvoir antibactérien et antioxydant. Toutefois, les auteurs mettent en garde vis-à-vis de l'interprétation de ces résultats quant aux rôles des extraits dans le bois. En effet, ces tests sont menés sur des milieux de culture différents du bois (souvent sur malt agar), à des concentrations différentes de celles trouvées dans le bois et avec des microorganismes qui ne sont pas les pathogènes du bois. Grace à leurs propriétés antioxydantes, les auteurs proposent d'utiliser les extraits de nœuds comme des biocides naturels pour la préservation des aliments, des antioxydants naturels pour compléments alimentaires, médicaments, produits cosmétiques, etc. Karppanen et al., (2007) proposent une méthode rapide pour savoir si le duramen du pin sylvestre est durable. Il s'agit de prélever des échantillons de nœuds lorsque l'arbre est sur pied et de quantifier les extractibles car ils ont trouvé une forte corrélation entre les concentrations en extractibles nodaux et la perte de masse du duramen lors de tests fongiques.

Quelques études ont réalisé des tests de caractérisation des extraits nodaux sur des cellules animales pour mettre en lumière leur rôle immunologique. Les extraits de nœuds d'épinette (*Picea sitka*) et du pin gris (*Pinus banksiana*) se sont révélés d'excellents antioxydants pour protéger les dommages induits par H_2O_2 sur les constituants des cellules humaines et sur leur fonctionnement (rôle cytoprotectif) mais n'ont pas pu éviter les dommages sur l'ADN (Phelan et al., 2009). Les extraits de nœuds du mélèze de Sibérie ont démontré une influence positive sur l'activité cérébrale des jeunes souris avec la taxifoline, le secoisolaricirésinol et l'isolaricirésinol comme composants principaux de

ces extraits (Loers et al., 2014). Les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'effet sur les neurones proportionnelle à la dose des trois phénols, mais au-delà d'une certaine concentration (500 nM à 1 µM), les molécules n'ont plus d'influence sur le fonctionnement nerveux. Les stilbènes des nœuds du pin et l'hydroxymatairésinol des nœuds de l'épicéa possèdent de très bonnes propriétés antiinflammatoires (Laavola et al., 2015; Spilioti et al., 2014). C'est surtout le potentiel anti-cancéreux des lignanes qui est le plus étudié notamment grâce à leur propriété ostrogénique (Cosentino et al., 2007; Kangas et al., 2002; Peuhu et al., 2013; Yatkin et al., 2014).

Plusieurs brevets ont été déposés pour améliorer l'efficacité d'extraction et la valorisation des extraits nodaux en tant qu'antioxydants pour prévenir l'oxydation des plastiques, des lubrifiants, des adhésifs, des produits cosmétiques, etc. Les extraits peuvent aussi être employés comme biocides dans l'agroalimentaire et produits de préservation du bois et du papier (« Method for recovery of compression wood and/or normal wood from oversize chips », US 6739533 B2 ; « Method for the fractionation of knotwood extract and use of a liquid-liquid extraction for purification of knotwood extract », WO 2010000927 A1 ; « Improved method for the production of hydroxymatairesinol from wood », WO 2005016905 A1 ; « Method for isolating phenolic substances or javabiones from wood comprising knotwood », US 20040199032 A1 ; «Method for extracting secoisolariciresinol and dihydroquercetin from wood », EP 2143435 A1 ; « Use of knotwood extracts », WO 2005047423 A1 ; « Semi-finished product in the manufacture of a composition for skin or hair care », WO 2008020112 A1 et US 20100047294 A1 ; « Antimicrobial composition with low cytotoxicity, US 8431170 B2; « Method for preparing a composition comprising a compound mixture and a carrier agent », US 8496974 B2 ; « Pharmaceutical compositions comprising 8-substituted dibenzylbutyrolactone lignans », US 20130281381 A1 ; «Hydroxymatairesinol in cancer prevention », WO 2000059946 A1.

Des entreprises spécialisées dans l'extraction de polyphénols présents dans les nœuds ont vu le jour telles que « Separation Research Ltd. et Arbonova Ltd. en Finlande.

Cette étude bibliographique permet de mesurer l'intérêt des nœuds en tant que nouvelle ressource de molécules bioactives. La caractérisation de ces molécules a été faite principalement pour des essences industrielles du nord de l'Europe. Qu'en est-il de la ressource forestière française ? Le chapitre suivant dresse les résultats de quantification et d'identification des extractibles de plusieurs essences échantillonnées en France.

Chapitre 2 :

Biodiversité interspécifique des extractibles nodaux

Chapitre 2 Biodiversité interspécifique des extractibles nodaux

1 Introduction

L'objectif poursuivi dans ce chapitre est de quantifier les extractibles nodaux et d'établir un large spectre des molécules extraites du bois de nœuds de plusieurs essences forestières et de les comparer au duramen et à l'aubier. Enfin, les différents extraits obtenus ont été testés sur les glutathion- transférases de *Trametes versicolor* pour étudier l'influence de la nature des extraits sur l'activité de ces protéines.

Ce chapitre se divise en trois parties. Après un descriptif du mode opératoire, les résultats obtenus après deux campagnes d'échantillonnage sont présentés distinctement. Ces résultats consistent en la détermination des taux massiques des extractibles et l'identification des molécules pour les résineux et les feuillus. Une partie des résultats a été publiée dans Annals of Forest Science et une autre partie est en préparation pour une soumission à Industrial Crops and Products. La dernière partie est consacrée aux tests biologiques. Cette dernière partie est présentée sous forme d'un article publié dans PLoS One. Enfin, une synthèse globale du chapitre reprend les principales conclusions.

2 Protocole expérimental

2.1 Echantillonnage des nœuds

Vingt-trois espèces ont été choisies pour l'étude de la biodiversité interspécifique des extractibles nodaux. Un seul arbre a été abattu par espèce et sur chacun, des rondelles contenant des nœuds ont été sciées ainsi qu'une rondelle à une hauteur de 1,3 m pour prélever le duramen et l'aubier. Une dernière rondelle prélevée à la souche a servi à la détermination de l'âge des arbres. Les rondelles fraichement sciées ont été transportées à l'atelier (du Lerfob) pour prélever les copeaux de bois. Une fois les copeaux de nœuds, de duramen et d'aubier prélevés, ceux-ci ont été séchés à 50 °C pendant 48 heures puis broyés et stockés au congélateur jusqu'à extraction (au Lermab).

2.2 Extraction des molécules

Les extractions des molécules à partir des broyats de bois ont été réalisées à l'aide de montage à Soxhlets et en utilisant successivement quatre solvants : le dichlorométhane, l'acétone, un mélange toluène/éthanol (2/1, v/v) et de l'eau chaude. Cet enchainement respecte l'ordre croissant de polarité des solvants afin de solubiliser progressivement toutes les molécules présentes dans les poudres de bois en fonction de leur polarité croissante. Les solvants organiques ont été évaporés par l'évaporateur rotatif et l'eau a été lyophilisée. Le taux massique d'extractibles solubilisés par chaque solvant est exprimé en pourcentage par rapport à la masse de la poudre sèche. Le taux total

d'extractibles pour chaque échantillon est la somme des taux massiques extraits par chacun des quatre solvants.

2.3 Identification et quantification des molécules

L'analyse des extraits a été faite par GC-MS. Au préalable, chaque extrait a subi une silylation consistant à ajouter 80 µL de N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) dans un pilulier contenant 1 à 10 mg de l'extrait à analyser. L'ensemble a été placé à l'étude à 70 °C pendant 24 heures. Cette réaction permet de remplacer les groupes hydroxyles des molécules par un groupe triméthylsilyle ($Si(CH_3)_3$) afin de procurer une meilleure stabilité lors des analyses en GC-MS. Après l'évaporation de l'excès de BSTFA, 1 mL d'éthyl acétate a été ajouté dans le pilulier pour solubiliser l'extrait silylé. Finalement 1 µL de ce mélange est injecté en GC-MS. La silylation des extraits a été délicate à réaliser et elle a nécessité de s'y prendre à plusieurs reprises. Cela a fini par utiliser l'intégralité de certains extraits qui étaient déjà en faibles quantités (surtout dans l'aubier) sans parvenir à identifier les molécules.

Les réglages de la GC-MS ont été les suivants : l'injection a été faite à 250 °C. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est réglé à 1 mL/min. Le four de la chromatographie a suivi un programme de montée en température réglé à : 80 °C pendant 2 min suivi d'une augmentation à 10 °C/min jusqu'à atteindre 190 °C puis une autre augmentation à 15 °C/min jusqu'à 280 °C. Un pallier à cette température a été maintenu pendant 5 minutes puis une augmentation à 10 °C/min a été appliquée jusqu'à atteindre 300 °C maintenue pendant 14 minutes. L'énergie d'ionisation des molécules a été de 70 eV et la détection des fragments a été réalisée pour des rapports m/z compris entre 45 et 800. L'identification des molécules a été faite par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la base de données intégrée à la GC-MS et avec d'autres spectres publiés (Ekman 1976, 2002 ; Imai et al. 2005 ; Smeds et al. 2012a). Des standards de plusieurs molécules ont aussi été analysés par GC-MS dans les mêmes conditions pour confirmer la nature des molécules présentes dans les extraits. Lorsque l'identification formelle d'une molécule n'était pas possible alors elle classée selon une des familles chimiques (terpènes, flavonoïdes, lignanes, sucres, etc.) car son spectre de masse était similaire à celui d'autres molécules identifiées dans la même famille de composés. Quand une molécule possédait un spectre qui ne ressemblait pas à celui d'autres composés connus, alors la molécule était classée dans la catégorie « non identifiés ».

La quantification de chacune des molécules a été réalisée de manière relative par intégration de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme. Dans la suite, seule l'identification des molécules extraites par le dichlorométhane et l'acétone est détaillée. Les extraits au toluène/éthanol ont représenté une très faible quantité et les analyses préliminaires menées sur ces extraits ont

révélé qu'ils contenaient en grande partie les mêmes molécules que les extraits à l'acétone mélangées à d'autres produits plus polaires et difficilement identifiables. Quant aux extraits à l'eau, ils sont trop polaires et leur analyse en GC-MS n'a pas été concluante.

3 Résultats et discussion

3.1 Première campagne d'échantillonnage

Dans un premier temps, douze essences ont été choisies : le mélèze, le pin sylvestre, l'épicéa, le sapin, le douglas, le chêne pédonculé, le merisier, le frêne, le robinier, l'aulne, le hêtre et le charme (Tableau ci-dessous). Tous les nœuds d'un même arbre ont été prélevés et broyés ensemble sans distinction de leur hauteur sur l'arbre ni de leur état vivant ou mort. Dans ce cas, les résultats font référence aux extraits de « nœuds ».

Nom commun	Age (ans)	Hauteur (m)	Diamètre (cm)
Sapin pectiné	50	22,4	21
Epicéa commun	42	19,4	25
Douglas	47	21,4	23
Mélèze européen	55	23,3	25
Pin sylvestre	40	23,2	30
Aulne glutineux	29	20,7	26
Merisier	28	17,1	21
Robinier	37	20,2	28
Charme	101	22,1	26
Hêtre	98	17,9	22
Frêne	83	20,2	33
Chêne pédonculé	90	21,9	27

Tableau 3 : Caractéristiques des arbres échantillonnés lors de la première campagne.

3.1.1 L'extraction avec quatre solvants

3.1.1.1 Taux massiques d'extractibles dans les bois

Le graphique ci-dessous présente les taux massiques d'extraits obtenus pour les douze essences avec un classement décroissant selon les taux d'extraits dans les nœuds. La contribution de chacun des quatre solvants dans le taux total d'extraits est mise en valeur avec des couleurs différentes.

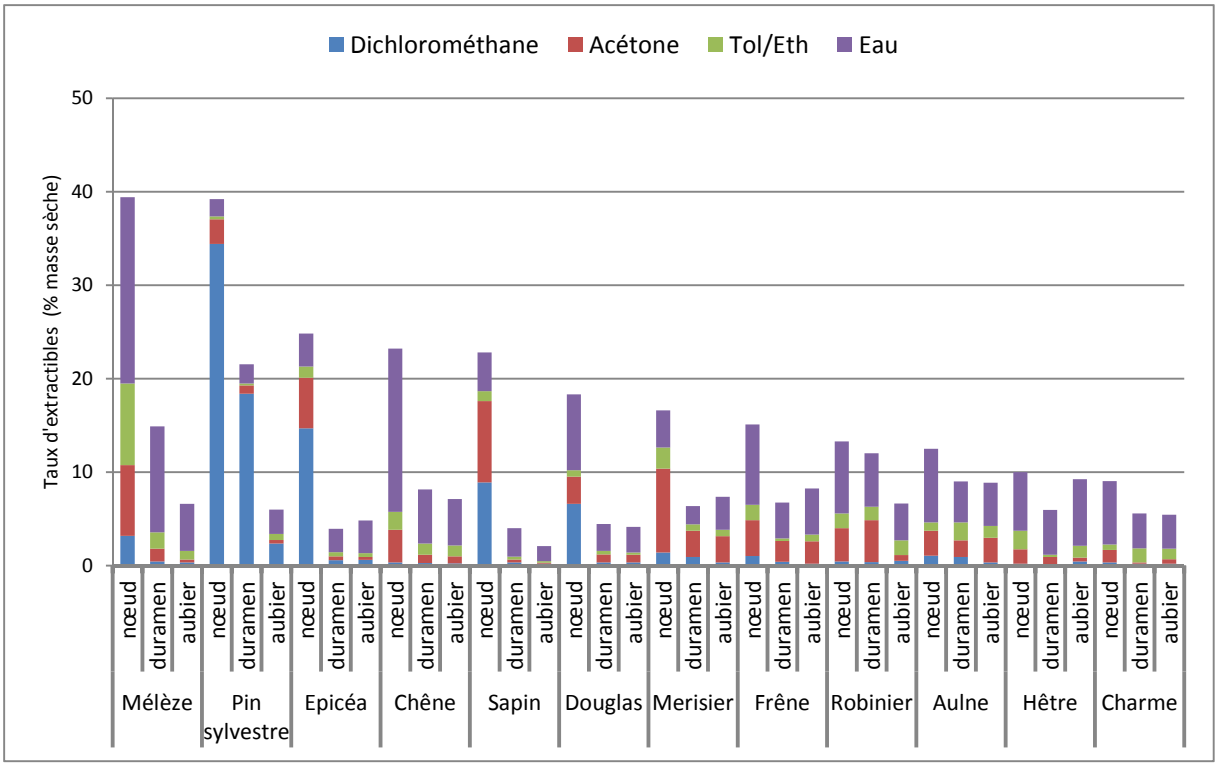


Figure 38 : Taux massiques d'extractibles dans les nœuds, le duramen et l'aubier de douze essences forestières.

Les taux d'extraits globaux dans les nœuds s'échelonnent de 9,06 % (charme) à 39,44 % (mélèze) alors que dans les duramens ils sont compris entre 3,93 % (épicéa) et 21,55 % (pin sylvestre). Enfin les différents aubiers échantillonnés contiennent entre 2,09 % (sapin) et 9,24 % (hêtre). Dans ces douze essences, les nœuds sont plus riches que le duramen et l'aubier correspondants. Seuls les nœuds et le duramen du robinier ont des taux d'extraits similaires. Les nœuds des résineux sont plus riches en extractibles que ceux des feuillus, excepté pour le chêne dont les nœuds sont aussi riches que ceux de l'épicéa et du sapin. Le duramen et l'aubier des résineux échantillonnés possèdent plus d'extraits aqueux (excepté dans le pin sylvestre). *A contrario*, les nœuds de ces conifères sont particulièrement concentrés en composés plutôt lipophiles extraits au dichlorométhane, sauf les nœuds du mélèze qui ont plus d'extraits aqueux. Les nœuds du douglas ont des proportions équivalentes de composés lipophiles et hydrophiles. Les nœuds, le duramen et l'aubier des feuillus sont plus concentrés en composés hydrophiles, extraits majoritairement par l'eau. Ceci laisse supposer des différences chimiques entre les différents types de bois issus de plusieurs espèces et

même ceux prélevés dans le même arbre. Dans les trois types de bois de ces douze arbres, le mélange Tol/Eth a extrait très peu de quantités de molécules, car ce mélange a été employé après le dichlorométhane et l'acétone, qui ont certainement extrait la majorité des substances solubles dans le mélange Tol/Eth.

3.1.1.2 Identification et quantification relative des molécules extraites

3.1.1.2.1 Identification des extractibles au dichlorométhane dans les bois des résineux

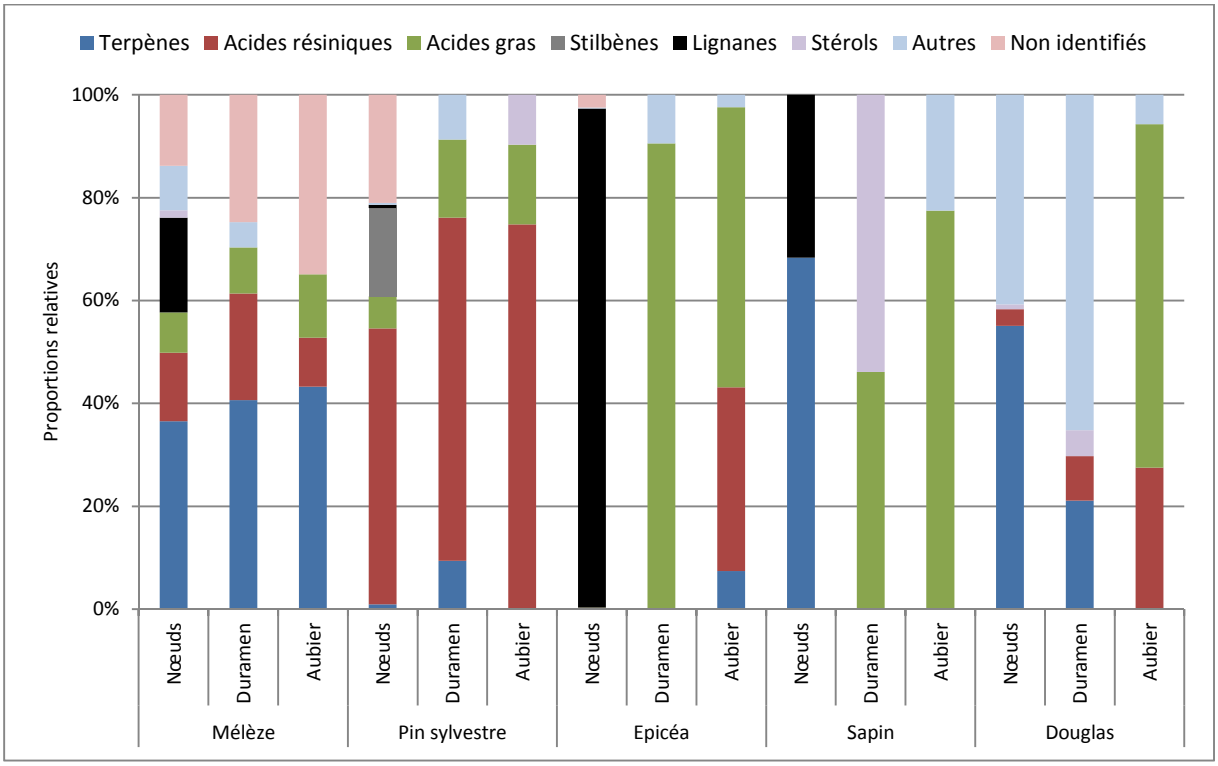


Figure 39 : Principales familles de composés extraits des résineux par le dichlorométhane et leurs proportions relatives.

Deux familles de composés se distinguent dans les différents extraits au dichlorométhane, il s'agit des acides gras et des terpènes. Les acides résiniques et les stérols sont des composés terpéniques, mais pour plus de clarté sur le graphique, ils ont été séparés des autres terpènes. Le principal acide gras retrouvé dans tous les échantillons est l'acide palmitique, les autres sont l'acide linoléique, l'acide oléique, l'acide stéarique, etc. Il y a une diminution de la proportion des acides gras en passant de l'aubier vers le duramen, hormis le cas de l'épicéa. Il pourrait alors s'agir de produits de réserve servant lors de la biosynthèse d'extractibles du duramen.

Les acides résiniques sont particulièrement présents dans le pin sylvestre, y compris dans l'aubier, et les principaux composés sont les acides dehydroabiétique, abiétique, pimarique et isopimarique. Ce sont ces mêmes acides qui sont présents dans les tissus du douglas et du mélèze ainsi que dans l'aubier de l'épicéa. Les autres terpènes majoritaires dans le mélèze sont des alcools diterpéniques :

l'epimanool et le larixol. L'aubier du mélèze contient aussi le linalool. Les nœuds et le duramen du douglas contiennent la juvabione et l'acide todomatuique qui sont des sesquiterpènes. Le terpène majoritaire dans les nœuds du sapin n'a pas été identifié, mais celui-ci contient aussi de la juvabione. Enfin, les stérols sont d'autres terpènes minoritaires exceptés dans le cas du duramen de sapin, et le principal stérol est alors le β-sitostérol.

Les lignanes sont des composés phénoliques majoritaires dans les nœuds d'épicéa, avec une forte proportion d'hydroxymatairésinol. Les nœuds des autres résineux contiennent de plus faibles proportions de lignanes. Les nœuds du mélèze contiennent du secoisolaricirésinol, de la nortrachelogénine et du laricirésinol. Les nœuds du sapin possèdent le laricirésinol et le secoisolaricirésinol alors que ceux du pin sylvestre contiennent des traces de nortrachelogénine. Aucun duramen ni aubier ne contient des lignanes. Les stilbènes pinosylvine et monométhyl éther de pinosylvine sont identifiés uniquement dans les nœuds du pin sylvestre. Les nœuds des résineux se distinguent donc des duramens correspondants par la présence de molécules phénoliques (lignanes et/ou stilbènes) dans les extraits au dichlorométhane. Dans les nœuds du douglas, les « autres » composés regroupent des acides phénoliques tels que l'acide cinnamique, l'acide benzènebutanoique et l'acide phenylhexanoique. Dans le duramen du douglas, les mêmes acides phénoliques ont été identifiés ainsi que des traces de pinocembrine. Les principales molécules identifiées dans ces résineux sont représentées dans la figure 41.

3.1.1.2.2 Identification des extractibles à l'acétone dans les bois des résineux

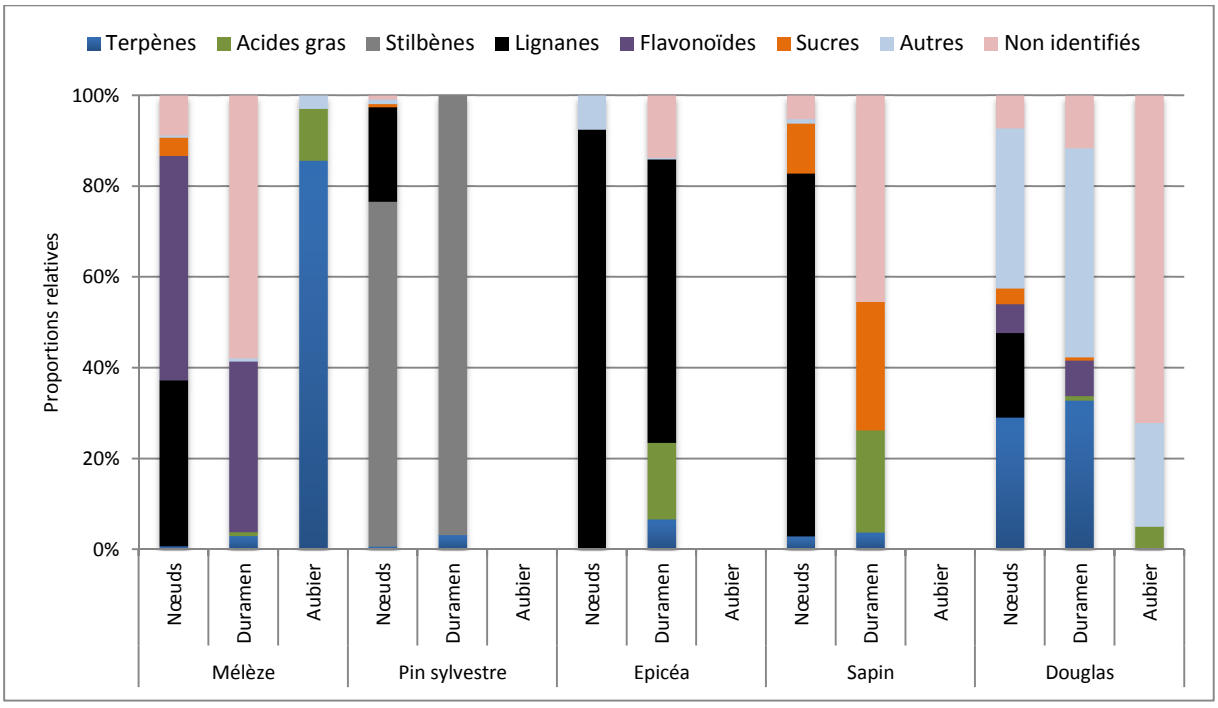


Figure 40 : Principales familles de composés extraits des résineux par l'acétone et leurs proportions relatives.

L'extraction à l'acétone permet de distinguer davantage les nœuds des duramens et des aubiers. Ainsi, les proportions des lignanes augmentent considérablement à cause de la solubilité de ces composés dans l'acétone. Le lignane majoritaire dans les nœuds du pin sylvestre est la nortrachelogénine alors que le secoisolaricirésinol domine dans les nœuds du douglas, du sapin et du mélèze. L'hydroxymatairésinol reste le lignane dominant dans les nœuds de l'épicéa, et le duramen de ce dernier se révèle contenir beaucoup de lignanes dont l'hydroxymatairésinol et l'α-conidendrine sont les principaux. Ces composés avaient été identifiés dans le duramen de l'épicéa commun par Shain and Hillis (1971). Willför et al., (2004b) ont aussi constaté la richesse du duramen d'un épicéa prélevé dans les Vosges par rapport à ceux échantillonnés en Finlande. Les stilbènes deviennent les composés majoritaires dans les nœuds du pin et surtout dans son duramen.

Des flavonoïdes sont extraits par l'acétone dans les nœuds et les duramens du mélèze et du douglas. Ces composés sont certainement le reflet de la transformation de l'aubier en duramen dans ces essences. Le principal flavonoïde est la taxifoline, nommée également dihydroquercétine. De la pinocembrine est aussi présente en traces dans le duramen du douglas. Les nœuds et le duramen de ce dernier contiennent toujours des acides phénoliques simples. Ils peuvent servir de précurseurs à la synthèse des flavonoïdes dans ces tissus. L'identification de toutes ces molécules dans les nœuds de ces résineux est conforme à ce qui a été rapporté auparavant (Lindberg et al., 2004 ; Pietarinen et al., 2006a ; Willför et al., 2003a, 2003b, 2003c, 2004a, 2004b).

Toutefois, d'après la littérature, les composés dominants dans les extraits du mélèze sont les arabinogalactanes (Côté et al., 1996). Il n'a pas été possible de confirmer la présence de ces composés par la GC-MS dans le cadre de cette étude.

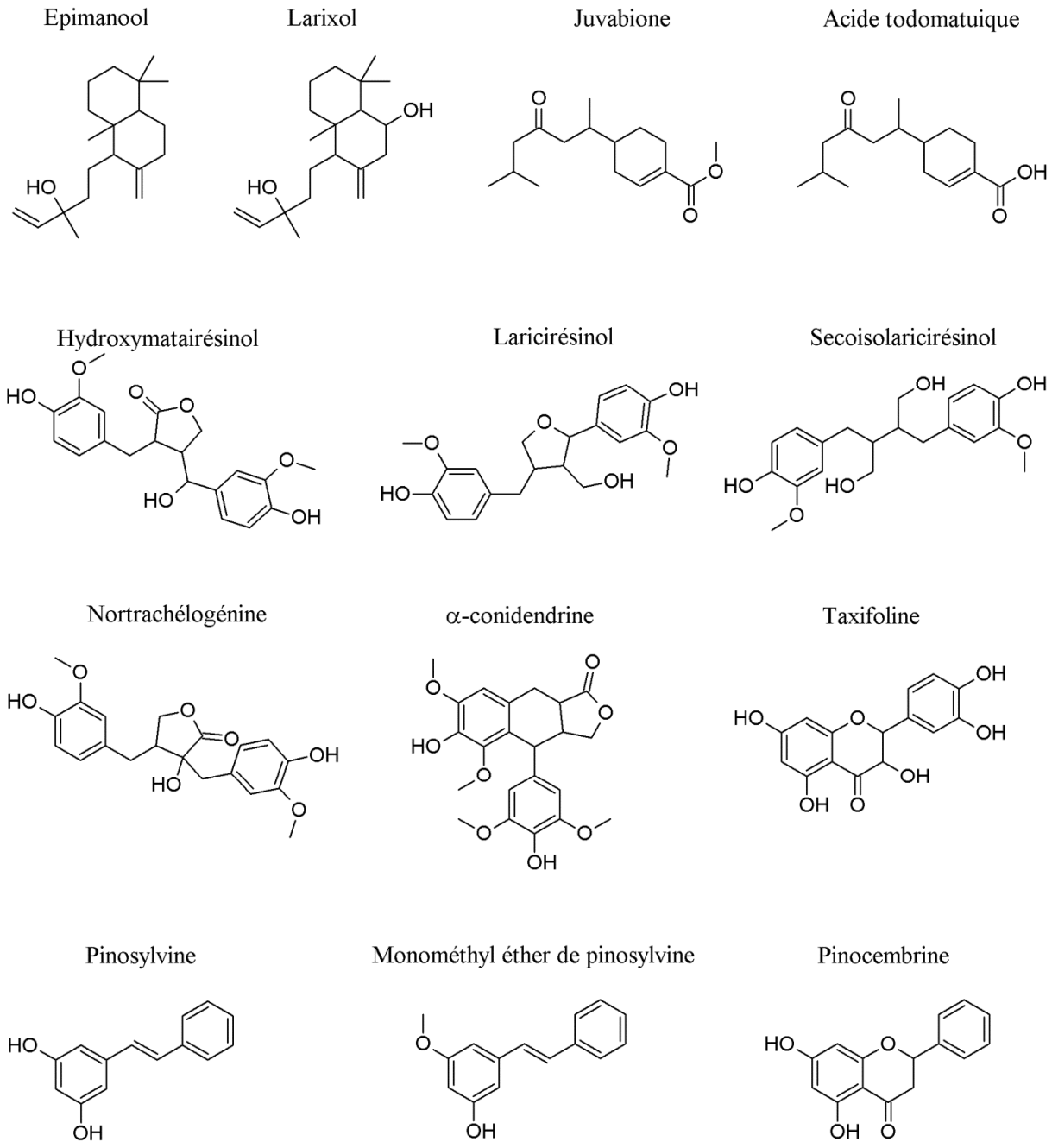


Figure 41 : Principales molécules extraites des résineux.

3.1.1.2.3 Identification des extractibles au dichlorométhane dans les bois des feuillus

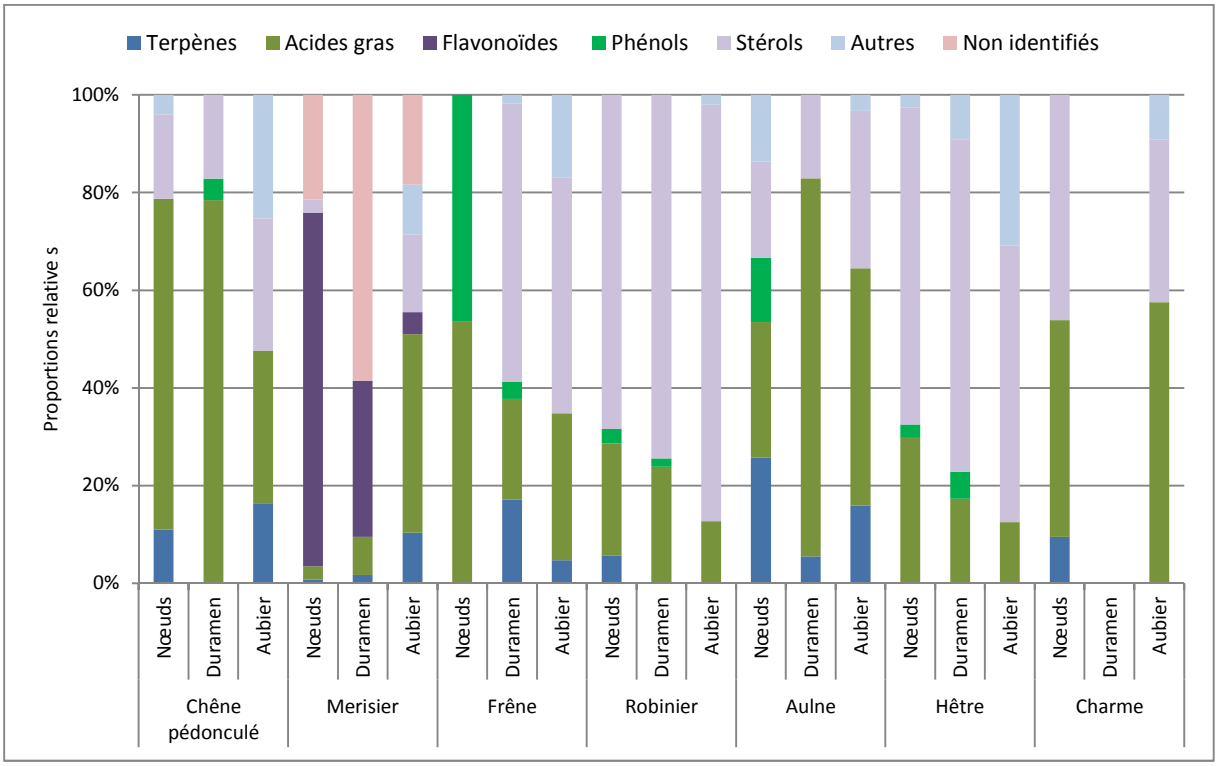


Figure 42 : Principales familles de composés extraits des feuillus par le dichlorométhane et leurs proportions relatives.

De manière générale, la composition chimique des nœuds de feuillus révélée par le dichlorométhane est similaire à celle d leur duramen et/ou aubier ; seules les proportions changent entre les différents bois du même arbre. Deux familles de composés se distinguent dans les extraits au dichlorométhane, il s'agit des stérols et des acides gras. Les acides palmitique et linoléique sont les principaux acides gras détectés dans les différents échantillons. Dans les aubiers, d' « autres » alcanes et alcools gras sont identifiés ainsi que dans le duramen du hêtre.

Le β-sitostérol est le stérol le plus abondant, mais le robinier possède deux autres stérols : l'acétate de cycloeucalenol et l'acétate de cycloartanyl. Le squalène est présent dans l'aubier du merisier et dans le frêne (duramen et aubier). D'autres terpènes sont présents en proportions variables dans les différents échantillons. Des acides résiniques ont été identifiés dans le duramen du frêne et du merisier et dans les nœuds du robinier. Le triterpène lupéol et ses dérivés sont présents chez le chêne pédonculé (nœuds et aubier) et l'aulne. Ce dernier contient aussi du betulinol et de l'ursolate et ses dérivés. Les nœuds du charme contiennent des traces de méthyl d'ursolate.

Dans la majorité des essences, le passage de l'aubier vers le duramen se manifeste par la synthèse de phénols simples probablement pour servir de précurseurs aux di- et aux poly- phénols. Le

syringaldéhyde est présent dans le hêtre et dans les nœuds du frêne. Ces derniers contiennent aussi le sinapylaldéhyde, le cinnamaldéhyde et l'acide syringique.

Les flavonoïdes sont présents dans le merisier, y compris dans l'aubier qui possède une chalcone : la pinostrobine chalcone. Ceci confirme que le mode de duraminisation du merisier est similaire à celui du noyer, c'est-à-dire que les précurseurs des extractibles du duramen s'accumulent dans l'aubier puisque la chalcone est considérée comme le précurseur des autres flavonoïdes (Burtin et al., 1998 ; Magel et al., 2001a). Le duramen et les nœuds contiennent cette chalcone mais aussi d'autres flavonoïdes : la sakuranine et la tectochrysine. Les nœuds ont, en plus, la pinocembrine et la chrysine.

3.1.1.2.4 Identification des extractibles à l'acétone dans les bois des feuillus

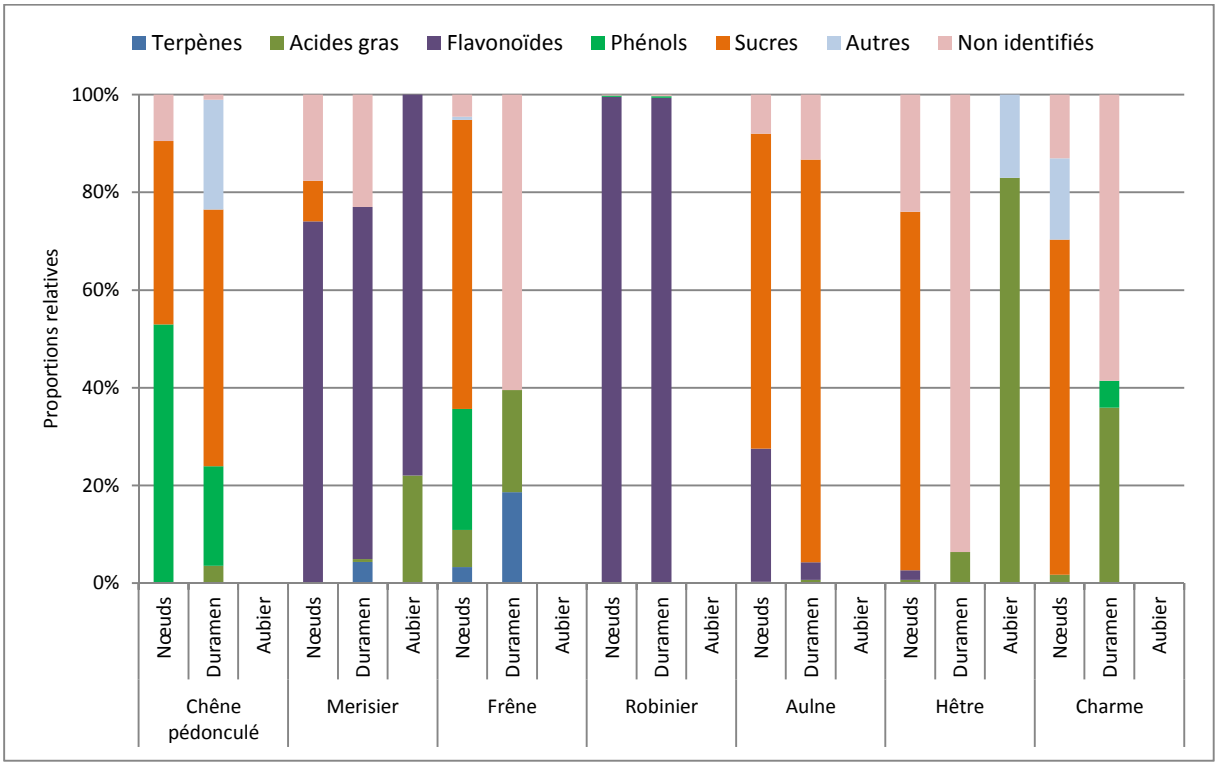


Figure 43 : Principales familles de composés extraits des feuillus par l'acétone et leurs proportions relatives.

Dans ces extraits, les sucres représentent des proportions variables d'une espèce à une autre, et même entre les différents bois d'une même essence. Le seul phénol extrait des nœuds et du duramen du chêne est l'acide gallique, constituant de base des tanins hydrolysables. Toutefois, les tanins majoritaires dans le chêne sont des éllagitanins (la vescalagine et la castalagine) dont l'hydrolyse libère l'acide éllagique (Mosedale et al., 1998 ; Peng et al., 1991 ; Zhang et al., 2015). La présence de l'acide gallique dans les chênes a été rapportée dans plusieurs études dans le cas d'un bois séché naturellement (Canas et al., 1999, 2000 ; Cerezo et al., 2014). L'acide gallique pourrait

donc être libéré suite à des réactions chimiques entre ses composants, notamment à cause de la déshydratation du bois.

L'observation précédente concernant la présence de flavonoïdes dans l'aubier du merisier est confirmée par l'extraction à l'acétone. Cette fois-ci, la catéchine est le flavonoïde majoritaire, y compris dans les nœuds de cet essence. La catéchine a été rapportée dans les branches du merisier mais en faibles proportions (McNulty et al., 2009). Le duramen du merisier de cette étude ne contient pas de catéchine mais uniquement la chalcone pinostrobine, la pinocembrine, la sakuranine, la tectochrysine et la naringenine ce qui est conforme à la littérature (Vinciguerra et al., 2003). Toutefois, les auteurs ont détecté la sakuranétine et non pas la sakuranine. D'autre part, ils ont isolé la pinostrobine et non pas la pinostrobine chalcone. Ces deux éléments laissent penser que le merisier échantillonné pour cette campagne est jeune (28 ans) et que ses extractibles sont en cours de biosynthèse. La catéchine est aussi présente en traces dans les extraits de l'aulne (nœuds et duramen) et dans les nœuds du hêtre. Les nœuds et le duramen du robinier sont particulièrement riches en robinétine et dihydrorobinétine, deux flavonoïdes caractéristiques de cette espèce (Magel et al., 1994). Enfin, malgré la présence de phénols simples dans les nœuds du frêne, aucun polyphénol n'y est détecté dans les conditions d'analyses utilisées. Les principales molécules identifiées dans ces feuillus sont représentées dans la figure 44.

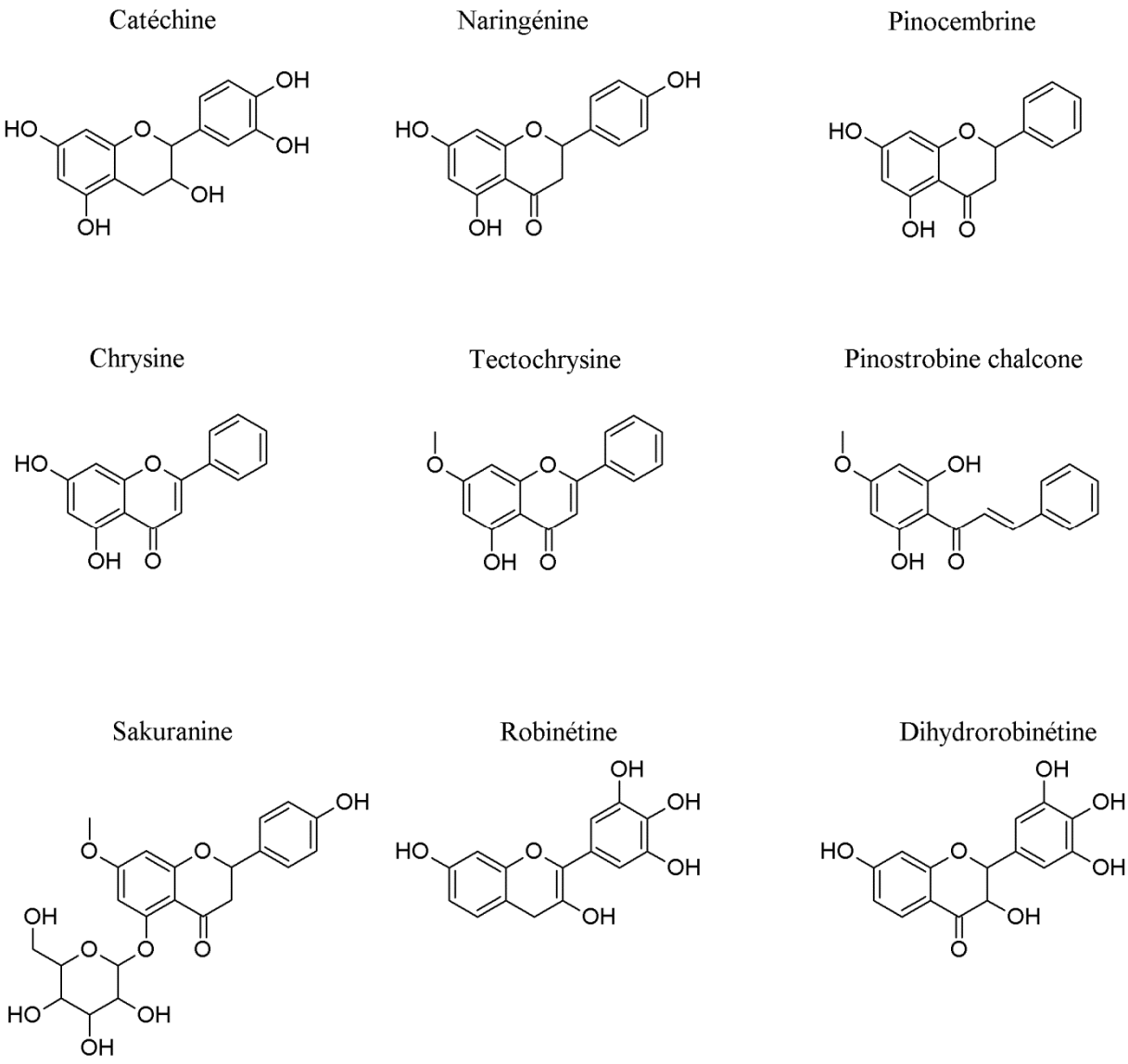


Figure 44 : Les principaux flavonoïdes identifiés dans les feuillus.

Article 1: Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species

Les résultats obtenus par l'extraction à l'acétone du bois de nœuds et de duramen présentés ci-dessus ont été publiés dans « Annals of Forest Science ». Cet article est présenté ici avec l'autorisation de la revue.

Annals of Forest Science (2015) 72:277–284
DOI 10.1007/s13595-014-0428-7

ORIGINAL PAPER

Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species

Zineb Kebbi-Benkeder · Francis Colin · Stéphane Dumarçay · Philippe Gérardin

Received: 12 June 2014 / Accepted: 3 October 2014 / Published online: 24 October 2014
© INRA and Springer-Verlag France 2014

Abstract

· ***Key message*** **Extractives are present in much larger amounts in knotwood than in heartwood in the 12 tested hardwood and softwood species. The chemical identity of the extractives varies largely among species, lignans being only present in softwood species.**

· ***Context*** Extractives from knotwood may constitute an important source of new chemicals and remain still poorly known.

· ***Aims*** The content of extractives (and particularly lignans) in knots was compared to that of heartwood in a number of different European softwood and hardwood species.

· ***Methods*** Twelve species characteristic of European forests were sampled. Extractions were carried out with four solvents of increasing polarity (dichloromethane, acetone, toluene/ethanol and water). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used for the identification of the compounds present in acetone extracts which are expected to contain lignans.

· ***Results*** In all tested species, knotwood presented larger contents of extractives than heartwood. The main compounds were lignans, stilbenes and flavonoids, lignans being present only in softwood species. With the exception of oak, knotwood in softwood species contain larger amounts of extractives than that in hardwood species.

· ***Conclusion*** The chemical nature of extractives present in knotwood varies with species. Their amount is generally much higher in softwood than heartwood species.

Keywords Extractive content · Knot · Softwood · Hardwood · Lignan · Flavonoid

Handling Editor: Jean-Michel Leban

Highlights Extractives are present in much larger amounts in knotwood than in heartwood in the 12 tested hardwood and softwood species. The chemical identity of the extractives varies largely among species, lignans being only present in softwood species.

Contribution of the co-authors Zineb Kebbi-Benkeder: carrying out the experiments, interpreting the results and writing the first draft of the paper.
Francis Colin: co-designing and coordination of the PhD thesis, species selection and tree sampling, interpreting the results and correction of the paper.
Stéphane Dumarçay: supervising the chemical analysis, interpreting the results and correction of the paper.
Philippe Gérardin: co-designing and coordination of the PhD thesis, supervision of chemical analysis, interpreting the results and correction of the paper.

Z. Kebbi-Benkeder · F. Colin
AgroParisTech, UMR 1092 LERFOB, 54000 Nancy, France

Z. Kebbi-Benkeder · F. Colin
INRA, UMR 1092 LERFOB, 54280 Champenoux, France

Z. Kebbi-Benkeder · S. Dumarçay · P. Gérardin
Université de Lorraine, EA 4370 LERMAB,
54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

P. Gérardin (✉)
Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, Bld des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cédex, France
e-mail: Philippe.Gerardin@univ-lorraine.fr

1 Introduction

Knots are the junctions between the tree stem and its branches which support leaves. Leaves are essential for tree photosynthesis and growth. Once a tree is harvested, the knots constitute the main defect in stem wood. Knots cause defects because this portion of stem wood is characterized by almost horizontal fibres with higher density and darker coloration. Thus, knots become undesirable in wood industries, especially in not only paper mills since high energy consumption is needed to defibrate knotwood during mechanical pulping but also in sawmills since their presence decreased mechanical

properties and commercial value of sawn products. Various studies revealed the richness of knotwood regarding their extractive components compared to heartwood in the case of several conifers such as spruce, fir and pine species (Holmbom et al. 2003; Willför et al. 2003a, b, 2004a, b; Sekine et al. 2013). Anderegg and Rowe (1974) reported that even up to 30 % of a glassy resin of economic interest can be obtained from the knots of Parana pine (*Araucaria angustifolia*). Softwood knots, which are available as by-products of pulp and paper industries, have been largely investigated and identified to contain not only lignans in concentrations up to several hundred times higher than heartwood (Willför et al. 2003a, b, 2004a, b) but also oligolignans (Willför et al. 2004c). Flavonoids have also been detected in softwood knots but in lower amounts than lignans, while stilbenes and juvabione have been reported predominately in knots of pines and firs, respectively (Willför et al. 2003b, 2004b).

Only a few hardwoods have been investigated such as willow, acacia and poplar species (Pohjamo et al. 2003; Pietarinen et al. 2005, 2006a). Their knots were found to contain lower extractive contents than coniferous knots. However, hardwood knots contained still higher quantities than the corresponding heartwood and flavonoids which were detected as the main components. Lignans have not been reported in hardwood knots except in one study in which the authors detected lignan-like compounds in beech and birch knots (Lindberg et al. 2004).

High levels of extractives in softwood knotwood have been interpreted as a response to stresses that the base of branch is subjected to (Willför et al. 2003b; Piispanen et al. 2008). Branches and thus knots develop reaction wood to face mechanical loads such as wind and snow, especially in the case of softwoods which do not lose their leaves during winter. Since lignans have been identified as lignin precursors (Lundquist et al. 2003), the presence of these latter ones may be due to higher lignin content around the knots in response to mechanical stress. On the other hand, knots can be considered as easy access for pathogen attacks, which may justify higher extractive contents to avoid infestation of the stem. Thus, the extractives may act either chemically because of their toxicity or physically because of the barrier they constitute to protect the rest of the non-decayed wood (Kirker et al. 2013).

The aim of the present study was thus to investigate the amounts and the nature of knotwood extractives of different European softwood and hardwood species. According to the numerous studies describing high amounts of lignans in knots of different softwoods and to their potential valorization, a quite particular attention was carried to these latter ones (Eklund et al. 2005; Willför et al. 2003a, b, 2004a, b). This is considered not only in order to consider potential valorization of these extractives but also to have a deeper insight of their role in the tree. For this purpose, 12 softwood and hardwood species were selected and their knotwood extractive contents determined after extraction with different solvents. The composition of acetone extracts, supposed to contain the highest content of lignans, was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and compared to literature data.

2 Material and methods

2.1 Woody material

Five softwood species (*Abies alba* Mill., *Picea abies* (L.) Karst., *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *Larix decidua* Mill and *Pinus sylvestris* L.) and seven hardwood species (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn, *Prunus avium* L., *Robinia pseudoacacia* L., *Carpinus betulus* L., *Fagus sylvatica* L., *Fraxinus excelsior* L. and *Quercus petraea* (Mattus.) Liebl) (Rameau et al. 1989) were selected for this study (Table 1). For each species, one healthy tree was felled in winter 2012–2013. All the trees were sampled in the Champenoux and Amance forests, near Nancy in northeast France.

On every trunk, a disc was sawn both at the stump and at a height of 1.3 m. Above these two discs, several discs were sawn along the length of the trunk containing either dead or living knots. Knots, dead or alive, were removed from each disc using a wood chisel, while heartwood was sampled from the disc sawn at a height of 1.3 m. The inner part of that disc was sampled to be sure that only heartwood was taken, especially in the case of non-coloured heartwood species (beech, spruce, fir, etc.). The annual rings were counted on the stump disc. Data on the sampled trees and the number of knots investigated are summarized in Table 1. All samples were dried at 50 °C until mass stabilization. For each tree, all knots (dead or alive) were mixed all together and ground to fine sawdust with particle size between 0.2 and 0.4 mm before drying at 103 °C to be sure to have a screening as large as possible of potential secondary metabolites. Heartwood was ground to similar grain size and dried at 103 °C. All samples were frozen until they were used for extraction.

2.2 Extraction

Each powder was Soxhlet-extracted using four successive solvents of increasing polarity: methylene chloride, acetone, toluene/ethanol (2/1, v/v) and water. After each extraction, organic solvents were evaporated under vacuum using a rotary evaporator while water was freeze-dried. Dried extractives were stored in a freezer before GC-MS analyses.

Table 1 Data about the trees and the number of knots sampled

Species	Common name	Age (annual rings)	Height (m)	Diameter (cm)	Knots sampled
Abies alba	Silver fir	50	22.4	21	9
Picea abies	Norway spruce	42	19.4	25	8
Pseudotsuga menziesii	Douglas fir	47	21.4	23	10
Larix spp.	Larch	55	23.3	25	14
Pinus sylvestris	Scots pine	40	23.2	30	6
Alnus glutinosa	Alder	29	20.7	26	14
Prunus avium	Cherry	28	17.1	21	9
Robinia pseudoacacia	Black locust	37	20.2	28	10
Carpinus betulus	Hornbeam	101	22.1	26	6
Fagus sylvatica	Beech	98	17.9	22	9
Fraxinus excelsior	Ash	83	20.2	33	7
Quercus petraea	Oak	90	21.9	27	13

2.3 GC-MS analyses

Based on literature (Willför et al. 2003a, b), mainly acetonic extracts were investigated. One to 2 mg of the dried acetone extracts were silylated by adding 80 μL of BSTFA/TMSCl (99/1) and heated at 50 °C for 12 h. Then, the solvent was evaporated and extract derivatives were diluted in 1 mL ethyl acetate and transferred into a glass vials for gas chromatography analysis. GC-MS analysis was performed on a Clarus 500 gas chromatograph coupled to a Clarus 500 MS quadrupole mass spectrometer (Perkin Elmer Inc., USA). Gas chromatography was carried out on a 5 % diphenyl/95 % dimethyl polysiloxane fused-silica capillary column (DB-5ms, 30 m×0.25 mm, 0.25-μm film thickness, J&W Scientific, USA) with helium as carrier gas at a constant flow of 1 mL/min. The gas chromatograph was equipped with an electronically controlled split/splitless injection port. The injection (1 μL) was performed at 250 °C in the splitless mode. The oven temperature programme was as follows: 80 °C for 2 min, increase from 80 to 190 °C at a rate of 10 °C/min, increase from 190 to 280 °C at a rate of 15 °C/min and hold for 5 min, then 10 °C/min until 300 °C hold for 14 min. Ionization was achieved under the electron impact mode (70 eV ionization energy). The source and transfer line temperatures were 250 and 300 °C, respectively. Detection was carried out in scan mode: $m/z=45$ to $m/z=800$. The detector was switched off in the initial 2 min (solvent delay). Compounds were identified by comparison with spectra from the NIST (US National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) mass spectral library (Edition of 2005) and published mass spectra of lignans (Ekman 1976; 2002; Willför et al. 2005; Smeds et al. 2012). Pure taxifolin, dihydrorobinetin and robinetin were purchased from Extrasynthese, France, and used as reference compounds. Peaks on the chromatograms were integrated to determine the relative concentrations of the main compound families.

3 Results

Figure 1 presents the knotwood and heartwood extractive content of the 12 tree species according to the extraction solvent.

The total amount of knotwood and heartwood extractives is reported as the sum of the four successive extractions. Except in the case of black locust, knots of all species contained higher quantities of extractives than heartwood. The overall knotwood extractives content ranged from a slightly less than 40 % of the dry sawdust in the case of larch or Scots pine to a slightly less than 10 % for hornbeam and beech. From our limited sampling, the lowest concentrations of knot extractives were observed for hardwoods while the highest concentrations were observed for softwoods. Oak is inserted between two softwoods, and cherry knotwood concentration is very close to Douglas fir concentration. Hardwoods contained more hydrophilic and polar extractives as demonstrated by the large amounts of extractives obtained with the mixture toluene/ethanol or water, while softwoods contained higher amounts of extractives of lower polarity extracted with dichloromethane or acetone. Although knots of larch and Scots pine presented the highest extractive content, their composition varied significantly. Indeed, larch contained an important amount of aqueous extractives similar to hardwood species, while Scots pine knotwood extracts were mainly composed of lipophilic compounds. According to our results, knots of conifers were richer than those of hardwoods except in the case of oak which contained as much extracts as Norway spruce or silver fir knots. The contribution of each solvent in

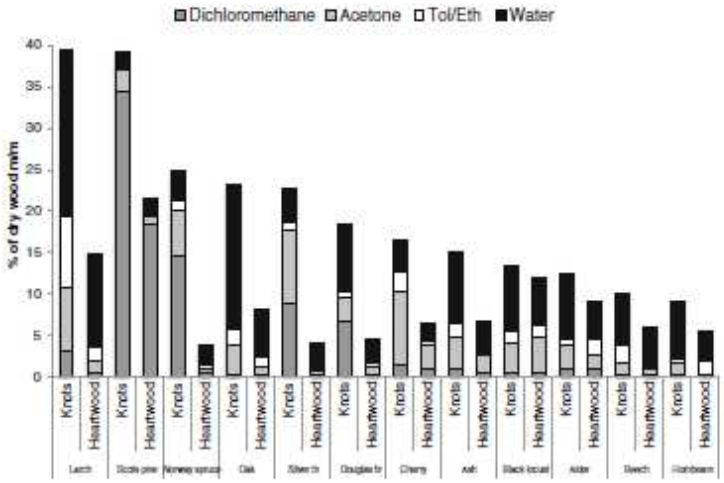


Fig. 1 Knotwood and heartwood extractive contents obtained by successive extractions with four solvents of increasing polarity

the total amount of extractives varied considerably according to the species.

3.1 Identification of the extracted compounds

GC-MS analyses were performed on knotwood and heartwood acetone extracts. Acetone was chosen as solvent because of its efficiency to extract lignans (Willför et al. 2003a, b). The main families of chemical identified in knots were terpenes, lignans, stilbens, flavonoids and sugar derivatives (Table 2).

Lignans were present mainly in conifer knots, Norway spruce and silver fir knots being the richest source of these compounds. Hydroxymatairesinol (HMR) was the most abundant lignan in Norway spruce knotwood, while secoisolariciresinol (SECO) was the dominant lignan in silver fir knotwood. SECO was also the most abundant lignan in the knotwood of Douglas fir and larch. Nortrachelogenin (NTG) was the main lignan in the knotwood of Scots pine, which is the only softwood species containing also stilbenes with pinosylvin and pinosylvin monomethyl ether as main components. Higher amounts of unknown compounds were present in Douglas fir knots compared to the other conifer knots. These compounds, not identified by GC-MS, are probably oligolignans as reported previously (Willför et al. 2003a, b, 2004a, b, c). In the case of Norway spruce, α-conidendrin was the only lignan detected in heartwood, while hydroxymatairesinol was the main lignan identified in knotwood. According to these results, knotwood of softwoods and to a lesser extent heartwood of some softwoods appear as an interesting source for the extraction of lignans as previously reported in the literature (Fig. 2).

Flavonoids like dihydrorobinetin, catechin and taxifolin were the main components identified in black locust, cherry and larch knotwood. Flavonoids were also reported in acacia knotwood (Pietarinen et al. 2005). Alder and Douglas fir also contained high amounts of flavonoids, with catechin and taxifolin being the dominant flavonoids. Our results are in accordance with former studies (Willför et al. 2003c; Lindberg et al. 2004; Pietarinen et al. 2006b). Beech knotwood contained small amounts of flavonoids consisting mainly of catechin. Flavonoid glycosides were not detected in the knotwood, although they were reported in the knotwood of poplar (Pietarinen et al. 2006a) and willow (Pohjamo et al. 2003). High quantities of carbohydrate derivatives, identified by GC-MS, could result from hydrolysis of the flavonoid glycosides or from the presence of sapwood in the knots sampled (Willför et al. 2005). Sugar derivatives are the main components identified in ash, beech and hornbeam knotwood. Sugar derivatives and gallic acid, probably resulting from hydrolysis of hydrolysable tannins, were the dominant compounds in oak knotwood. Abietic and dehydroabietic resin acids as well as palmitic, oleic and other fatty acids were detected in almost all the knotwoods. Small amounts of β-sitosterol were also detected in some knotwood.

Contrary to knotwood, lignans were practically absent from the heartwood of all studied softwoods except Norway spruce, which contains up to 13 % of α-conidendrin. Stilbenes, like pinosylvin and pinosylvin monomethyl ether, were detected as the main products contained in Scots pine heartwood. Flavonoids represent the most common family of extractives present in heartwood extracts: taxifolin, 36.4 % in larch; dihydrochrysin and sakuranin, 29.0 and 24.3 %, respectively, in cherry and dihydrorobinetin, 63.8 % in black locust.

4 Discussion

One of the first objectives of this study was to realize a first screening of the quantities of extractives present in knotwood

Table 2 Percentage of the main identified products and main families of products detected in knotwood successive acetone extracts by GC-MS

Species	Knotwood		Heartwood		Family
	Compound, retention time (min)	Relative content (%)[a]	Compound, retention time (min)	Relative content (%)[a]	
Larch	Taxifolin, 24.59	45.2	Taxifolin, 24.44	36.4	Flavonoid
	Secoisolariciresinol, 24.77	22.4			Lignan
	Nortrachelogenin, 26.17	3.8			Lignan
Scots pine	Pinosylvin, 18.57	34.0	Pinosylvin, 18.61	39.1	Stilbene
	Pinosylvin monomethyl ether, 18.81	42.0	Pinosylvin monomethyl ether, 18.83	29.1	Stilbene
	Nortrachelogenin, 26.12	19.0			Lignan
Norway spruce	Hydroxymatairesinol and mixture of diastereomers, 26.33 and 26.45	64.3			Lignan
			α-Conidendrin, 28.19	13.2	Lignan
			Fatty acids[b]	12.3	Fatty acid
Silver fir	Secoisolariciresinol, 24.07	26.6			Lignin
			Fatty acids[b]	22.5	Fatty acid
Douglas fir	Taxifolin, 24.51	5.8			Flavonoid
	Secoisolariciresinol, 24.73	9.0			Lignan
	Phenylhexanoic acid, 13.43	17.2	Phenylhexanoic acid, 13.40	42.7	
			Juvabione, 16.48	20.9	Terpenoid
Oak	Gallic acid, 16.14	53.0	Gallic acid, 16.14	17.6	Phenol
Cherry	Catechin, 22.98	47.5			Flavonoid
			Dihydrochrysin, 19.83	29.0	Flavonoid
			Sakuranin, 22.13	24.3	Flavonoid
Ash	Cinnamaldehyde, 15.40	2.7			Phenyl propanoid
	Fatty acids[b]	5.6			Fatty acid
	β-Sitosterol, 29.03	2.0			Terpenoid
			Fatty acids[b]	20.9	Fatty acid
			Resin acids[c]	18.6	Terpenoid
Black locust	Dihydrorobinetin, 24.13	49.3	Dihydrorobinetin, 24.16	63.8	Flavonoid
Alder	Catechin, 22.39	5.9	Catechin, 22.93	3.0	Flavonoid
Beech	Catechin, 22.95	2.0			Flavonoid
			Palmitic acid, 16.84	6.3	Fatty acid
Hornbeam	β-Sitosterol, 28.92	4.1			Terpenoid
	Fatty acids[b]	12.6	Fatty acids[b]	35.9	Fatty acid

[a] Relative concentration (%) were determined from the total ion chromatogram (TIC)

[b] Fatty acids: palmitic acid, oleic acid, stearic acid, linoleic acid, etc.

[c] Resin acids: abietic acid, dehydroabietic acid, pimaric acid, isopimaric acid, etc.

comparatively to those present in heartwood for different European softwood and hardwood species. For all studied species, knotwood contained higher amount of extractives than heartwood. The amount of extractives differed slightly from previous published data (Willför et al. 2003a, b, 2004a, b; Pietarinen et al. 2006b), likely because of the nature of the solvents used and the intra-specific variability. Nevertheless, the richness of the knotwood compared to the corresponding

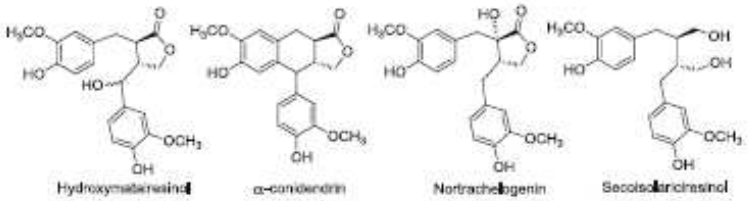


Fig. 2 Structure of main lignans identified in knot and heartwood extractives

heartwood was confirmed. The fact that knotwood contains higher extractive amounts than heartwood suggests that knots are strategic points for the living tree. This finding supports the hypothesis that the junction between the trunk and branches are essential for a tree, ensuring sap flow between stem wood and leaves. These junctions also support important mechanical loads due to the weight of the branches and environmental factors like wind and precipitation which induce strong mechanical constraints. Changes in the fibre orientation surrounding knots as well as self-pruning of branches after their death could also be at the origin of entry for pathogens and oxygen which can damage living tissues of the stem. This is at least the case for beech wood red-heart phenomenon, which leads to a degradation of some chemical components (Bauch and Koch 2001). Therefore, knots must be both mechanically and decay resistant. Although large differences between species were found regarding the amounts and partition of the extractives between the different solvents used, knotwood extractive content is higher for all species studied (Fig. 1). Amount of extractives solubilized in the different solvents indicated an important heterogeneity between species of the extractives present in knots. Indeed, while dichloromethane is able to solubilize most of the extractives present in Scots pine and spruce, acetone dissolved the highest fraction of extractives in the case of fir or cherry and water in the case of other wood species like oak, black locust or larch…

Knotwood of softwoods contains mainly lignans, whereas knotwood of hardwoods contains mainly flavonoids, tannins and/or sugars. Surprisingly, lignans were not detected in hardwood knots sampled in our study. On the basis of implication of coniferylic alcohol in the biosynthesis of both lignans and lignins (Suzuki and Umezawa 2007), high lignan contents in coniferous knots suggest that lignans may play a specific role in the formation of compression wood developed in softwoods, which is highly lignified (Timell 1982). Interestingly, Willför et al. (2003a) reported that compression wood in Norway spruce knots contained less lignans than the opposite wood in the same knot, suggesting the potential implications in the lignification process to reinforce knot tissues involved in branches support. On the other hand, tension wood developed in hardwood species is reported to contain higher polysaccharide contents, which could be in agreement with the higher sugar derivative contents detected in hardwood extracts. However, these hypotheses according to which softwood species mobilize lignans to reinforce compression wood, while hardwood species mobilize sugars to reinforce tension wood are speculative and need further investigation. Another explanation of the higher amounts of extractives in knotwood may be connected to their role in wood durability and protection against biotic and abiotic agents. Lignans are abundant in softwoods and are known to be good antioxidants and radical scavengers (Willför et al. 2003c; Pietarinen et al. 2006b). Extractives may protect heartwood using at least three different mechanisms: fungicidal activity, free radical scavenging/antioxidation and metal chelation (Schultz and Nicholas 2000, 2002). Moreover, either natural or synthetic antioxidants have been reported to present synergistic effects with antifungal agents (Yen and Chang 2008; Mabicka et al. 2005). Presence of lignans may therefore be essential to protect the wood surrounding the knot against pathogens and oxidative injuries. Similarly, flavonoids are known to possess fungicidal properties (Neascu et al. 2007), meaning that these compounds present in the knots of cherry, alder and black locust may retard the progression of wood decay fungi. A similar effect may be involved in the case of oak knots, which contained important amounts of hydrolysable tannins, reported to be involved in oak wood durability (Aloui et al. 2004). Besides the differences concerning the amounts of extractives observed between knotwood and heartwood, the chemical composition of extractives differs more or less between these two types of wood. We observed that some compounds found in knotwood are also present in heartwood, like taxifolin in larch, stilbenes in Scots pine, dihydrorobinetin in black locust or gallic acid in oak. We observed also that chemical composition of knotwood and heartwood may also differ considerably. Indeed, the repartitioning of the main families of products detected in knotwood and heartwood successive acetone extracts by GC-MS presented important differences for several species (Fig. 3).

Overall chemical composition may also vary considerably as for Norway spruce and silver fir for which knotwood extracts contained mainly lignans, which are only present in small quantity or totally absent from heartwood (Fig. 3). This is not the case for Scots pine, for which knotwood and heartwood extractives are mainly constituted of stilbenes and for cherry and black locust for which both type of wood contains mainly flavonoids. It turns out that lignans appear to be specific extractives of softwood knots. On the other hand, as previously indicated, knotwood of hardwood contains an important amount of saccharides which may also be present in hardwoods like alder. These differences of chemical composition of knots of softwood containing mainly lignans and knots of hardwood containing mainly saccharides suggest a possible implication of these extractives in compression and tension wood formation, while phenolic compounds like lignans, flavonoids, stilbenes or tannins are likely involved in defence strategies.

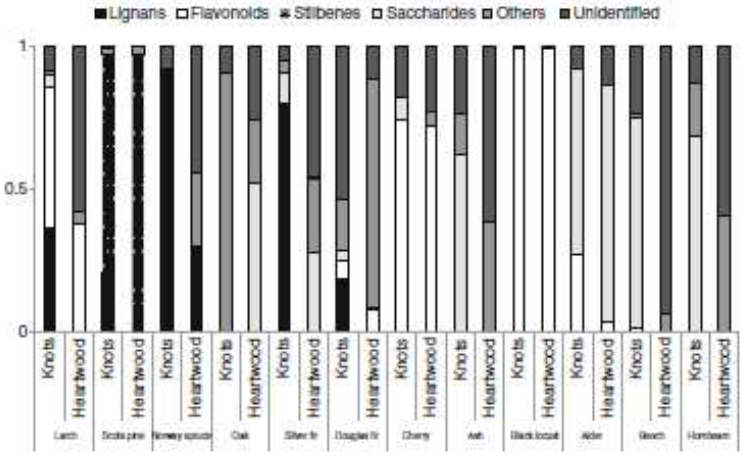


Fig. 3 Repartition of the main families of products detected in knotwood and heartwood successive acetone extracts by GC-MS (relative concentration were determined from the TIC)

Considering the fact that alder, cherry and black locust are commonly considered as rather bad pruning species, it is interesting to mention that the knots of those trees contained higher quantities of flavonoids compared to the knots of the other hardwoods *C. betulus*, *F. sylvatica*, *F. excelsior* and *Q. petraea*. These flavonoids may slow down the dynamics of biotic and abiotic agents involved in the degradation of dead branches during natural pruning. The other hardwoods that self-prune easily (Schütz 1990) were found to contain no or small traces of flavonoids. Good pruning of oak branches, for which knots contain mainly hydrolysable tannins, may be due to the poor resistance of these compounds to leaching. Similar arguments may explain the lack of natural pruning ability in Norway spruce, silver fir and Douglas fir based on the high quantities of lignans contained in these species. These observations are in agreement with the observation that the knots of *A. angustifolia*, which remained intact in forest for several years, were found to contain 90 % of lignans among their overall extracts (Anderegg and Rowe 1974). However, the presence of lignans in larch and Scots pine, which are considered as having a good pruning ability, make this interpretation likely dependent on the species. This suggests that lignans may perform other functions in the wood and that degradation of the outside branches and extractive content of the internal knot may be not systematically related for all species.

5 Conclusion

This study confirms that independently of the nature of the species studied, knots contain always higher extractive content than corresponding heartwood. The composition and the amount of knotwood extractives were found to vary considerably between the 12 trees species investigated in this study. Lignans were confirmed to be present in all the softwoods studied, while they were totally lacking in hardwoods which were shown to contain flavonoids and saccharides. Even if the role of lignans in lignin formation is still under discussion, an explanation of the presence of lignans in softwoods may be their involvement in lignification of compression wood. Compression wood is reported to contain higher amounts of lignin than "normal" wood. The fact that tension wood is reported to contain higher amounts of polysaccharides could be in accordance with the high amount of saccharides detected in hardwood knots. However, these hypotheses are purely speculative and further studies are necessary to obtain deeper insight on the role of these extractives. High extractive content and nature of these extractives may also be involved in defence strategy and branch departure constituting potential weakness subjected to biotic and abiotic injuries. Extractives may also be involved in the natural ability of trees to self-prune. Wood species with high flavonoid content were generally bad pruning species. Although a lot of work to understand the exact role of extractives present in the knots and their specificity according to wood species remain, these results clearly demonstrate that knots are a valuable source of biomolecules like lignans or flavonoids susceptible to further industrial processing. However, a deeper assessment of the forest resource in knotwood extractives is needed for the most promising wood species to evaluate the effect of the within-tree and intra-specific variability before industrial development.

Acknowledgments Authors thank warmly Bruno Garnier, Loïc Dailly, Alain Mercanti and Nicolas Houssement for their technical support. The authors gratefully acknowledge the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) for the doctoral fellowship granted to the first author (CJS no. 12-00006889). The UMR 1092 LERFoB and EA 4370 LERMAB are supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" programme (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). Thanks at last to the forest managers D. Collinet and Y. Ehrhardt, respectively, from the National Forest Service ONF and AgroParisTech who provided the material from the Champenoux and Amance forests.

References

Aloui F, Ayadi N, Charrier F, Charrier B (2004) Durability of European oak (Quercus petraea and Quercus robur) against white rot fungi (Coriolus versicolor): relations with phenol extractives. Holz als Roh- und Werkstoff 62:286–290. doi:10.1007/s00107-004-0489-7

Anderegg RJ, Rowe JW (1974) Lignans, the major component of resin from Araucaria angustifolia knots. Holzforschung 28:171–175. doi:10.1515/hfsg.1974.28.5.171

Bauch J, Koch G (2001) Biological and chemical analyses about wood discolourations of common beech (Fagus sylvatica [L.]) and possibilities of preventing measures]. Final Report, Bundesforschungsanstalt für Forstund Holzwirtschaft, Universität Hamburg, 66 pp

Eklund P, Langvik O, Warna J, Salmi T, Willför S, Sjoholm R (2005) Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. Organic and Biomolar Chem 3:3336–3347. doi:10.1039/B506739A

Ekman R (1976) Analysis of lignans in Norway spruce by combined gas chromatography-mass spectrometry. Holzforschung 30:79–85. doi:10.1515/hfsg.1976.30.3.79

Ekman R, Willför S, Sjöholm R, Reunanen M, Mäki J, Lehtilä R, Eckerman C (2002) Identification of the lignan nortrachelogenin in knot and branch heartwood of Scots pine (pinus sylvestris L.). Holzforschung 56:253–256. doi:10.1515/HF.2002.041

Holmbom B, Eckerman C, Eklund P, Hemming J, Nisula L, Reunanen M, Sjöholm R, Sundberg A, Sundberg K, Willför S (2003) Knots in trees—a new rich source of lignans. Phytochem Rev 2:331–340. doi:10.1023/B:PHYT.0000045493.95074.a8

Kirker GT, Blodgett AB, Arango RA, Lebow PK, Clausen CA (2013) The role of extractives in naturally durable wood species. Int Biodeterior Biodegrad 82:53–58. doi:10.1016/j.ibiod.2013.03.007

Lindberg LE, Willför SM, Holmbom BR (2004) Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. J Ind Microbiol Biotechnol 31:137–147. doi:10.1007/s10295-004-0132-y

Lundquist K, Langer V, Li S, Stomberg R (2003) Lignin stereochemistry and its biosynthetic implications. 12th international symposium on wood and pulping chemistry, USA 239–244

Mabicka A, Dumarçay S, Rouhier N, Linder M, Jacquot JP, Gérardin P, Gelhaye E (2005) Synergistic wood preservatives involving EDTA, Irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-*N*-oxide. Int Biodeterior Biodegrad 55:203–211. doi:10.1016/j.ibiod.2005.01.002

Neacsu M, Eklund PC, Sjöholm RE, Pietarinen SP, Ahotupa MO, Holmbom BR, Willför SM (2007) Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. Holz Roh Werkst 65:1–6. doi:10.1007/s00107-006-0121-0

Pietarinen P, Willför SM, Sjöholm RE, Holmbom BR (2005) Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 3 : Knots and heartwood of Acacia crassicarpa and A. mangium. Holzforschung 59:94–101. doi:10.1515/HF.2005.015

Pietarinen SP, Suivi P, Willför SM, Vikström FA, Holmbom BR (2006a) Aspen knots, a rich source of flavonoids. J Wood Chem Technol 26:245–258. doi:10.1080/02773810601023487

Pietarinen SP, Willför SM, Ahotupa MO, Hemming JE, Holmbom BR (2006b) Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. J Wood Sci 52:436–444. doi:10.1007/s10086-005-0780-1

Piispanen R, Willför S, Saranpää P, Holmbom B (2008) Variation of lignans in Norway spruce (Picea abies [L.] Karst.) knotwood: within-stem variation and the effect of fertilisation at two experimental sites in Finland. Trees-Struct Funct 22:317–328. doi:10.1007/s00468-007-0186-3

Pohjamo SP, Hemming JE, Willför SM, Reunanen MHT, Holmbom BR (2003) Phenolic extractives in salix caprea wood and knots. Phytochem 63:165–169. doi:10.1016/S0031-9422(03)00050-5

Rameau JC, Mansion D, Dumé G, Timbal J, Lecointe A, Dupont P, Keller R (1989) Flore forestière Française, guide écologique illustré. 1. Plaines et collines. Institut pour le développement forestier. Ministère de l'agriculture et de la forêt. Ecole nationale du génie rural des eaux et des forêts.

Schultz TP, Nicholas DD (2000) Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. Phytochem 54:47–52. doi:10.1016/S0031-9422(99)00622-6

Schultz TP, Nicholas DD (2002) Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. Phytochem 61:555–560

Schütz (1990) Sylviculture 1. Principes d'education des forets. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne; Switzerland 243p pp

Sekine N, Shibutani S, Yatagai M (2013) Chemical composition of the terpenoids in wood and knots of Abies species. Eur J Wood Wood Prod 71:679–682. doi:10.1007/s00107-013-0715-2

Smeds AI, Ceskova I, Eklund PC, Willför SM (2012) Identification of new lignans in Norway spruce knotwood extracts. Holzforschung 66:553–567. doi:10.1515/hf-2011-0218

Suzuki S, Umezawa T (2007) Biosynthesis of lignans and norlignans. J Wood Sci 53:273–284. doi:10.1007/s10086-007-0892-x

Timell TE (1982) Recent progress in the chemistry and topochemistry of compression wood. Wood Sci Technol 16:83–122. doi:10.1007/BF00351097

Willför SM, Hemming J, Reunanen M, Eckerman C, Holmbom BR (2003a) Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and heartwood. Holzforschung 57:27–36. doi:10.1515/HF.2003.005

Willför SM, Hemming J, Reunanen M, Holmbom B (2003b) Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and heartwood. Holzforschung 57:359–372. doi:10.1515/HF.2003.054

Willför SM, Ahotupa MO, Hemming JE, Reunanen MHT, Eklund PC, Sjöholm RE, Eckerman CSE, Pohjamo SP, Holmbom BR (2003c) Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. J Agric Food Chem 51:7600–7606. doi:10.1021/jf030445h

Willför SM, Nisula L, Hemming J, Reunanen M, Holmbom BR (2004a) Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1 : Knots and heartwood of different spruce species. Holzforschung 58:335–344. doi:10.1515/HF.2004.052

Willför SM, Nisula L, Hemming J, Reunanen M, Holmbom BR (2004b) Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2 : Knots and heartwood of fir species. Holzforschung 58:650–659. doi:10.1515/HF.2004.119

Willför SM, Reunanen M, Eklund P, Sjöholm R, Kronberg L, Fardim P, Pietarinen S, Holmbom B (2004c) Oligolignans in Norway spruce and Scots pine knots and Norway spruce heartwood. Holzforschung 58:345–354. doi:10.1515/HF.2004.053

Willför SM, Eklund P, Sjöholm R, Reunanen M, Sillanpää R, Von Schoultz S, Hemming J, Nisula L, Holmbom BR (2005) Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 4 : Identification of two new 7-hydroxy divanillyl butyrolactol lignans in some spruce, fir, and pine species. Holzforschung 59:413–417. doi:10.1515/HF.2005.067

Yen TB, Chang ST (2008) Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. Bioresour Technol 99:232–236. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.022

3.1.2 L'extraction avec un seul solvant

Des tests supplémentaires ont été réalisés sur les poudres restantes de cette première campagne d'échantillonnage. Il s'agissait d'extraire les broyats en une seule étape avec l'acétone ou le mélange Tol/Eth (2/1). Ces deux solvants ont été retenus étant donnée leur polarité intermédiaire par rapport au dichlorométhane et à l'eau. Les résultats sont comparés à ceux obtenus précédemment en deux étapes (dichlorométhane puis acétone), en trois étapes (dichlorométhane puis acétone puis toluène/éthanol) et en quatre étapes (dichlorométhane puis acétone puis toluène/éthanol puis eau).

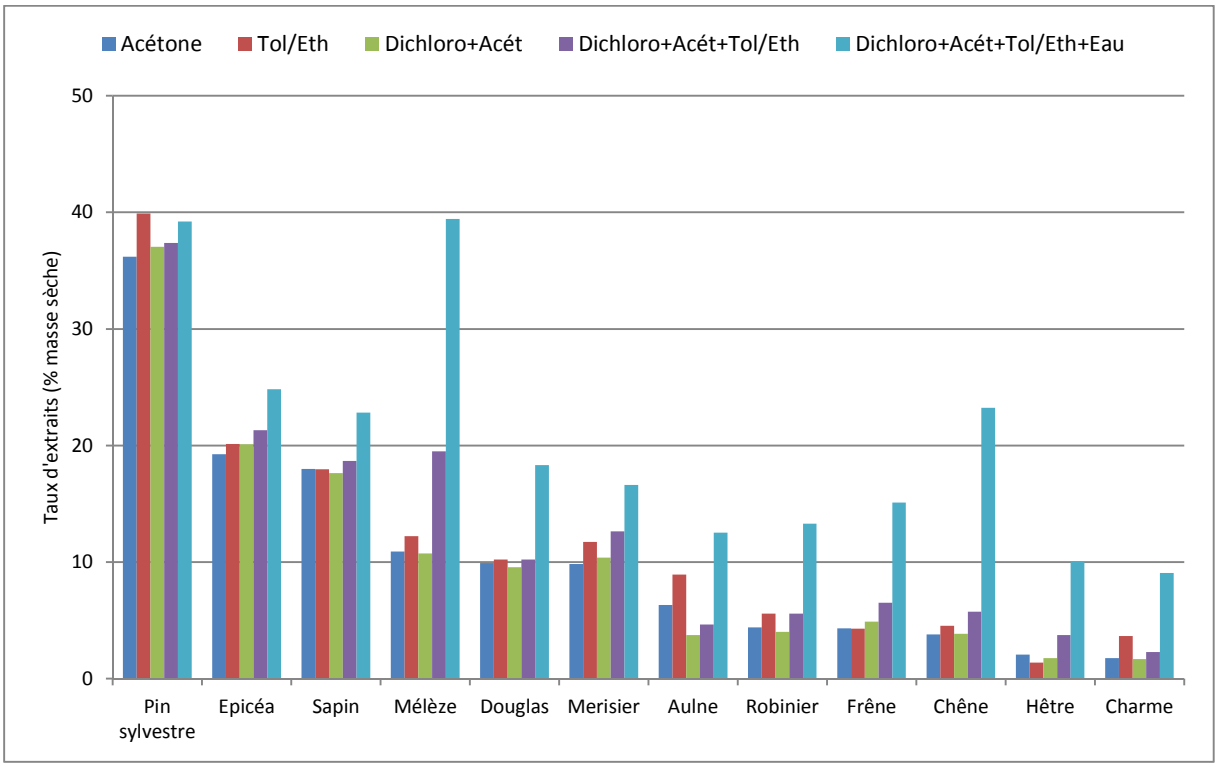


Figure 45 : Comparaison des taux d'extraits nodaux obtenus en une seule extraction utilisant l'acétone ou un mélange toluène/éthanol avec ceux obtenus en utilisant successivement plusieurs solvants de polarité croissante.

Les résultats des extractions menées indépendamment avec un seul solvant montrent que le toluène/éthanol (2/1, v/v) extrait légèrement plus de molécules que l'acétone seul, excepté dans le cas du sapin, du frêne et du hêtre où les différences sont négligeables. Le classement décroissant des taux d'extraits dans les nœuds change avec un regroupement plus net des résineux et des feuillus. Le mélèze n'est plus l'essence la plus riche en extractibles nodaux car la majorité de ses extraits sont aqueux. Pour la même raison, les nœuds du chêne ont perdu leur place entre l'épicéa et le sapin. Dans le cas des résineux, extraire avec un seul solvant se révèle aussi efficace qu'extraire avec deux, trois ou quatre solvants successivement (excepté pour le mélèze et le douglas) laissant envisager une économie d'étapes d'extraction et donc de temps nécessaire pour extraire un maximum de substances. Dans le cas des feuillus, l'eau est le solvant qui a extrait la majorité des extractibles, il est

donc nécessaire de l'employer en complément d'un autre solvant pour extraire un maximum de molécules. L'inconvénient majeur de l'emploi d'un seul solvant avec une polarité intermédiaire est la pureté des extraits puisque les terpènes, les carbohydrates et les phénols sont extraits au même temps. Alors que les extractions successives présentent par contre l'avantage de mieux fractionner ces familles chimiques.

Les conditions d'extraction ont donc une grande influence sur les taux d'extraits, et même sur la nature des molécules. La plupart des études des extraits de nœuds ont procédé par extraction accélérée avec successivement de l'hexane et un mélange acétone : eau (95 : 5). Fang et al., (2013) ont testé plusieurs conditions de température, durée, solvant, etc. et les taux obtenus après une extraction avec un mélange éthanol/eau (80 : 20) sont les plus élevés, surtout pour extraire les pinosylvines et la nortrachelogénine. D'autre part, l'extraction avec l'éthylacétate a permis de solubiliser le maximum d'acides gras et d'acides résiniques. Hartonen et al., (2007) ont essayé plusieurs techniques d'extraction (soxhlet, reflux, ultrasonic, eau pressurisée) et ont obtenu les plus grandes concentrations de naringénine dans les nœuds de peuplier avec le soxhlet en utilisant le méthanol et en extrayant pendant 48 heures. L'extraction avec l'eau pressurisée a permis d'obtenir des concentrations légèrement plus faibles mais en peu de temps (35 minutes). Les conditions d'extractions sont donc à optimiser en fonction des molécules cibles, des durées optimales souhaitées, des exigences environnementales, etc.

3.2 Seconde campagne d'échantillonnage

Lors de cette seconde campagne, un nouvel échantillonnage plus détaillé a été réalisé : c'est-à-dire que les nœuds vivants d'un même arbre ont été regroupés selon trois positions : en bas, au milieu et en haut de l'arbre. Ces positions sont liées à l'âge des nœuds, ainsi les nœuds du bas sont les plus âgés et les nœuds du haut de l'arbre sont les plus jeunes. Enfin, un échantillon supplémentaire de nœuds morts a été analysé lorsque ces derniers étaient présents sur l'arbre. L'objectif étant de rechercher une possible corrélation entre la position (ou l'âge) du nœud et les quantités et/ou la nature des molécules qu'il contient.

Par ailleurs, le mélèze analysé dans la première campagne a présenté des profils d'extraits nodaux similaires à ceux des feuillus (présences de flavonoïdes et dominance des extraits aqueux). Le mélèze est une exception parmi les résineux. D'une part, il contient de fortes concentrations d'arabinogalactanes, alors que les autres résineux contiennent à peine 1 % ; d'autre part il perd ses aiguilles en hiver (Côté et al., 1966). Côté et al. 1966 ont exclu un rôle potentiel de l'arabinogalactane dans la chute des feuilles chez le mélèze, mais la question mérite d'être examinée au vue des nouveaux résultats sur les extractibles nodaux. Pour cela d'autres gymnospermes caduques (le

cyprès chauve, le métasequoia et le ginkgo biloba), et des feuillus à feuilles persistantes (le chêne vert, le buis et le houx) ont été échantillonnés. Le ginkgo biloba n'est pas un résineux à proprement parlé (il est l'unique représentant de la famille des ginkgoaceae). Par généralisation, le terme de « résineux » est communément utilisé pour désigner l'ensemble des gymnospermes. Enfin, le pin maritime, le cèdre de l'Atlas, l'if, le noyer et le châtaignier complètent cette sélection. Pour cette campagne, des extractions en quatre étapes successives ont été menées sur les poudres de bois.

Nom commun	Hauteur (m)	Diamètre à 1,3 m (cm)	Age
Pin maritime	14,0	29,9	36
Cèdre de l'Atlas	8,6	14,4	24
If	5,6	12,6	41
Cyprès Chauve	6,9	16,2	39
Métasequoia	12,0	22,3	35
Ginkgo biloba	5,8	8,2	43
Châtaignier	14,4	24,7	18
Chêne vert	7,1	18,3	46
Noyer	8,3	18,4	41
Buis	7,5	11,4	110
Houx	15,3	22,5	73

Tableau 4 : Caractéristiques des arbres échantillonnés lors de la deuxième campagne.

3.2.1 Cas des résineux

3.2.1.1 Taux massiques d'extractibles dans les bois

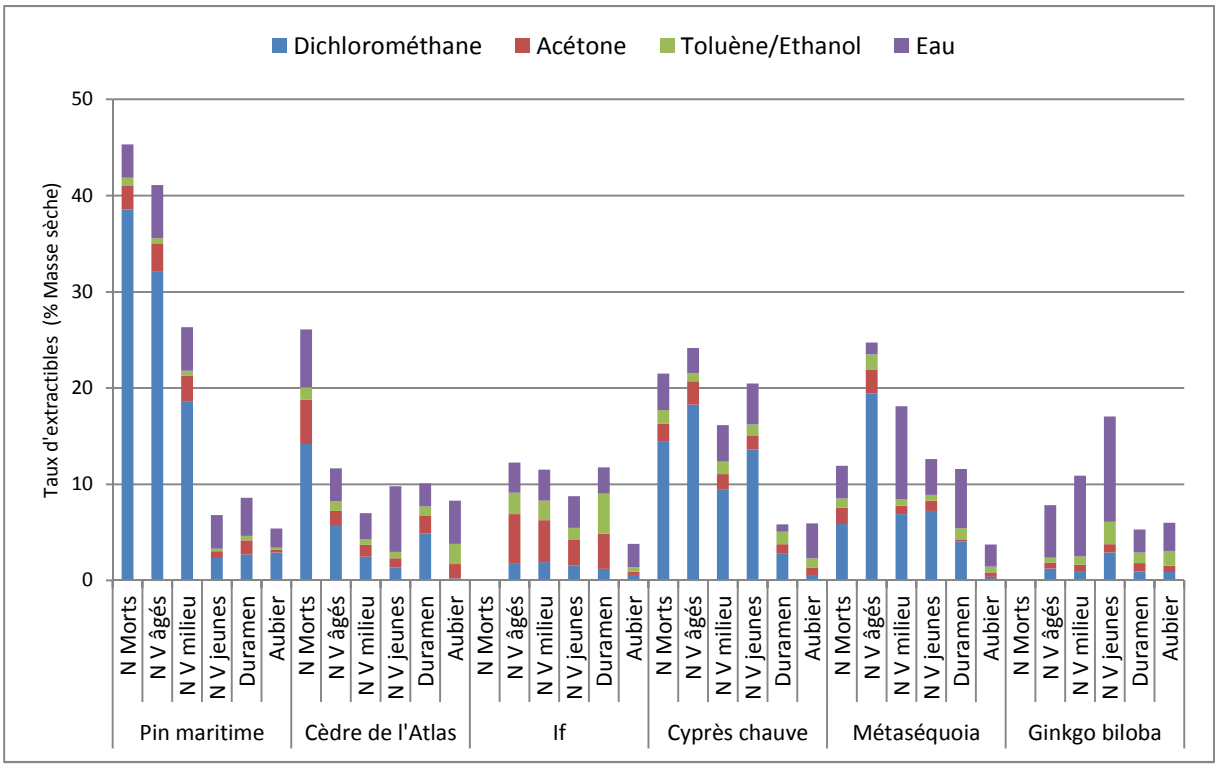


Figure 46 : Taux massiques d'extractibles dans les nœuds, le duramen et l'aubier des résineux.

Les taux d'extraits dans les nœuds s'échelonnent de 6,79 % à 45,33 % dans les nœuds jeunes et les nœuds morts du pin maritime respectivement. Les taux dans les duramens sont compris entre 5,31 % (ginkgo biloba) et 11,77 % (if). Enfin les différents aubiers échantillonnés contiennent entre 3,74 % (métasequoia) et 8,30 % (cèdre de l'Atlas). Ce nouvel échantillonnage confirme la richesse des nœuds en extractibles par rapport au duramen et à l'aubier pour une essence donnée. Mais des exceptions sont ici visibles telles que les nœuds jeunes du pin et les nœuds du milieu du tronc du cèdre.

L'échantillonnage détaillé permet de constater des variations importantes des quantités d'extractibles dans les nœuds d'un même arbre, ce qui n'était pas possible d'observer lors de la première campagne où tous les nœuds d'un même arbre ont été mélangés. Ainsi les nœuds vivants du pin, de l'if et du métasequoia ont des concentrations qui diminuent avec l'âge croissant des nœuds. Dans le cèdre et le cyprès, les nœuds âgés sont plus riches que les autres nœuds vivants. Dans le ginkgo, c'est le profil inverse qui est observé. Enfin, les nœuds morts contiennent des concentrations variables comparativement aux nœuds vivants du même arbre. Ainsi les nœuds morts du pin et du cèdre sont les plus riches en extractibles pour ces deux arbres alors que ceux du métasequoia sont les nœuds les moins concentrés de cet arbre. Ces différences peuvent être expliquées par les conditions de croissance de la branche avant sa mort. Dans le pin et le cèdre, les

branches étaient probablement suffisamment matures et ont subi une sénescence « naturelle » ; elles ont donc accumulé des quantités importantes d'extractibles dans leurs nœuds avant de mourir. Dans le cas du métasequoia, il est possible que la croissance des branches les plus basses ait été subitement arrêtée avant leur maturité (élagage artificielle, frottements et casse par le gibier, etc.).

La majorité des nœuds contient plus d'extraits au dichlorométhane excepté dans le cas du ginkgo et de l'if. Par ailleurs, les nœuds jeunes du pin maritime et du cèdre de l'Atlas puis les nœuds du milieu du tronc du métasequoia contiennent plus d'extraits aqueux que d'extraits dichlorométhane. Les différentes contributions des solvants dans les nœuds, mais aussi entre duramen et aubier du même arbre mettent en lumière des compositions en extractibles spécifiques.

3.2.1.2 Identification des extractibles au dichlorométhane dans les bois des résineux

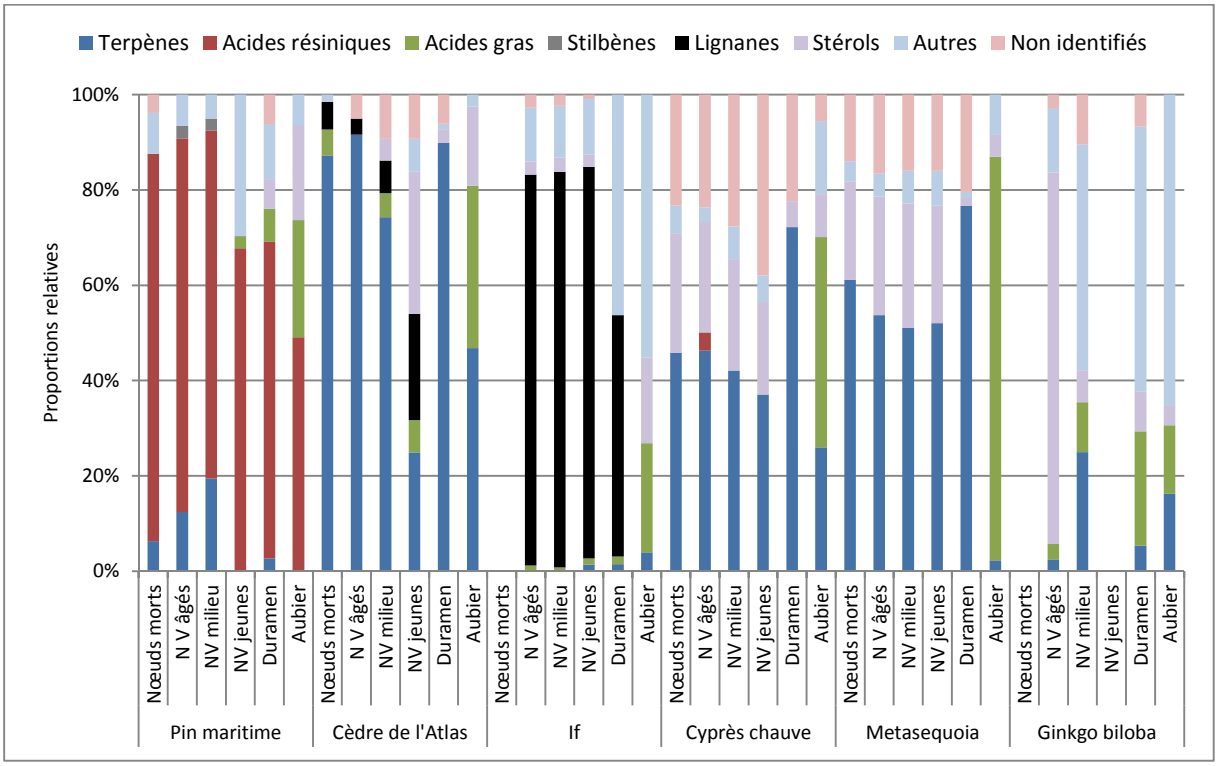


Figure 47 : Principales familles de composés extraits des résineux par le dichlorométhane et leurs proportions relatives.

La diminution ou la disparition des acides gras semblent être un indicateur de la transformation de l'aubier en duramen dans ces essences sauf dans le cas du ginkgo. Les « autres » composés identifiés dans cet arbre consistent principalement en des alcools gras et des alcanes gras. Dans l'if, les « autres » composés sont des sucres. Les acides résiniques sont détectés en grandes quantités uniquement dans les différents bois du pin maritime ainsi que dans les nœuds âgés du cyprès chauve mais en très faibles quantités. Les stérols sont présents dans des proportions équivalentes dans les nœuds de l'if (β-sitostérol); dans ceux du cyprès chauve et ceux du métasequoia (androstanediol).

Les proportions des stérols varient fortement entre les nœuds du cèdre de l'Atlas (ϒ-sitostérol) et entre les nœuds du ginkgo (β-sitostérol). Les stérols ne sont pas détectés dans les nœuds du pin. Les autres types de terpènes sont aussi variables d'une espèce à une autre. Dans les nœuds du cèdre, le bisabolol est le terpène dominant. Le cèdre ne forme pas de canaux résinifères normaux, la présence de terpènes en si grandes proportions peut être le signe d'une contrainte subie pendant la croissance de l'arbre. Dans le cyprès chauve et le métasequoia, l'épimanool domine les terpènes des nœuds alors que le sclaréol domine dans le duramen. Le sclaréol est le terpène majoritaire chez le ginkgo.

Les stilbènes se retrouvent uniquement dans le pin maritime ; même si les proportions dans les nœuds du pin maritime semblent être plus faibles que celles dans les nœuds du pin sylvestre de la première campagne. Cet arbre contient aussi des traces d'acide benzoïque. Les particularités des nœuds jeunes du pin maritime se confirment par rapport aux autres nœuds du même arbre. Les stilbènes sont absents des nœuds jeunes du pin et ceux-ci ne contiennent pas d'autres terpènes hormis les acides résiniques, mais ils possèdent des acides gras.

Les lignanes taxiresinol, isotaxiresinol secoisolaricirésinol et nortrachelogénine sont identifiés dans les nœuds et le duramen de l'if. Le taxirésinol et ses dérivés ont été identifiés dans de nombreuses espèces d'if et possèdent d'excellentes propriétés chélatrices de métaux (Donoso-Fierro et al., 2009 ;Erdtman and Tsuno, 1969). Les nœuds du cèdre ont des teneurs variables en lignanes, la nortrachelogénine étant le lignane majoritaire. Dans les nœuds du cyprès chauve et du métasequoia, les « autres » composés correspondent à l'acide caféique.

3.2.1.3 Identification des extractibles à l'acétone dans les bois des résineux

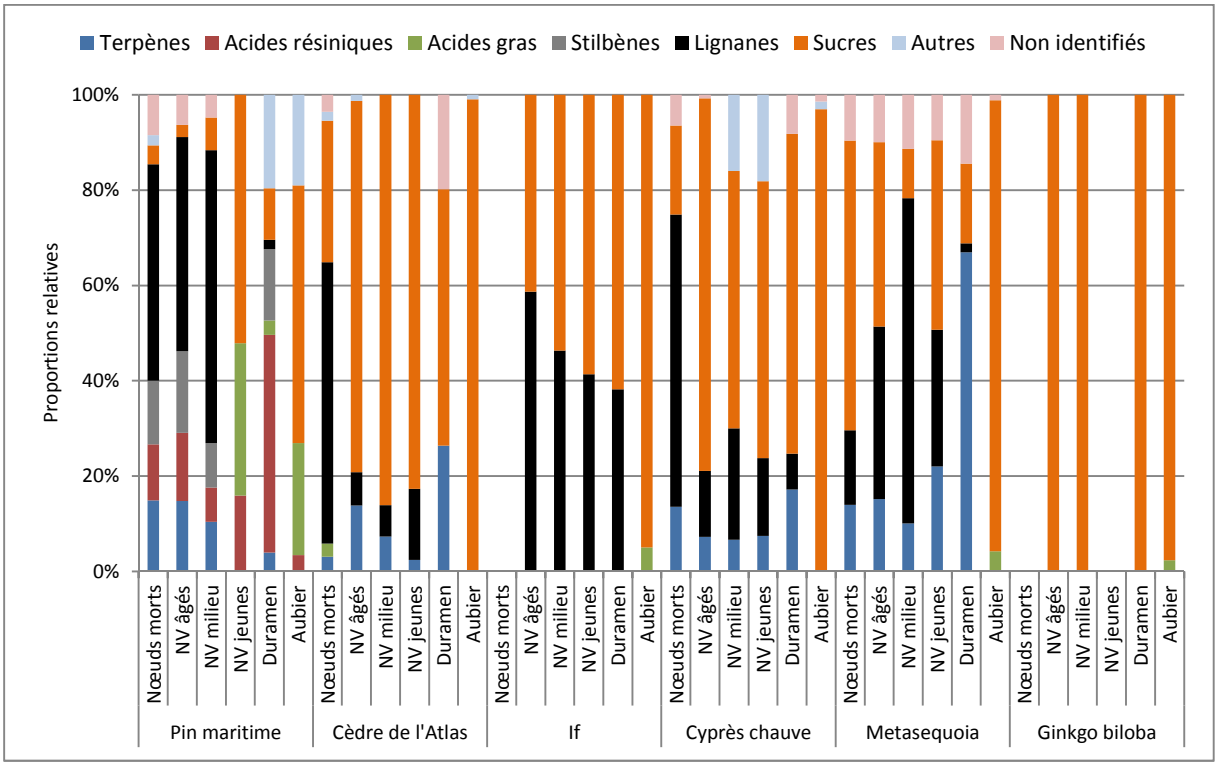


Figure 48 : Principales familles de composés extraits des résineux par l'acétone et leurs proportions relatives.

Les principaux composés extraits par l'acétone sont des sucres. Les glucides sont considérés comme des produits de réserve consommés pour la biosynthèse des extractibles lors de la duraminisation. Ceci est confirmé par les proportions de sucres qui diminuent entre l'aubier et le duramen d'un même arbre pour ces résineux. D'autre part, les nœuds jeunes du pin ont une composition chimique similaire à celle de l'aubier, ce qui laisse suggérer que la duraminisation de ces jeunes nœuds situés en haut de l'arbre n'a pas encore eu lieu. Ceci est corroboré par les résultats de duraminisation des branches du pin sylvestre mis en évidence par Mäkelä et al., (2001). Les mêmes conclusions peuvent être établies pour le métasequoia et, dans une moindre mesure, pour l'if. Pour les autres arbres, il est possible que leur petite taille (la hauteur moyenne est de 7,1 ± 1,4 m) n'ait pas permis d'échantillonner des nœuds suffisamment éloignées les uns par rapport aux autres, et donc de distinguer des différences chimiques nettes.

Les lignanes sont les composés majoritaires dans les nœuds du pin maritime, puis les terpènes et les stilbènes. C'est aussi ce qui est observé avec les nœuds morts du cèdre de l'Atlas. La nortrachelogénine demeure le lignane dominant dans les nœuds du cèdre et les lignanes de l'if sont les mêmes que ceux identifiés avec le dichlorométhane : le taxirésinol, l'isotaxirésinol et le secoisolaricirésinol (Figure 49). Des traces de lignanes ont été détectées dans les nœuds du ginkgo. Dans les nœuds et le duramen du cyprès et du métasequoia, c'est l'agatharésinol qui a été identifié

(Figure 49). Il s'agit d'un norlignane identifié dans le cyprès du Japon (Imai et al., 2005). Les nœuds morts du cyprès et les nœuds du milieu du métasequoia sont les plus riches en ce composé. Enfin de la catéchine a été détectée dans l'aubier du cyprès ainsi que des structures phénoliques dans les nœuds vivants jeunes et du milieu (dans « autres »). La catéchine a aussi été identifiée dans l'aubier du cèdre du Japon qui appartient à la même famille que le cyprès chauve : les Taxodiaceae (Ohashi and Imai, 1990). Les auteurs ont postulé que la catéchine dans ce cas n'est pas synthétisée comme extractible ordinaire du duramen mais comme produit de défense.

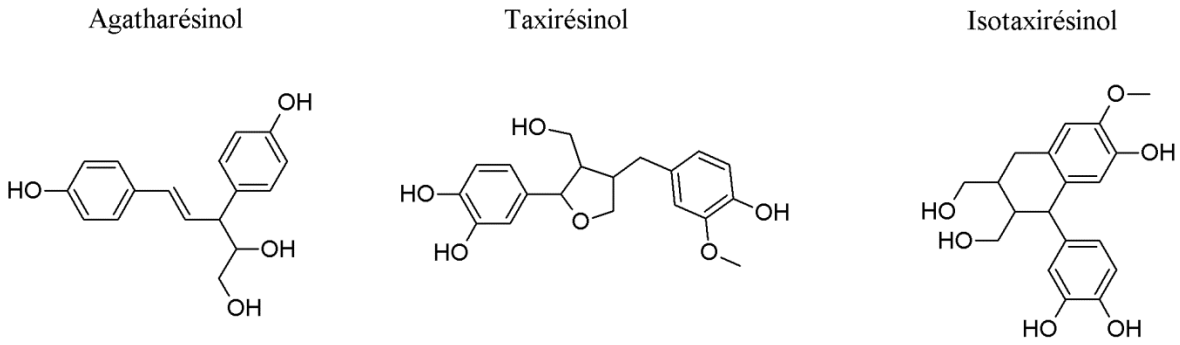


Figure 49 : Norlignane et lignanes détectés dans les résineux.

3.2.2 Cas des feuillus

3.2.2.1 Taux massiques d'extractibles dans les bois

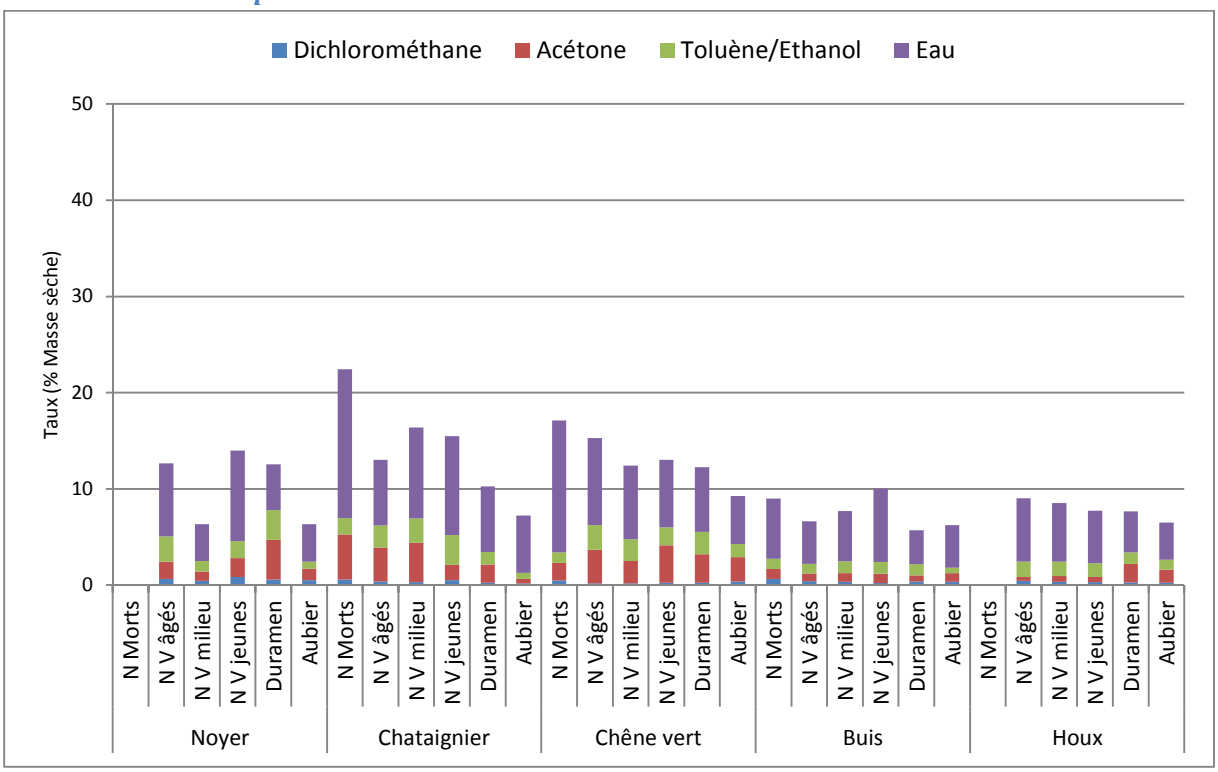


Figure 50 : Taux massiques d'extractibles dans les nœuds, le duramen et l'aubier des essences feuillues.

Les taux d'extraits dans les nœuds s'échelonnent de 6,34 % à 22,44 % dans les nœuds de milieu du tronc du noyer et les nœuds morts du châtaignier respectivement. Les taux dans les duramens sont compris entre 5,72 % (buis) et 12,54 % (noyer). Enfin les différents aubiers échantillonnés contiennent entre 6,24 % (buis) et 9,26 % (chêne vert). Dans tous les échantillons, l'eau est le solvant qui a extrait le plus de composés sauf dans le duramen du noyer. Les extraits au dichlorométhane sont extrêmement faibles. De manière générale, les quantités d'extractibles de ces feuillus sont plus faibles que celles des résineux précédents. De plus les différences entres les nœuds d'une part et les duramens et aubiers d'autre part sont moins nettes.

3.2.2.2 Identification des extractibles au dichlorométhane dans les bois des feuillus

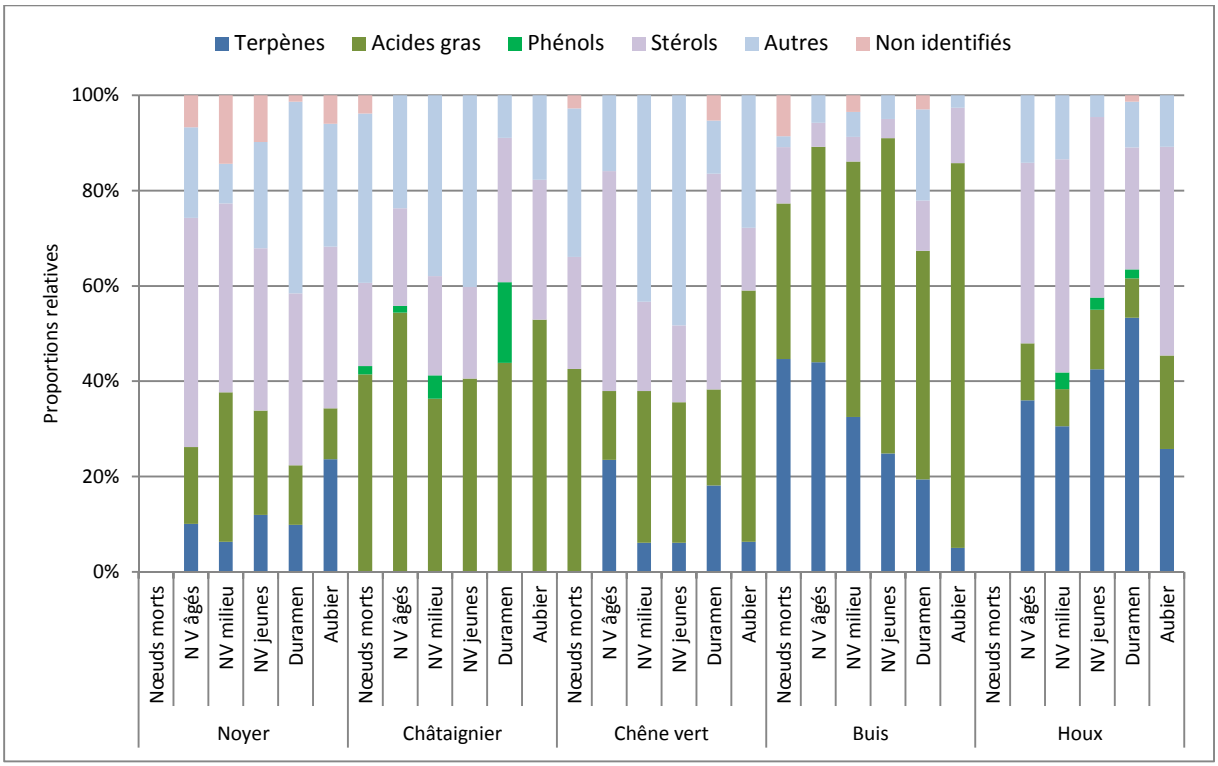


Figure 51 : Principales familles de composés extraits des feuillus par le dichlorométhane et leurs proportions relatives.

Les acides gras et les stérols sont systématiquement présents dans ces échantillons de feuillus. Le β sitostérol est quasiment le seul stérol identifié. Les terpènes sont présents dans tous les échantillons hormis ceux du châtaignier et les nœuds morts du chêne vert. Toutefois, les terpènes majoritaires dans les nœuds et le duramen d'un même arbre sont différents. Les terpènes des nœuds du noyer sont l'épimanool et le bisabolol. Le duramen du noyer contient de l'amyrine. Ce triterpènes domine les terpènes dans les nœuds du chêne vert alors que son duramen contient un dérivé de lupéol, un autre triterpène. Les nœuds et le duramen du buis se distinguent par la présence de bétulol et de lupéol respectivement. Enfin, l'amyrine différencie les nœuds et le duramen du houx. Le phénol

détecté dans le châtaignier semble être un dérivé vanillique et celui observé dans le houx est le syringaldéhyde. Les autres familles regroupent des corps gras (alcools et alcanes) et des sucres.

3.2.2.3 Identification des extractibles à l'acétone dans les bois des feuillus

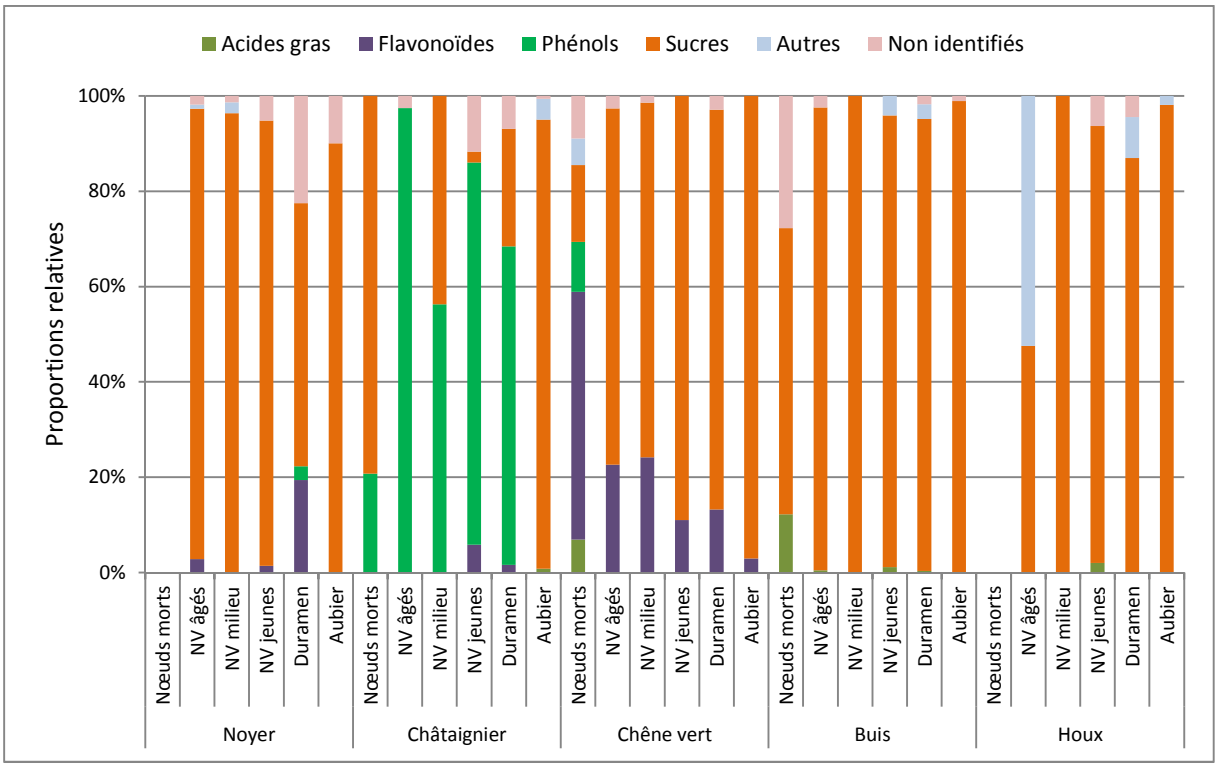


Figure 52 : Principales familles de composés extraits des feuillus par l'acétone et leurs proportions relatives.

Les sucres sont une nouvelle fois les composés majoritaires dans les extraits acétoniques surtout dans le houx et le buis. Les « autres » composés regroupent des corps gras sauf dans l'aubier du châtaignier et les nœuds âgés du houx où ils regroupent des stérols. L'acide gallique est le phénol présent dans les échantillons du châtaignier, les nœuds morts du chêne vert et le duramen du noyer. Burtin et al., (1998, 2000) ont repéré l'acide gallique dans le duramen du noyer ayant subi un traitement à la vapeur et non dans le duramen « frais ». D'autre part, la présence de l'acide gallique dans les chênes, mais aussi dans le châtaignier n'est pas justifiée par la nature de leurs tanins hydrolysables (déjà évoqué pour le chêne pédonculé). Toutefois, Pash and Pizzi (2002) ont démontré que la vescalagine et la castalagine, deux éllagitannins du châtaignier, sont produits à partir de la dégradation de chaines pentagalloylglucoses durant l'extraction. Enfin, la détection de l'acide gallique dans les nœuds morts du chêne vert et non pas dans ses nœuds vivants et son duramen peut être le résultat d'une infection par un pathogène qui a procédé à une dégradation enzymatique comme cela a été rapporté dans *Quercus crispula* (Imai et al., 2009a ; 2013).

La quercétine est le flavonoïde identifié dans les nœuds jeunes et le duramen du châtaignier. La quercétine n'a pas été précédemment identifiée dans le châtaignier (Canas et al., 1999, 2000 ; Fernández de Simón et al., 2009), mais la quercétine-3-glucoside a été identifiée dans le bois séché (Cerezo et al., 2014). La catéchine est le flavonoïde identifié dans le noyer et le chêne vert. La littérature ne rapporte pas la présence de catéchine dans le noyer mais celle de la quercitrine (quercétine-3-rhamnoside) et de l'hydrojuglone glycoside (HJG) et deux dérivés éllagiques (Burtin et al., 1998). Le noyer échantillonné dans cette campagne (*Juglans regia* L.) possède trois molécules aromatiques non identifiées dans ses nœuds, son duramen et son aubier qui pourraient être celles rapportées par la littérature.

La catéchine n'a pas été identifiée dans les chênes ou bien en traces chez certains (Cadahia et al., 2001 ; Cerezo et al. 2014 ; DaSilva et al. 2009 ; Fernández de Simón et al., 2006, 2009 ; Ockels et al., 2007). Il est possible que la catéchine du chêne vert soit synthétisée par le bois en réponse au stress hydrique particulièrement sévère dans le sud de la France (cet arbre a été abattu près d'Aix en Provence), ou alors elle a été libérée après la dégradation de tanins condensés. Enfin, la présence de la catéchine peut signifier une réaction de défense de la part de l'arbre. Le chêne vert et le chêne pédonculé ont une composition chimique très différente. Aucun flavonoïde n'a été identifié dans le pédonculé, et l'acide gallique est absent ou minoritaire dans le chêne vert.

Article 2: Knotwoods of different wood species as potential sources of valuable natural phenolic compounds.

Les résultats obtenus pour les nœuds et le duramen de ces onze essences sont en cours de préparation pour les soumettre à Industrial Crops and products. L'article est présenté en Annexe A.

3.3 Effet de la variabilité interspécifique sur la toxicité des extractibles vis-à-vis de *Trametes versicolor*

Les champignons peuvent dégrader le bois avec des enzymes extracellulaires et intracellulaires. Les premières servent à dégrader les principaux polymères du bois alors que les secondes servent à détoxiquer les molécules libérées par l'activité des enzymes extracellulaires et potentiellement dangereuses pour le champignon. Lorsque des molécules toxiques telles que les phénols pénètrent les cellules du champignon, celui-ci les prend en charge et les modifie pour pouvoir les éliminer. Ces étapes constituent la fonction de détoxication. Les gluthathion-transférases (GST) sont des enzymes qui participent à la conjugaison du composé par l'ajout d'un glutathion pour le rendre plus hydrophile. Dans le cadre de ce travail de thèse, quatre-vingt-seize extraits issus des nœuds, du duramen et de l'aubier de feuillus et de résineux ont été testés pour leur interaction avec les GST de *Trametes versicolor*. Ce dernier est un champignon de dégradation du bois très répandu, particulièrement chez les feuillus. Les résultats préliminaires ont montré que ces enzymes ont peu

réagi avec les extraits des résineux excepté ceux du mélèze. Par la suite, les tests supplémentaires ont été réalisés avec les extraits des feuillus et ceux du mélèze. Les résultats ont été publiés dans un article paru chez PloSONE et reproduit avec l'autorisation de la revue.

Article 3: The GSTome reflects the chemical environment of white-rot fungi

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

The GSTome Reflects the Chemical Environment of White-Rot Fungi

Aurélie Deroy[1,2], Fanny Saiag[1,2], Zineb Kebbi-Benkeder[3,4,5], Nassim Touahri[3,4,5], Arnaud Hecker[1,2], Mélanie Morel-Rouhier[1,2], Francis Colin[4,5], Stephane Dumarcay[3], Philippe Gérardin[3], Eric Gelhaye[1,2]*

1 Université de Lorraine, Interactions Arbres—Microorganismes, UMR1136, F-54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **2** INRA, Interactions Arbres—Microorganismes, UMR1136, F-54280, Champenoux, France, **3** Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, EA4370 Université de Lorraine USC INRA, Faculté des Sciences et Technologies, 54506, Vandoeuvre-les-Nancy, France, **4** AgroParisTech, UMR 1092 LERFOB, F-54000, Nancy, France, **5** INRA, UMR 1092 LERFOB, F-54280, Champenoux, France

* eric.gelhaye@univ-lorraine.fr

CrossMark

OPEN ACCESS

Citation: Deroy A, Saiag F, Kebbi-Benkeder Z, Touahri N, Hecker A, Morel-Rouhier M, et al. (2015) The GSTome Reflects the Chemical Environment of White-Rot Fungi. PLoS ONE 10(10): e0137083. doi:10.1371/journal.pone.0137083

Editor: Kristiina Hildén, University Of Helsinki, FINLAND

Received: April 23, 2015

Accepted: August 13, 2015

Published: October 1, 2015

Copyright: © 2015 Deroy et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). The PhD grant of AD was funded by ANR-11-LABX-0002-01. The authors gratefully acknowledge the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (CJS contract n°. 12-00006889).

Abstract

White-rot fungi possess the unique ability to degrade and mineralize all the different components of wood. In other respects, wood durability, among other factors, is due to the presence of extractives that are potential antimicrobial molecules. To cope with these molecules, wood decay fungi have developed a complex detoxification network including glutathione transferases (GST). The interactions between GSTs from two white-rot fungi, *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*, and an environmental library of wood extracts have been studied. The results demonstrate that the specificity of these interactions is closely related to the chemical composition of the extracts in accordance with the tree species and their localization inside the wood (sapwood vs heartwood vs knotwood). These data suggest that the fungal GSTome could reflect the chemical environment encountered by these fungi during wood degradation and could be a way to study their adaptation to their way of life.

Introduction

Specialized fungi are the major actors of wood microbial degradation in forest ecosystems. Among them, the white-rot fungi are the only known organisms able to mineralize all the different components of this recalcitrant substrate. This unique ability is due to the development of complex enzymatic and non-enzymatic extracellular systems allowing oxidative and hydrolytic degradation of the different wood components [1, 2, 3]. This way of life requires also large intracellular networks involved in detoxification/catabolism processes. The extracellular oxidative degradation generates indeed a myriad of potentially toxic compounds that the fungus has to deal with. Furthermore, these fungi have also to cope with specific components of wood, called wood extractives, which are part of the tree defense system [4].

The wood decaying fungi possess also extended intracellular detoxification systems [5]. This intracellular system is composed in particular of a large number of glutathione transferases (GSTs), enzymes involved in the second phase of the detoxification processes. These enzymes

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

allow both an increase of the solubility and a decrease of the chemical reactivity of potential toxic molecules. The number of genes encoding GSTs, is usually largely superior in wood-decayer genomes in comparison with other fungi [6]. This high number of GSTs is mainly due to the extension of specific phylogenetically based classes named Ure2p, GST Omega (GSTO) and GSTFuA [7, 8].

These classes have been differentiated from a phylogenetic point of view but their specific function remain to be elucidate. Furthermore, the classes responsible for the observed extension of GST encoding genes differ from one fungus to another. For instance, in *Trametes versicolor*, nearly half of the total GSTs belong to the GSTO class (16/38), whereas in *Phanerochaete chrysosporium*, one third belongs to the Ure2p class (9/27) [6].

To date, each characterized fungal phylogenetic class exhibits particular structural features [9–11]. Phylogenetically, the Ure2p class could be split into two subclasses, named Ure2pA and Ure2pB. The Ure2pA subclass is fungal specific and is found extended in various wood decaying fungi. Members of the Ure2p class characterized so far possess the ability to bind oxidized glutathione [8]. Few studies have been devoted to fungal GST related to the omega class. Among this class, members possess either a cysteinyl or a serinyl residue in their catalytic site. The proteins harboring a cysteinyl residue exhibit a deglutathionylation activity whereas the presence of a serinyl residue seems to be associated with a glutathione transferase activity of the corresponding proteins [11, 12].

From these studies devoted to GSTs from wood-decaying fungi, it appears that the different GSTs characterized so far share usually a low specificity whatever their class and organism origin. They display indeed usually the same kind of catalytic (glutathione transferase, thiol transferase, peroxidase, esterase. . .) and ligandin (*i.e.* ability to bind ligands) activities against more or less artificial substrates/ligands [7, 12].

From our previous data on fungal GSTs, we hypothesize that the study of the GST network found in white-rot fungi could give insights on their adaptation to different wood species, and could reflect at least partly the chemical environment encountered by these fungi during wood degradation [6, 7]. To test this hypothesis, we investigated the biochemical interactions of 6 GSTOs from *Trametes versicolor* and 5 Ure2ps from *Phanerochaete chrysosporium* with an environmental collection of wood extracts [13]. These both GST classes (i.e. GSTO and Ure2p) are the most extended in the studied fungi [6]. The obtained data demonstrate a close relationship between these interactions and the chemical composition of the tested extractives.

Materials and Methods

Expression and purification of proteins

Among the 16 GSTO genes found in the genome of *Trametes versicolor*, 8 have been selected in the most extended subclass III [12], all of them exhibiting a serinyl residue in their putative catalytic site (accession number in the JGI database: TvGSTO-1S: Tv75639; TvGSTO-2S: Tv56280; TvGSTO-3S: Tv48691; TvGSTO-4S: Tv65402; TvGSTO-5S: Tv54358 and TvGSTO-6S: Tv23671). Recombinant plasmids were obtained by synthetic gene synthesis, cloning into the NdeI and NotI restriction site of pet 26b plasmid. The sequences have been designed to add a C-term His-tag for purification (S1 Table). Expression was performed at 37°C using the transformed *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) pLysS strain (Novagen) in LB medium containing kanamycin (50 μg·ml−1) and chloramphenicol (34 μg·ml−1). When the cell culture reached an optical density at 600 nm of 0.7, protein expression was induced with 0.1 mM IPTG and cells were grown for a further 4 h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in a 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 200 mM NaCl lysis buffer and stored at −20°C. Cell lysis was completed by sonication (three times for 1 min with intervals of 1 min). The cell extract was then

centrifuged at 35000 *g* for 25 min at 4°C to remove cellular debris and aggregated proteins. 10 mM imidazole was added in the soluble fraction before loading on to an Ni-NTA (Ni^{2+}-nitrilotriacetate)–agarose resin connected to an ÄKTA purifier FPLC system (GE Healthcare). After a washing step with lysis buffer supplemented with 20 mM imidazole, the proteins were eluted using an imidazole gradient from 20 to 500 mM. The fractions of interest were pooled, dialysed, concentrated by ultrafiltration under nitrogen pressure (YM10 membrane, Amicon), and stored in 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 200 mM NaCl buffer at –20°C.

The homogeneity of the proteins was checked by SDS/PAGE. Protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm and using theoretical molar absorption coefficients of 38390 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$, 29972 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$, 35410 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$, 46410 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$, 42462,5 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$, 26930 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ deduced from the primary sequences of TvGSTO-1S, TvGSTO-2S, TvGSTO-3S, TvGSTO-4S, TvGSTO-5S, TvGSTO-6S respectively.

Concerning Ure2p from *Phanerochaete chrysosporium*, five proteins, one belonging to the subclass B named PcUre2pB1 and four to the subclass A named PcUre2pA4, PcUre2pA5, PcUre2pA6 and PcUre2pA8 have been studied. The production and the partial characterization of these proteins have been previously described [8].

Wood extracts

For competition assays 60 extractives were obtained from knotwood and stemwood of different tree species. Norway spruce [*Picea abies* (L.)], European larch [*Larix decidua Mill*], cherry [*Prunus avium L.*] and beech [*Fagus sylvatica L.*] were sampled in the Amance forest near Nancy (northeast France) in winter 2012–2013. Walnut [*Juglans regia L.*], cedar [*Cedrus atlantica Manetti*], metasequoia [*Metasequoïa glyptostroboides*] were harvested in a private nursery in Laneuvelotte and chestnut [*Castanea sativa Miller*] was felled in Saverne forest (both in northeast France). Evergreen oak [*Quercus ilex L.*] was harvested near Aix-en-Provence (southeast France) and maritime pine [*Pinus pinaster Aiton*] was sampled in INRA domain near Orléans (northwest France). These trees were felled during winter 2013–2014. Trees come from the National Forest Service ONF and AgroParisTech, private nursery Adam et Fils (48° 43'30.15"N 6°17'20.12"E), M. Lopez from IRSTEA Aix-en-Provence and INRA Orléans. We confirm that the field studies did not involve endangered or protected species.

On every trunk, a disc was sawn at a height of 1.3 m; inner and outer parts were sampled to isolate heartwood and sapwood, respectively. Several discs were sawn above the previous one containing either dead or living knots, which were recovered using a wood chisel. All samples were dried at 50°C until mass stabilization. For some species, when knots amounts were too small, dead and living knots were mixed all together while for the other cases, they remained separated. Heartwood, sapwood and knots samples were then ground to fine sawdust with particle size between 0.2 to 0.4mm before extraction. Each powder was Soxhlet-extracted using acetone. A defatting step with methylene chloride was performed before the acetone extraction [14], except for the extracts named global in the Table 1. After each extraction organic solvents were evaporated under vacuum using a rotary evaporator. Dried extractives were stored in a freezer before GC-MS analyses.

Chemical characterization of the wood extracts

Gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC–MS) allowed the identification and the relative quantification of the different substances present in the wood extracts (Table 1). Samples were analyzed as trimethylsilyl derivatives using the following procedure. In a screw-capped vial, a sample of about 1mg of dry extract was dissolved in 100μL of BSTFA/TMCS 1%. The solution was vortex-stirred for about 1 min and heated at 70°C for 20hrs. After

Table 1. Main compounds and relative composition of stemwood and knotwood acetone extracts.

	Fatty Acids	Gallic Acids	Resin Acids	Sugars	Others	Unidentified Flavonoids	Catechin	Taxifolin	Sakuranin	Naringenin	Dihydrochrysin	Others Lignans	Secoisolariciresinol	Matairesinol	Unidentified
Beech heartwood	6.3														93.7
Beech sapwood	29.9				16.9										53.2
Beech mixed knots[b]				73.4	0.7		2.0								23.9
Beech mixed knots[b] global[a]	11.2			65.3	5.2										20.3
Cherry heartwood					4.9	18.8			24.3		29				23.0
Cherry heartwood global[a]			2.7	1.8	4.0	22.7	2.9		12.5	40.7					12.7
Cherry sapwood	5.7		8.5			12.1	51.8								21.9
Cherry mixed knots[b]				8.3		26.6	47.5								17.6
Cherry mixed knots[b] global[a]				6.6	0.2	30.7	33.6								28.9
Chestnut heartwood		60.5		24.7	6.4	1.6									6.8
Chestnut sapwood	0.8			94.3	4.3										0.6
Chestnut dead knots		20.8		79.2											
Chestnut living knots		56.3		43.7											
Elcak heartwood				83.9			13.2								2.9
Elcak sapwood				97.1			2.9								
Elcak dead knots	6.9	10.5		76.1	5.6		62								8.9
Elcak living knots				74.4			24.2								1.4
Larch heartwood					4.5	37.6									57.9
Larch heartwood global[a]	1.3		15.5	5.3	1.2	60.9									15.8
Larch sapwood	14.4		59.3		6.6										19.7
Larch mixed knots[b]				4.0	1.2	4.2		45.3				14	22.5		8.8
Larch mixed knots[b] global[a]			7.7					38				5.4	30.3	11	7.6
Walnut heartwood		2.9		55.2	22.5		19.4								
Walnut sapwood				90.1	9.9										
Walnut living knots				96.4	2.3										1.3

[a] Global means.

[b] Mixed knots means that living and dead knots were mixed when ground and extracted

doi:10.1371/journal.pone.0137083.t001

evaporation of the silylating reagent, the residue was diluted in 1 mL of ethyl acetate. The GC–MS analysis was performed on a Clarus 600 GC gas chromatograph coupled to a SQ8 mass spectrometer (Perkin-Elmer). Separation was carried out on a 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane fused-silica capillary column (J&W Scientific DB-5MS, 30m×0.25mm×0.25μm). The injection was performed at 250°C in the splitless mode with Helium as carrier gas, at a constant flow of 1mL.min^{-1}. Chromatographic conditions were as follows: initial temperature 80°C, 2min isothermal, 10°C.min^{-1} to 190°C, 15°C.min^{-1} to 280°C, 10min isothermal, 10°C.min^{-1} to 300°C, 14min isothermal. The components ionization was performed by electron impact (70eV ionization energy) to achieve their identification by mass spectra comparison with the NIST Library. Samples relative composition in extractives was obtained by the area of each peak determined on the TIC (Total Ion Current) chromatogram divided by the sum of all the detected peaks areas.

Fluorescence-based thermal stability assay

This assay was adapted from Boivin et al (2013), allowing following protein denaturation [15]. Thermal denaturation exposes hydrophobic region of proteins, which could interfere with the SYPRO orange dye, this latter being fluorescent in hydrophobic environment. The experimental procedure was performed in 96 well microplate (Harshell, Biorad) and the measurements were carried out with real time PCR detection system (CFX 96 touch, Biorad). The assays were achieved as follow: 5μL of Tris-HCl (150mM) pH8 buffer, 2μL of substrate (wood extract at an initial concentration of 10 mg/ml in DMSO), 2μL of proteins for a final concentration of 40μM, 2μL of SYPRO orange (Sigma) previously diluted 62 fold and 14μL of ultra pure water for a total volume of 25μL per well. The plate was centrifuged 30 seconds at 4000g. The fluorescence was measured (at excitation at 485nm and emission at 530nm) each minute starting with 3 minutes at 5°C and increasing temperature from 5° to 95°C with a step of 1°C per minute. The melting temperature (Tm), which corresponds to the temperature where the protein is 50% unfolded, was determined using the first derivative of the obtained data in presence/absence of potential ligands [15]. Wood extracts (stock solutions at 10 mg/ml in DMSO) have been used at a final concentration of 1mg/mL. Differences in melting temperatures (ΔTm) could also be calculated and normalized (see below).

Competition experiments (CE)

The competition experiments were based on esterase activity displayed by the studied fungal GSTs. 5 chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) was used as fluorogenic substrate. These assays were performed on 96 wells microplates and measurements were carried out with Victor3 microplate reader (Wallac Parkin Elmer Life Sciences) at 535nm for emission and 485nm for excitation. A solution was prepared with 21mL of TE 30mM (30mM TrisHCl pH8, 0.1mM EDTA), 10.5mL of CMFDA at 100μM, 210μL of GSH 100mM and 210μL of protein. The protein concentration varied from one protein to another in order to obtain a constant rate during duration of the test. The assays were performed as follow: 199μL of the prepared solution was distributed in each well and a first measurement was carried out during 10 minutes which 1 measure per minute. Immediately after, 1μL of wood extract (stock solutions at 10 mg/ml in DMSO) was added in each well and the measurements were taken again during 60 minutes which 1 measure per minute. The linear increases of fluorescence were used for further analysis (see below).

Glutathionylation assays

The glutathione transferase acitivity was measured following the glutathionylation of CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) as described by Lallement et al (2014) [16].

Principal component analysis. For each protein, thermal shift experiments allowed the determination of melting temperatures (Tm) in presence of the different wood extracts. As reference, similar experiments were conducted adding only DMSO allowing the determination of Tm_{ref}. The principal component analysis was performed on the normalized values T calculated as follow: $T = (Tm - Tm_{ref})/ Tm_{ref}$.

Concerning the competition experiments performed using the CMFDA test; data used in the principal component analysis were calculated as follow. The slope (S) (linear increase of fluorescence determined during the first 10 min after addition of the product) was calculated, the value obtained only in presence of DMSO being the reference (Sr). The principal component analysis was performed using the normalized value I with I = (S/Sr).

Principal component analysis was implemented using the xlstat software (Pearson correlation). A matrix of the T and I values determined as described above for the different studied proteins were used as input (S2 Table)

Results and Discussion

Interactions between GSTs and wood extracts

To test our hypothesis that fungal GST network could give insights on the adaptation of white rot fungi to different wood species, we used GSTs belonging to expanded classes (omega and ure2p) in two different white-rot fungi, *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*.

Genome mining of the sequenced *Trametes versicolor* has revealed the presence of 16 genes encoding putative GST Omega (GSTOs) [6]. Six TvGSTOs exhibiting a serinyl residue in their catalytic site were selected from the most extended subclass III [12] for this study. The glutathione transferase activity of the purified proteins (S1 Fig) has been tested using CDNB as substrate. All proteins exhibit an activity against CDNB, even if this activity remains low for different isoforms (kcat of 6 and 51 min^{-1} for TvGSTO-2 and TvGSTO-5S respectively). The kinetic parameters are reported in the S3 Table. These data are in agreement with previous results obtained on *Phanerochaete chrysosporium* isoforms showing that GSTO harboring a serinyl residue in their catalytic site exhibit a classical glutathione transferase activity [11, 12].

Concerning PcUre2ps, we used previously characterized Ure2ps from *Phanerochaete chrysosporium*, four isoforms belonging to the Ure2pA subclass (PcUre2pA4, 5, 6 and 8), and the unique member of the Ure2pB subclass in this fungus [8, 9]. In both cases, GSTO and Ure2p, these proteins belong to the most extended GST class in *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* respectively.

Fungal GSTs as GSTs from other organisms are known to display both catalytic activities and ligandin activities (ability to bind/interact with ligands) [17]. Depending of the considered fungal isoforms, the site involved in the ligandin activity (site L) could be related to the glutathione binding site (site G), to the hydrophobic site involved in the substrate binding (site H) or to be completely independent of the G and H sites [10, 18, 19]. In this context, the investigation of the interactions between GST and chemical libraries is required to study both catalytic and ligandin activities.

To investigate the potential ligandin activities of the tested GSTs, we used a fluorescence-based thermal stability (FTS) approach with SYPRO Orange as fluorophore [20, 15]. This method is widely used to identify ligands of proteins [21, 22]. The influence on the catalytic activities could not be measured using the classical CDNB test, since the resulting glutathionylated product of the reaction is followed at 280 nm, limiting the screening of aromatic molecules. An alternative fluorogenic substrate (CMFDA) was then tested. This substrate is currently used to test the esterase activity of glutathione transferases [12]. The different studied

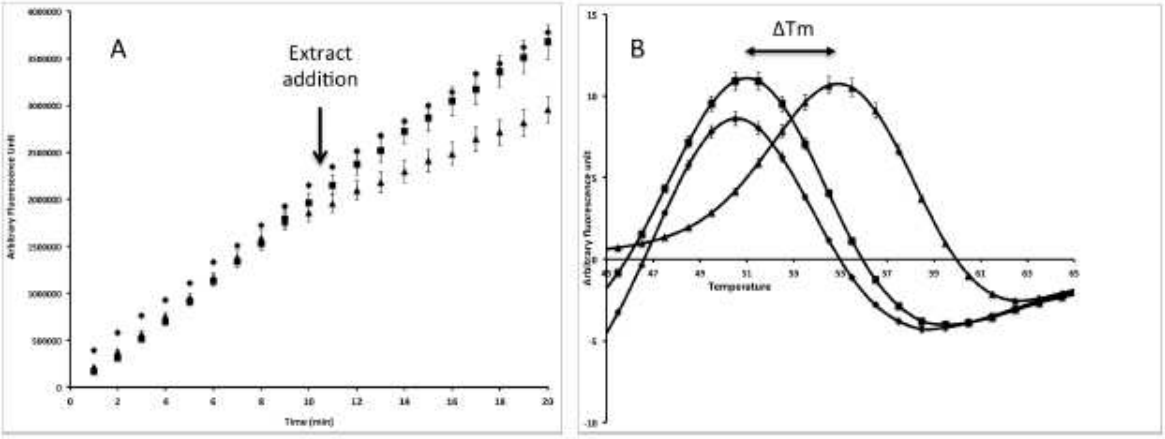


Fig 1. Effects of larch acetonic extracts on the catalytic activity (A) and thermal stability (B) of TvGSTO-1S. The catalytic activity was monitored following the cleavage of CMFDA by fluorescence as described in materials and methods section. DMSO or the tested extracts have been added after 10 min. For the thermal stability, the first derivatives of the raw data are shown allowing to determinate the Tm. diamond: DMSO (control); square: larch sapwood; triangle: larch heartwood

doi:10.1371/journal.pone.0137083.g001

enzymes (the 6 TvGSTO and the 5 PcUre2p) exhibit all an activity in presence of glutathione against this substrate allowing its use for further screening experiments.

FTS and competition experiments using CMFDA were then combined to study the interactions between the studied GSTs and an environmental library composed of 60 different wood extracts. This library contained acetone and dichloromethane extracts of sapwood, heartwood and knotwood from different hardwood and softwood species (S4 Table). A shift on the protein melting temperature (Tm) revealed an interaction the tested product and the protein, whereas an inhibition of the CMFDA transformation revealed an interaction between the tested product and either the G site, or the H site or both. As an example, the effects of acetonic extracts from larch heartwood and sapwood on TvGSTO1-S catalytic and ligandin activities are shown in Fig 1. The heartwood extract induced both an inhibition of the catalytic activity (Fig 1A) and a shift of the measured Tm (Fig 1B), whereas no effects were observed in presence of sapwood extracts in comparison with the control (only DMSO).

A principal components analysis (PCA) was implemented using the normalized obtained data from FTS and CE experiments as input (The used matrix is shown in S2 Table). The tested proteins were found widespread in the obtained biplot (PC1 and PC2 accounted of 56.59% of the total variance) without a clear clustering (Fig 2). Both approaches (FTS and CE) group some proteins as TvGSTO2S, TvGSTO4S or PcUre2pA8. In contrast, both methods gave different results for others such as PcUre2pB1 and TvGSTO6S for instance, suggesting that in this case ligandin (L site) and catalytic domains (G and/or H sites) are clearly different. These data confirm that FTS and CE approaches are complementary and their combination could be a way to investigate the relationship between the diversity of fungal GSTs and the variability of wood extracts.

TvGSTOs and hardwood acetone extracts

Whereas the ecology of *P. chrysosporium* remains unclear, *T. versicolor* is a widespread fungus known as a prime wood decomposer of hardwood in temperate forests. The interactions

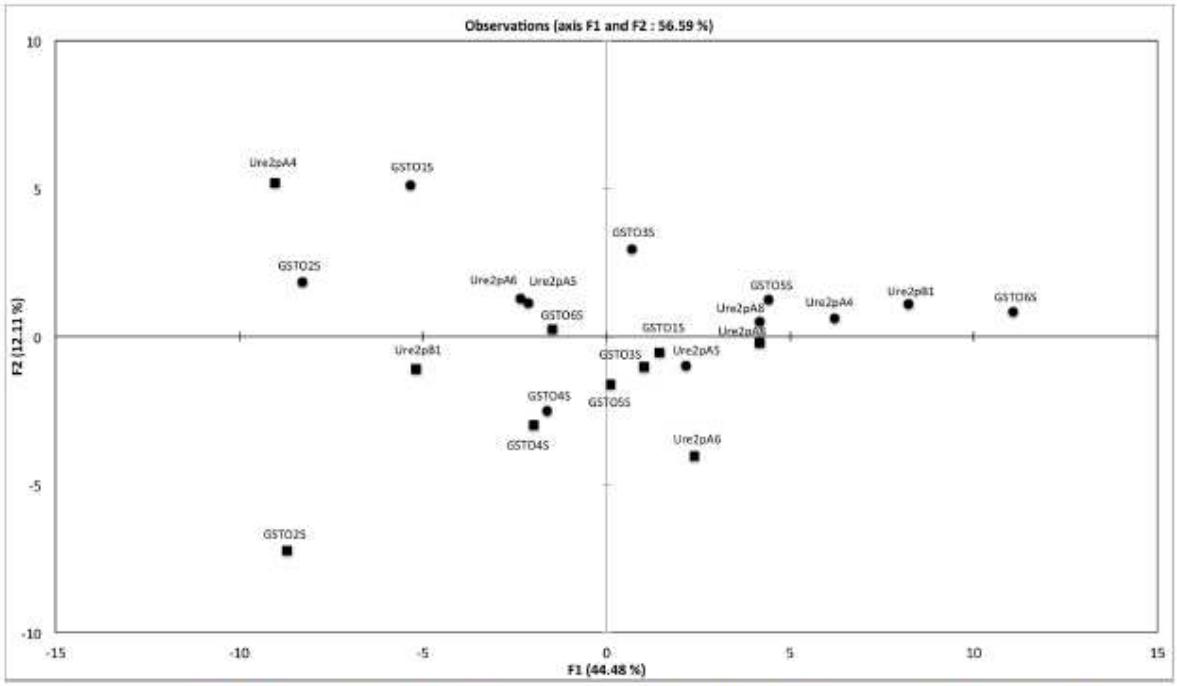


Fig 2. Principal component analysis plot showing the distribution of six GST Omega (GSTO) from *Trametes versicolor* and five Ure2p from *Phanerochaete chrysosporium*. A matrix based on the interactions, measured using the fluorescence-based thermal stability assay (squares) and the competition experiments (circle), between 60 wood extracts and these tested GSTs was used as input.

doi:10.1371/journal.pone.0137083.g002

between the six studied TvGSTOs and acetone extracts from several hardwoods and larch have also been specifically analyzed. Larch extracts have been integrated in this study since this softwood exhibits an extract composition similar to that one found in hardwoods [13]. The relative chemical composition of these extracts was determined using GC-MS analysis (Table 1). They contain different main classes of molecules as sugars, terpenes, lignans or flavonoids and also a more or less important uncharacterized fraction. PCA has been implemented on the data obtained after FTS and CE performed on TvGSTOs and chosen extracts (S2 and S4 Tables). PC1 and PC2 accounted for 58.09% of the total variance (Fig 3). The observed distribution into three groups is statistically significant as shown by the ANOVA performed on the obtained biplot coordinates ($p<0.05$). The first group (A) contains (i) chestnut and oak dead-knotwood, (ii) oak living-knotwood and also (iii) walnut and oak heartwood extracts. These extracts are mainly characterized by the exclusive presence of catechin among the flavonoids family and gallic acid. The second group (B) is characterized by the presence of mixture of flavonoids, gallic acid and lignans in the wood extracts. Extracts from larch heartwood and knotwood contain indeed a large proportion of uncharacterized flavonoids. This chemical composition is similar to that one observed in extracts of cherry heartwood and knotwood and could explain their close distribution. Nevertheless, it is important to mention that walnut sapwood, contains no flavonoid clusters in this group. A possible explanation could be the presence of chemicals also detected in heartwood but not fully identified. Finally the last group (C) contains sapwood extracts from most of the tested tree species (the only exception being walnut sapwood) and all

beech extracts. These extracts are characterized by the absence (or a very low relative concentration) of flavonoids, gallic acid and lignans with the exception of cherry sapwood extract. This latter contains a high relative yield of uncharacterized flavonoids and belongs however to this last group. Analysis of the chemical composition highlights significant differences between the extracts belonging to the different groups. Presence/absence of gallic acid (Fisher analysis, $p<0.0001$) and presence/absence of flavonoids (Fisher analysis, $p<0.005$) could indeed explain at least partially the observed PCA distribution. From our results, it appears that the study of the biochemical interactions between GSTs and wood extracts could be a way to discriminate between these latter. This discrimination is largely correlated with their chemical composition. In particular, the obtained data suggest that the studied TvGSTOs could be used as enzymatic tools to discriminate wood extractives containing potential chemical active molecules such as gallic acid or flavonoids.

In order to get a more accurate discrimination of the extracts belonging to the previously described group B, another PCA was implemented using FTS and CE data with both TvGSTO and PcUre2p proteins and the group B wood extracts as input. This PCA led to three subgroups statistically distinct (Fisher analysis on the coordinates, $p<0.0001$), separating in particular clearly cherry knotwood from cherry heartwood extracts (Fig 4). The presence of sakuranin in cherry heartwood extracts (ANOVA performed on the chemical composition,

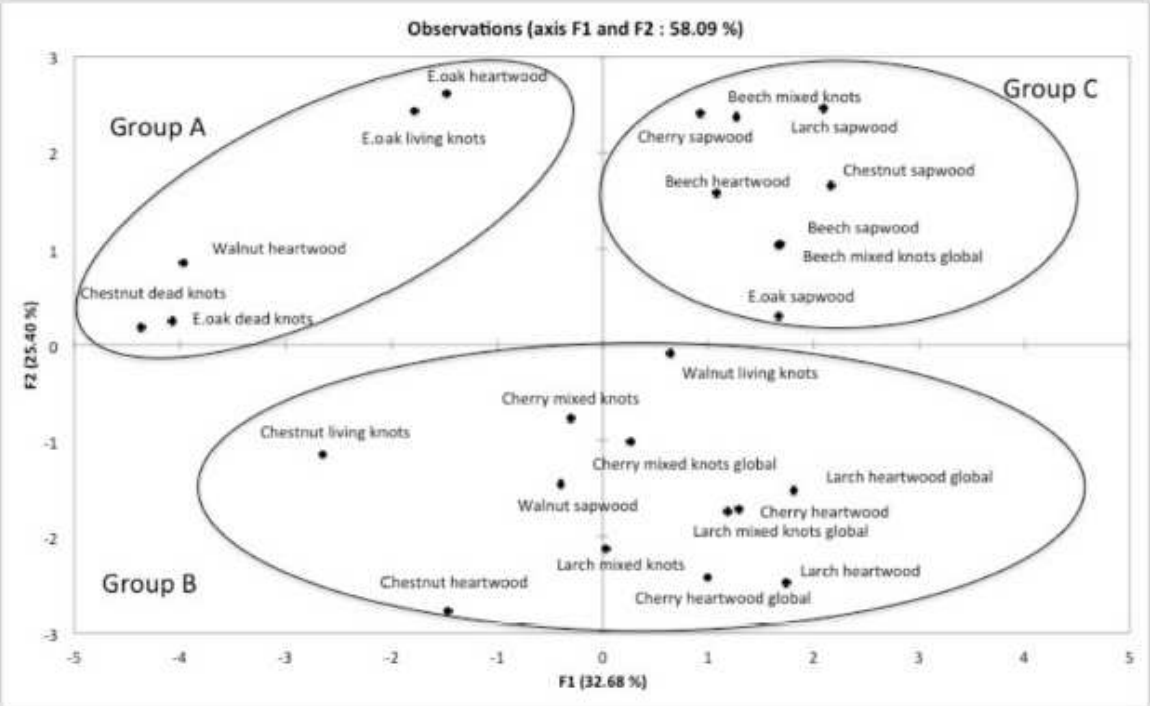


Fig 3. Principal component analysis plot showing the distribution of acetonic extractives from tested hardwood. A matrix based on the interactions between the six studied TvGSTO and these extractives determined using the fluorescence-based thermal stability assay and the competition experiments was used as input

doi:10.1371/journal.pone.0137083.g003

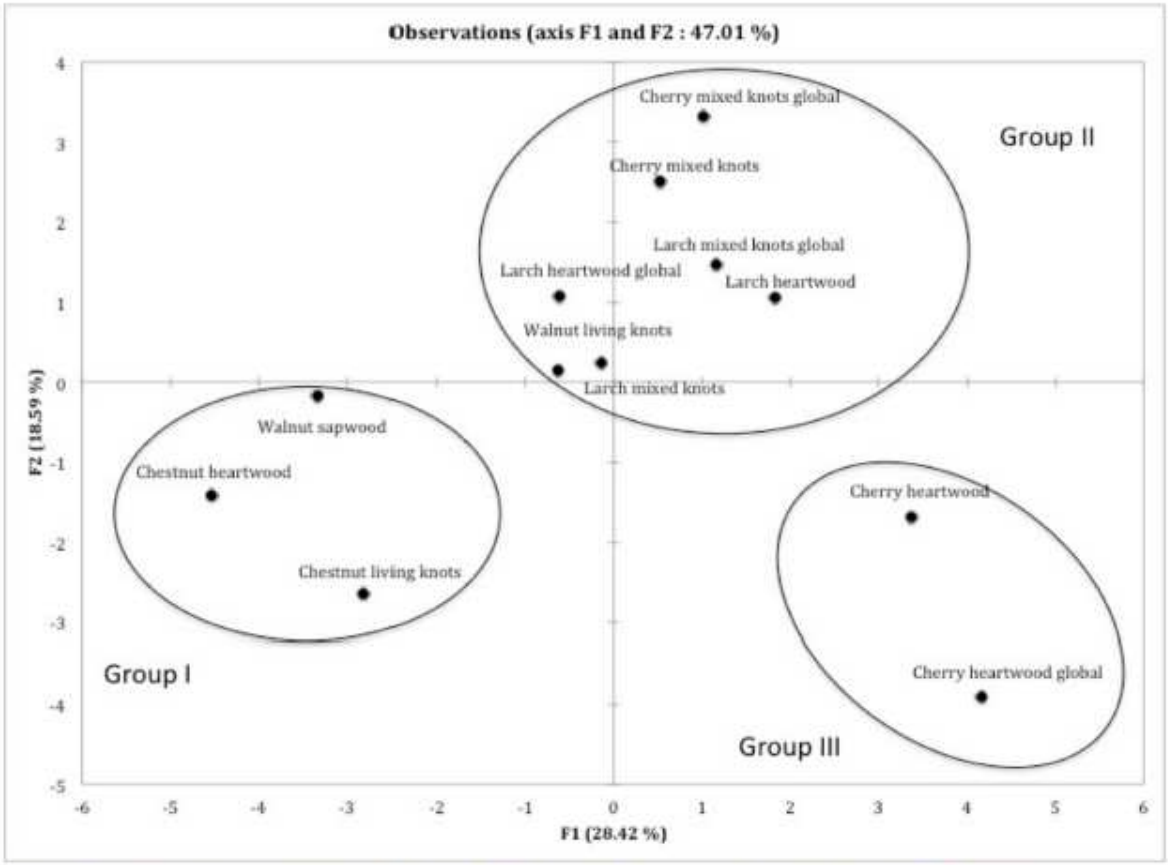


Fig 4. Principal component analysis plot showing the distribution of acetonic extractives of the group B defined in Fig 3. This group B is a chemically similar group of extractives based on major functional categorizations of chemicals found in the extracts. A matrix based on the interactions between the six studied TvGSTO and the five studied PcUre2p and these extractives determined using the fluorescence-based thermal stability assay and the competition experiments was used as input

doi:10.1371/journal.pone.0137083.g004

$p<0.0001$), and more globally the difference in flavonoids composition could explain this repartition. In accordance the previous analysis (Fig 2), the presence of gallic acid could be related to the observed distribution of the chesnut extracts ($p<0.01$). To confirm that TvGSTOs and PcUre2ps could indeed interact with gallic acid and flavonoids, we tested the effects of pure compounds, (gallic acid and two flavonoids, epicatechin and quercetin) on the thermostability and the esterase activity of the different tested proteins. The obtained results demonstrate that globally TvGSTOs and PcUre2ps interact with these compounds (modification of the thermostability and inhibition of the esterase activity) (data not shown).

Wood decaying fungi have developed a complex network of GSTs, enzymes involved in detoxification processes. The low specificity of these enzymes suggests that they are able to interact with a large numbers of substrates/ligands [6, 7, 8]. In another hand, one major factor involved in natural durability of wood is the presence of "wood extractives", which are

potentially toxic for microorganisms [4]. We report here that the study of the biochemical interactions between GSTs and wood extracts could be a way to access to the diversity of these latter. These interactions are indeed closely related to the chemical composition of the wood extracts and could reflect in some cases the origin (tree species and location in wood) of these extracts. From these data, it appears in agreement with our working hypothesis, that the GST network found in white-rot fungi could indeed give insights on their adaptation to different wood species and also to their chemical environment.

Supporting Information

S1 Fig. SDS-PAGE showing the different steps of TvGSTO-2S protein purification. S = standard (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa)— = fraction without protein induction, TF = total fraction, IF = insoluble fraction, SF = soluble fraction, FT = flow through, W1 and W2 = wash, E = elution (protein).
(TIFF)

S1 Table. Nucleotide sequences of TvGSTO. Sequences designed to add a C-term His-tag for purification. NdeI and NotI restriction site of pet 26b are underlined.
(TIFF)

S2 Table. Normalized Data from fluorescence thermal shift assay and competition experiment used as input for principal component analysis. Assays have been performed as described in Materials and methods TvGTO-1S; TvGTO-2S; TvGTO-3S; TvGTO-4S; TvGTO-5S; TvGTO-6S and PcUre2pB1; PcUre2pA4; PcUre2pA5; PcUre2pA6 and PcUre2pA8.
(TIFF)

S3 Table. Activity of the six GSTO from *Trametes versicolor* against CDNB. Catalytic parameters were determined using varying substrate concentrations at saturating GSH concentration by fitting the results to the Michaelis-Menten equation using GraphPad Prism 5 software. Data are represented as mean ± S.D (n = 3).
(TIFF)

S4 Table. Library of different wood extracts. The Library contained acetone and dichloromethane extracts of sapwood, heartwood and knotwood from different hardwood and softwood species used for CE and FTS assays.
(TIFF)

Acknowledgments

The authors want to thank the forest managers D. Collinet and Y. Ehrhardt, from the National Forest Service ONF and AgroParisTech, private nursery Adam et Fils respectively, M. Lopez from IRSTEA Aix-en-Provence and J.-P. Charpentier from INRA Orléans for providing the wooden material. The authors would like to warmly thank Tiphaine Lamant, Loic Dailly, Bruno Garnier and Nicolas Houssement for their technical help.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FC PG MMR EG. Performed the experiments: AD FS ZKB NT SD AH EG. Analyzed the data: AD FS ZKB NT MMR FC SD PG EG. Contributed reagents/materials/analysis tools: FS NT. Wrote the paper: AD ZKB MMR FC SD PG EG.

References

1. Eastwood DC, Floudas D, Binder M, Majcherczyk A, Schneider P, Aerts A, et al. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. Science. 2011; 333: 762–765. doi: 10.1126/science.1205411 PMID: 21764756
2. Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, et al. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. Science. 2012; 336: 1715–1719. doi: 10.1126/science.1221748 PMID: 22745431
3. Riley R, Salamov AA, Brown DW, Nagy LG, Floudas D, Held BW, et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. Proc Natl Acad Sci. 2014; 111: 9923–9928. doi: 10.1073/pnas.1400592111 PMID: 24958869
4. Kirker G, Blodgett A, Arango R, Lebow P, Clausen C. The role of extractives in naturally durable wood species. Int Biodeterior Biodegrad. 2013; 82: 53–58.
5. Harms H, Schlosser D, Wick LY. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Nat Rev Microbiol. 2011; 9: 177–192. doi: 10.1038/nrmicro2519 PMID: 21297669
6. Morel M, Meux E, Mathieu Y, Thuillier A, Chibani K, Harvengt L, et al. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi: Fungal xenomic networks. Microb Biotechnol. 2013; 6: 248–263. doi: 10.1111/1751-7915.12015 PMID: 23279857
7. Mathieu Y, Prosper P, Favier F, Harvengt L, Didierjean C, Jacquot J-P, et al. Diversification of fungal specific class A glutathione transferases in saprotrophic fungi. Treseder K, editor. PLoS ONE. 2013; 8: e80298. doi: 10.1371/journal.pone.0080298 PMID: 24278272
8. Thuillier A, Ngadin AA, Thion C, Billard P, Jacquot J-P, Gelhaye E, et al. Functional Diversification of fungal glutathione transferases from the Ure2p class. Int J Evol Biol. 2011; 2011: 1–9. doi: 10.4061/2011/938308
9. Thuillier A, Chibani K, Belli G, Herrero E, Dumarcay S, Gerardin P, et al. Transcriptomic Responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak acetonic extracts: Focus on a new glutathione transferase. Appl Environ Microbiol. 2014; 80: 6316–6327. doi: 10.1128/AEM.02103-14 PMID: 25107961
10. Mathieu Y, Prosper P, Buee M, Dumarcay S, Favier F, Gelhaye E, et al. Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. J Biol Chem. 2012; 287: 39001–39011. doi: 10.1074/jbc.M112.402776 PMID: 23007392
11. Meux E, Prosper P, Ngadin A, Didierjean C, Morel M, Dumarçay S, et al. Glutathione Transferases of *Phanerochaete chrysosporium* S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class. J Biol Chem. 2011; 286: 9162–9173. doi: 10.1074/jbc.M110.194548 PMID: 21177852
12. Meux E, Morel M, Lamant T, Gérardin P, Jacquot J-P, Dumarçay S, et al. New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. Biochimie. 2013; 95: 336–346. doi: 10.1016/j.biochi.2012.10.003 PMID: 23063695
13. Kebbi-Benkeder Z, Colin F, Dumarçay S, Gérardin P. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. Ann For Sci. 2014; 1–8.
14. Willför S, Hemming J, Reunanen M, Holmbom B. Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stemwood. Holzforschung. 2003; 57: 359–372.
15. Boivin S, Kozak S, Meijers R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. Protein Expr Purif. 2013; 91: 192–206. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.002 PMID: 23948764
16. Lallement P, Meux E, Gualberto JM, Prosper P, Didierjean C, Saul F, et al. Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. Biochem J. 2014; 462: 39–52. doi: 10.1042/BJ20140390 PMID: 24825169
17. Mathieu Y, Gelhaye E, Dumarçay S, Gérardin P, Harvengt L, Buée M. Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology. J Microbiol Methods. 2013; 92: 157–163. doi: 10.1016/j.mimet.2012.11.017 PMID: 23206919
18. Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chem Res Toxicol. 1997; 10: 2–18. doi: 10.1021/tx960072x PMID: 9074797
19. Wilce MCJ, Parker MW. Structure and function of glutathione S-transferases. Biochim Biophys Acta BBA—Protein Struct Mol Enzymol. 1994; 1205: 1–18. doi: 10.1016/0167-4838(94)90086-8
20. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, Lobanov VS, Myslik J, Graf E, et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. J Biomol Screen. 2001; 6: 429–440. PMID: 11788061
21. Zhuang Y-D, Chiang P-Y, Wang C-W, Tan K-T. Environment-sensitive fluorescent turn-on probes targeting hydrophobic ligand-binding domains for selective protein detection. Angew Chem Int Ed. 2013; 52: 8124–8128. doi: 10.1002/anie.201302884

22. Giuliani SE, Frank AM, Collart FR. Functional assignment of solute-binding proteins of ABC transporters using a fluorescence-based thermal shift assay. Biochemistry (Mosc). 2008; 47: 13974–13984.

Les résultats de ces tests démontrent que les enzymes du champignon réagissent de manière différente selon la composition chimique des extraits des différents types de bois. Les GST ont particulièrement réagi avec les extraits du chêne vert (duramen, nœuds vivants du milieu et morts), les nœuds morts du châtaignier ainsi que le duramen du noyer. Les GST ont réagi avec moindre intensité avec les extraits du mélèze (duramen et nœuds), du merisier (duramen et nœuds), du noyer (aubier, nœuds vivants du milieu) et du châtaignier (duramen et nœuds vivants du milieu). Enfin ils ont faiblement réagi avec les extraits issus de l'aubier (merisier, mélèze, châtaignier, chêne vert) et tous ceux issus du bois de hêtre (nœuds, duramen et aubier). L'interaction intense des GST avec les extraits de nœuds et d'aubier du noyer corroborent nos hypothèses concernant la présence probable de molécules phénoliques non identifiées par la GC-MS.

4 Synthèse du chapitre 2

La principale conclusion de cette étude de la biodiversité interspécifique est la richesse des nœuds en extractibles par rapport au bois du tronc (aubier et duramen) pour les vingt-trois espèces étudiées. Les nœuds des résineux sont plus concentrés en extractibles que ceux des feuillus, seuls les nœuds du chêne pédonculé et les nœuds morts du châtaignier ont des taux dépassant les 20 %. Dans les feuillus, la majorité des extraits des nœuds a été solubilisée par l'eau, et le dichlorométhane est le solvant qui en a solubilisé le moins. Dans les résineux, de manière générale, le dichlorométhane est le solvant qui a extrait le plus de molécules, excepté pour le mélèze et le ginkgo.

Concernant la nature des extraits nodaux, la principale conclusion est l'existence de fortes variabilités entre le bois d'arbres de même genre botanique (exemple des deux pins et des deux chênes), entre les nœuds et le duramen d'un même arbre, et entre les nœuds d'un même arbre. Les terpènes sont présents dans tous les échantillons, que ce soit sous forme d'acides résiniques, de stérols ou d'autres mono-, sesqui-, et diterpènes. Les résineux contiennent des lignanes, principalement dans leurs nœuds qu'aucun bois de feuillu ne contient. Les principaux lignanes identifiés sont le secosiolaricirésinol, la nortrachelogénine, l'hydroxymatairésinol, le taxirésinol. L'agatharésinol est un norlignane extraits du bois taxodiaceae : métasequoia et cyprès chauve. Les stilbènes sont exclusivement présents dans les pins. Les flavonoïdes sont surtout présents chez les feuillus mais également chez le mélèze et chez douglas qui en contiennent en quantités importantes. Les nœuds des feuillus et quelques-uns des résineux sont particulièrement riches en glucides. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant ces sucres. Ils pourraient s'agir de glucides libres qui sont habituellement présents en fortes quantités dans l'aubier. Ils pourraient aussi provenir de la couche gélatineuse du bois de tension des feuillus ou bien de l'hydrolyse/dégradation des composés glycosilés. Enfin, la thylose et la gommose des vaisseaux mises en évidence dans les

vaisseaux des branches de feuillus se caractérisent par une forte proportion de glucides (Aloni et al. 1997 ; Grosclaude, 1993 ; Stevanovic and Perrin 2008 ; Zimmerman 1978). Dans tous les cas, il n'est pas exclu que les pics de ces sucres sur les chromatogrammes aient masqué ceux d'autres composés tels que des flavonoïdes et/ou des lignanes.

En vue des résultats obtenus avec le cyprès chauve, le métasequoia et le ginkgo biloba, il n'est pas possible de confirmer l'existence d'une relation entre les extraits nodaux et la chute des feuilles de ces trois résineux. Dans le cas du cyprès et du métasequoia, la présence du norlignane et l'absence de flavonoïdes (hormis des traces de catéchine dans l'aubier du cyprès), assimilent ces arbres au reste des gymnospermes persistants. Toutefois, les extraits aqueux n'ont pas été analysés surtout dans le cas du ginkgo biloba où ils sont majoritaires comme pour le mélèze. De même, il n'est pas possible d'établir une relation entre la nature des extractibles et le caractère persistants des feuillus testés : le chêne vert, le houx et le buis. Par ailleurs, ils ne présentent pas de similitudes avec les résineux persistants.

Les variabilités des extractibles se reflètent au niveau des interactions entre les GST de *Trametes versicolor* et les extractibles du bois. En effet, ces protéines ont réagi davantage avec les extraits des feuillus, et particulièrement avec ceux riches en acide gallique et en flavonoïdes. Ces résultats démontrent la capacité de *Trametes Versicolor* à réagir avec un large spectre de molécules et l'implication des GST dans la détoxication des extractibles lors de la dégradation du bois pour assurer la survie du champignon.

Enfin, une grande proportion de composés n'a pas été identifiée en utilisant la GC-MS. Des analyses supplémentaires sont donc nécessaires pour identifier l'ensemble des molécules présentes dans les extraits des différents types de bois. L'utilisation de la chromatographie liquide (LC-MS) pourrait apporter de précieuses informations et compléter le spectre des molécules présentes dans le bois des nœuds, de duramen et d'aubier des essences. Il s'agit notamment d'identifier des oligolignanes qui ont été rapportés dans les nœuds des résineux (Willför et al. 2004c), des arabinogalactanes chez le mélèze (Côté et al., 1966) et des tanins.

Chapitre 3 :

Biodiversité intraspécifique et intra-arbre des extractibles nodaux

Chapitre 3 Biodiversité intraspécifique des extractibles nodaux

Après avoir mis en évidence la biodiversité interspécifique des extractibles nodaux et l'existence d'une variabilité entre les nœuds d'un même arbre, l'objectif poursuivi dans ce chapitre est d'établir précisément le profil intra-arbre des extractibles nodaux chez une espèce particulière : le sapin pectiné, et de relier ce profil aux conditions de croissance des arbres sélectionnés.

Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article qui sera soumis à « Forest Ecology and Management ». Brièvement, les hypothèses testées sont liées à une possible corrélation entre les concentrations des extractibles nodaux et le diamètre des branches connectées à ces nœuds. Par ailleurs, ces concentrations seraient dépendantes des caractéristiques de l'arbre : statut social et densité du peuplement dont il est issu. Pour cette étude, quinze sapins ont été échantillonnés à Mont-Sainte-Marie (Doubs) dans un dispositif de l'Office National des Forêts (ONF). Les arbres ont été choisis dans trois peuplements de densités différentes : un peuplement contrôle très dense (3233 arbres/ha) où il n'y a jamais eu d'interventions sylvicole pour l'éclaircir, un peuplement de densité moyenne (1205 arbres/ha) et un peuplement peu dense car les éclaircies y ont été dynamiques (591 arbres/ha). De plus, dans chacun des peuplements, les arbres ont été classés selon leur statut social : arbres dominés, arbres co-dominants et arbres dominants. Les dominés se caractérisent par leur faible hauteur et leur faible diamètre. Les arbres dominants sont plus hauts et ont de gros diamètres. Les arbres co-dominants sont intermédiaires entre les deux statuts dominés et dominants. Les rondelles contenant des nœuds ont été échantillonnées de manière précise : la rondelle correspondant à la première branche verte, la rondelle correspondant à la base du houppier et plusieurs autres rondelles dans le houppier jusqu'à la cime des arbres. De plus, des rondelles en dessous de la première branche verte ont été sciées, correspondant le plus souvent à des branches mortes. Les nœuds d'une même rondelle ont été récupérés et broyés ensemble, puis extraits au soxhlet avec de l'hexane et de l'acétone successivement. Ce sont les concentrations d'extraits à l'hexane et l'acétone qui ont été modélisées en ne tenant compte que des nœuds prélevés dans le houppier. L'identification des molécules a été effectuée par GC-MS comme décrit dans le chapitre précédent.

Article 4: Abies alba knot extractives: Variability according to silviculture, social status and position within the crown.

Zineb Kebbi-Benkeder[1,2,3], Francis Colin[1,2], Ruben Manso[1,2], Mathieu Fortin[1,2], Stéphane Dumarçay[3], Philippe Gérardin[3]

[1] AgroParisTech, UMR 1092 LERFOB

[2] INRA, UMR 1092 LERFOB

[3] Université de Lorraine, EA 4370 LERMAB

1 Abstract

Context: Knots may constitute a new source of biomolecules since they contain huge extractives concentrations. However, the intraspecific and the within-tree variabilities of knot extractives are not fully investigated.

Aims: Knot extractives were quantified and modelled to establish a vertical distribution of extractive concentrations in silver fir tree grown in different silvicultural conditions.

Methods: Fifteen fir trees were sampled according to their social status within three silvicultural treatments. Discs containing knots were sampled according to their position along the stems. Extractions were carried out with hexane and acetone successively. Identification of the compounds was carried out with gas chromatography-mass spectrometry. Extractive concentrations of knots sampled in the living crown were modelling through the Seemingly Unrelated Regression

Results: The main compounds identified were juvabione, dehydrojuvabione, secoisolariciresinol, hydroxymatairesinol and lariciresinol. For all trees, knot extractives were dependent on their position within the living crown. The trends showed an increase from the tree tip to the crown base. Thus, trees with the longest crowns exhibited the largest extractive concentrations. These trees were the dominant ones. Furthermore, dead knots below the living crown contained the highest extractive concentrations. The between-trees variability showed that dominant trees exhibited the largest extractive contents. The between-stands variability showed that knots sampled in the thinned plots contained larger extractives concentrations than the knots from the control plot.

Conclusion: The knot extractives vary not only between species, but also within-species, between-trees and within-trees according to localisation along the tree, stand characteristics and tree social status, these latter characteristics being controlled by silviculture.

Keywords: Silver fir, living crown, knot, branch diameter, lignan, secoisolariciresinol, dehydrojuvabione

2 Introduction

Tree knots have been evidenced quite recently to contain higher concentrations of extractives than most other parts of the tree especially higher than trunk heartwood (Ekman et al., 2002; Holmbom et al., 2003, Kebbi-Benkeder et al., 2015a, 2015b; Willför et al., 2003a, 2003b, 2004a, 2004b). Most tree species that were investigated are softwoods of major industrial importance such as spruces, pines, firs and larches. The main extractive components identified in their knotwood are lignans which are highly antioxidant phenols (Eklund et al., 2005; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003c). More specifically, hydroxymatairesinol, secoisolariciresinol, nortrachelogenin, lariciresinol are the main lignans identified in softwood knots with concentrations being up to hundred times that in stemwood if the latter contained these phenols (Willför et al., 2003a, 2003b, 2004a, 2004b).

The reason of this chemical richness of knotwood has not been definitely elucidated. In stemwood, extractives are synthesised either when sapwood is transforming to heartwood by metabolising the storage material (starch, sucrose, lipids), or when wood is subjected to a wound or infection (Taylor et al., 2002). The main hypothesis are related to the function of protection attributed to extractives. On the one hand, the knot is a gate for air and pathogens especially when the branch dies (Lindberg et al., 2004; Shigo, 1985; Välimaa et al., 2007). On the other hand, knot is a mechanically vulnerable junction that supports loads such as branch and foliage weight, wind and snow loads. Thus, knotwood has to be reinforced (Burgert and Jungnikl, 2004; Piispanen et al., 2008; Willför et al., 2003a, 2003b). In addition, the motion of branches is believed to generate free radicals that damage wood cell components. Knot extractives play thus a crucial role as free radicals scavengers (Neacsu et al., 2007; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003c)

Most studies on knot extracts have been dedicated to their antioxidant, fungicide and antibacterial capacities in the perspective of industrial development as drugs, naturel biocides and food supplements (Lindberg et al., 2004; Pietarinen et al., 2006a; Välimaa et al., 2007; Willför et al., 2003c). Some studies for potential medicinal use revealed that extracts of larch knots may enhance cerebral activity, while Pinus banksiana and Picea sitka knot extracts exhibit cytoprotective effect (Loers et al., 2014; Phelan et al., 2009). Pure knot extractives such as stilbenes and hydroxymatairesinol display anti-inflammatory activity (Laavola et al., 2015; Spilioti et al., 2014). Moreover, the oestrogenic activity of lignans makes them interesting compounds to prevent breast and prostate cancers (Cosentino et al., 2007; Kangas et al., 2002; Yatkin et al., 2014).

Once these knot interest and chemical properties stated, the first step not yet completed is to screen the tree species, in order to assess the natural biodiversity and to detect which species are the richest (Hovelstad et al., 2006; Kebbi-Benkeder et al., 2015a, 2015b; Neacsu et al., 2007; Pietarinen

et al., 2005, 2006b; Pohjamo et al., 2003; Willför et al., 2004a, 2004b, 2007). These studies have opened new possibilities of green chemistry supply and have even contributed to introduce the bio-raffinery concept although the most relevant and economically feasible chains are still to be designed (Holmbom et al., 2003, Turley et al., 2006). Meanwhile, one step ahead is to understand the variability of the intra-species resource in order to better know from which resource the green chemistry must preferentially take its supplies.

The information on the influencing factors on knot extractives is quite limited. Concerning the influence of the soil (or site) and the climate, the information is rather sparse. Studies revealed a variation of knot extractive concentrations in different Norway spruce trees depending on their site of growth and/or tree age, knots of the northern Finland and the oldest trees being the richest ones (Piispanen et al., 2008; Willför et al., 2003b). This has been attributed mainly to severe growth conditions in the North with low-temperature-related injuries requiring higher protection levels. However, Willför et al., (2004a) found that knots of a young Norway spruce (35 annual rings) sampled in Saint Dié (Vosges mountains in Northeastern France) contained higher concentrations of lignans than older trees (61 and 77 annual rings) sampled in Finland, maybe due to its high elevation origin. On the other hand, there were no significantly different results according to geographical origin in the case of Scots pine knot extractives (Willför et al., 2003b). Nitrogen fertilization had also no effect on knotwood extract concentrations even if it had a stronger effect on the global tree growth in the poorest site in north Finland (Piispanen et al., 2008).

Concerning the within-tree variability, studies highlighted controversial vertical profiles of knot extract concentrations. On the one hand, Piispanen et al., (2008) found that the highest lignan concentrations in Norway spruce were found in the knots close to the base of the living crown, and then concentrations decrease toward either the top or the bottom of the trees. In maritime pine (*Pinus pinaster*), yew (*Taxus baccata*) and Atlantic cedar (*Cedrus atlantica*), the richest knots were those at the bottom of the trees (Kebbi-Benkeder et al., 2015b). On the other hand, living or dead knots from the same tree, even from the same whorl contained different extractive concentrations (Kebbi-Benkeder et al., 2015b; Willför et al., 2003a, 2003b; 2004a, 2004b). However, due to the limited number of trees and knots analysed in the mentioned studies, no general trend can be drawn for all species and individuals.

Thinning enhances radial growth of trees but its influence on heartwood extractive content is not fully established. Taylor et al., (2003) reported a positive influence for Douglas fir stem extractives, while it was reported a negative influence on Western red cedar and Sitka spruce stem extractives (Caron et al., 2013; Taylor et al., 2006). Silviculture controls the crown development (length and

spread) (Spathelf, 2003; Weiskittel et al., 2007) and the branch diameters (Lowell et al., 2014; Newton et al., 2012); it can be expected that silviculture may in turn influence the knot extractives. Piispanen et al., (2008) evidenced an indirect effect of the branch diameter on knot extractives concentrations through the interaction between branch diameter and height but not a direct effect through the main effect of the branch diameter. Results from Piispanen et al., (2008) just suggest a silviculture effect but not really substantiate this since investigated silviculture in northern and southern regions of Finland are very different in adequacy with the site conditions.

Within the context of resource assessment, the objective of this paper is to start the quantification of the intra-species resource biodiversity by tackling firstly the effect of silviculture and social status. We tested whether (i) there is a within tree variation of knot extractive concentrations and (ii) the diameter of the branch influences positively the knot concentrations. Moreover, the sampling trees will allow us to test if (iii) the social status of the tree (dominant, co dominant or supressed) and (iv) the thinning-induced stand density has an effect on the knot extractives in the living crowns of the selected trees. We expect that in the living crown, knots of dominant trees may reach larger concentrations than those of suppressed trees. On the other hand, it can be expected that knot extractive concentrations must be higher in the trees of the heavily thinned plots since these trees benefit from more available resources (nutriments and light) that could be partly converted into extractives.

Silver fir (Abies alba) was selected for this study since a thinned experiment and detailed tree measurements were available, and knot extractives of Abies species have been analysed manifold, especially A. alba leading to a quite good knowledge of the extractable compounds (Kebbi-Benkeder et al., 2015a; Lindberg et al., 2004; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003c, 2004b, 2007).

3 Material and methods

3.1 Field experiments data

Fifteen silver fir trees (*Abies alba* L.) were sampled in an experiment designed by the French Forest Service (ONF) and located in Mont-Sainte-Marie in the Jura mountains in the Eastern France (extended Lambert II coordinates: x= 899748 y=2205830, 900m a.s.l). Average annual climatic features were the following: rainfall: 1518mm in 148 days, temperature 7.4°C, number of days with frost: 141.4 (period 1991-2011; Canellas et al., 2014).

While four silviculture schedules were installed in this experiment in winter 1990/1991 where silver fir, Norway spruce and European beech were mixed (Conrad, 2012), only three schedules were selected in the present study: control (without thinning), medium and dynamic thinning schedules.

The difference between these schedules is the objective number of stems (total number of residual fir, spruce and beech trees) at crop when dominant height of the stand will be 35m. The objective for the medium schedule is 200 stems per ha while 150 stems per ha is the objective for the dynamic schedule. The main features of these three schedules are presented in table 1.

Control	Time	Thinning schedule	Number of stems / ha[a] before / ***after*** thinning	Average annual increment[b] of H, R, BA V and Do
Control (C)	Winter 90/91 Winter 02/03 Winter 09/10 Winter 11/12	No thinning No thinning No thinning No thinning	9400/***9400*** 5129/***5129*** 4763/***4763*** 3233/***3233***	H: 37 R: 2.5 BA: 1.68 V: 14.1 Do: 30.6
Medium (M)	Winter 90/91 Winter 02/03 Winter 09/10 Winter 11/12	Thinning No thinning Thinning No thinning	6800/***1500*** 3712/***3712*** 3112/***1235*** 1205/***1205***	H: 43 R: 3.5 BA: 2.06 V: 21.2 Do: 30.1
Dynamic (S)	Winter 90/91 Winter 02/03 Winter 09/10 Winter 11/12	Thinning No thinning Thinning No thinning	5600/***900*** 1494/***1494*** 1667/***596*** 591/***591***	H: 44 R: 4 BA: 1.73 V: 19.4 Do: 31.6

Table 1 : Main features of the three schedules selected in the Mont-Sainte-Marie experiment.

[a]: number of residual fir, spruce and beech stems.

[b]: increments for fir only. Average annual increment of H=Height increment in cm/year between 1991 and 2008. R=DBH/2 increment in mm/year between 1991 and 2011. BA=Basal area increment in m²/ha/year between 2003 and 2011. V=total volume increment in m3/ha/year between 2003 and 2011. Do=dominant DBH in 2011 in cm.

From table 1, it must be noticed that it is the medium schedule that has produced the largest annual increments in basal area and volume at a hectare basis while it is the heaviest schedule that has produced the largest height increment (but very close to this of the medium schedule) and radial increment. The very similar growth of the trees in these two thinned schedules is quite surprising since one may expect much more annual increments in the most dynamic schedule. This response is maybe a particularity of Silver fir. Silver fir is indeed well known to tolerate shadow during its early life and to have dynamic growth resumption even at old age with canopy opening.

3.2 Tree sample

The fifteen trees were felled in April 2014 and classified according to their thinning schedule and social status: suppressed trees, co-dominant trees and dominant trees. Total tree height (H), diameter at breast height (DBH), height to the first living branch (LB) and height to the crown base (CB) were measured and the slenderness was calculated as the ratio H/DBH (Table 2). From table 2, it must be noticed that the ages are quite variable within a range of 40-80 years. The medium schedule is represented by young trees except for one dominant tree. The oldest trees in our sample are the two dominant trees of the dynamic schedule. Height ranges between 6.7 m and 17.3 m while DBH ranges between 6.4 cm and 30.9 cm. The two thickest sample trees belong to the medium schedule. C2.2, C3.1 and C3.2 trees in the control are particularly stunted with small heights, DBH and large H/DBH ratios.

Treatment	Tree id.	Age	Height (m)	DBH (cm)	LB (m)	H/DBH (cm/cm)	CB (m)	Crown length (m)	Number of sampled discs <LB ***or above***
Control	C1.1	54	12.9	19.1	3.2	67.3	3.6	9.3	1 ***4***
(C)	C1.2	72	14.3	17.5	3.5	81.7	6.4	7.9	0 ***5***
	C2.1	51	9.1	12.1	3.6	75.2	4.6	4.5	1 ***3***
	C2.2	55	13.5	12.4	7.6	108.7	8.2	5.3	1 ***5***
	C3.1	60	6.7	6.7	2.8	100.1	3.2	3.5	3 ***3***
	C3.2	62	8.7	6.4	4.4	136.9	5.2	3.5	2 ***3***
Medium	M1.1	49	16.0	30.9	3.9	51.9	3.9	12.1	1 ***6***
(M)	M1.2	74	17.0	20.7	4.9	81.9	7.9	9.1	2 ***6***
	M1.3	45	16.7	29.0	3.3	57.8	4.9	11.8	0 ***7***
	M2.1	48	14.2	17.2	5.0	82.6	5.5	8.7	6 ***0***
	M2.2	40	10.8	13.4	3.9	80.9	5.4	5.4	2 ***2***
Dynamic	S1.1	79	17.3	27.9	3.5	62.0	5.5	11.8	1 ***6***
(S)	S1.2	80	15.7	22.3	4.8	70.3	5.8	9.9	1 ***6***
	S2.1	50	14.2	19.0	5.0	74.8	6.1	8.1	1 ***6***
	S2.2	48	13.2	16.6	8.3	79.5	8.4	4.8	4 ***2***

Table 2 : Main attributes of the sampled trees.

In the tree identification code the letter corresponds to the treatment while the first number is the social status (1=dominant; 2=co-dominant; 3=supressed), and the second number after the point is the tree number in this social status. DBH: Diameter at breast height. H: height. LB: height to the lowest living branch. CB: height to the crown base (where ¾ of the branches are living).

In addition to tree measurements, all the branches with a diameter over 5mm still present even as a measurable stub were measured in vertical position from the tree tip to the tree stump. The branch diameter (BD: diameter in the horizontal plane) was measured and the living status (0=dead; 1=living) was noticed. These measurements enabled to compute the mean (mD) and maximum diameter (xD) of the branches related to every branch whorl and also the sum of the section areas of all the branches inserted in- and above- every whorl (Ss_above), considered as a proxy of the current photosynthetic activity of the living crown above every whorl. All factors and variables available at plot, tree and disc are listed in table 3.

Level	**Factors and variables**	**Levels of factor or variable definition**	**Units**
Plot	Thinning schedule	C: control M: medium S: dynamic	
Tree	Social status	1: dominant 2: co-dominant 3: suppressed	
	DBH Height Age	Diameter at breast height Total height Tree age at stump	cm cm or m Annual rings
	H/D, D/H DI HI	Height over DBH, DBH over Height Annual diameter increment = DBH/age Annual height increment = H/age	cm/cm mm/year cm/year
	LB CB	Height to the lowest living branch Height to the crown base (where ¾ of the branches are living)	cm or m cm or m
	CL_LB, CL_CB	Crown length from tree tip to either LB or LC	cm or m
	CR_LB, CR_CB	Crown ratio according to either LB or LC	%
Disc	mh DINC rDINC xD ss mD	average insertion height of the disc average depth into crown relative DINC=DINC/CL_LB Maximum branch diameter on the disc sum of the square diameter of all the branches with BD≥5mm quadratic mean branch diameter	cm or m cm or m cm/cm mm cm^2 cm

	age_slice	age of the branches of the slice (=PA-1)	
	Ss_above	Sum of the section areas of all the branches inserted in- and above- every disc computed from the measurement of all the branches of diameter over 5mm	dm^2

Table 3 : Factors and variables available at plot, tree and disc levels.

3.3 Wood Material

On each tree, four to eight discs corresponding to branch-whorls were recovered with mandatory a disc at LB, a disc at CB and some discs above in the living crown. In addition, when it was possible a few discs below LB containing dead branches were sampled. Most discs were finally above LB with the notable exception of tree M2.1 (Table 2). A total of ninety discs were sampled. Finally, a disc at the stump was sawn for tree age determination. A wood chisel was used to remove knotwood chips from each disc. Knots from the same branch whorl were gathered together. When loose knots were present in a disc, the tight portion and the loose portion were separated. Then, knot chips were dried at 50 °C for 48 hours and ground. The powders were frozen until extraction.

3.4 Wood extraction and chromatographic analysis

Knotwood powders were extracted in Soxhlet apparatus using two solvents successively. Hexane was used to extract lipophilic compounds such as terpenes and fatty compounds and acetone was used to extract hydrophilic substances such as lignans and carbohydrates (Willför et al., 2003a, 2003b). Extractives were gravimetrically quantified as a percentage of dry dust weight. Since we did not separate the different knots of the same whorl, we did not have the extractives concentrations of every knot in a disc and cannot get the intra-whorl variability.

The identification of the molecules was made by gas chromatography (GC – MS) as described in Kebbi-Benkeder et al., (2015a). Briefly, 1 mg of the hexane or the acetone extracts was silylated by adding 80 µL of BSTFA/TMSCI (99/1, v/v) and heated for 24 hours at 70 °C. Silylated extracts were diluted in 1 mL of ethyl acetate and 1 µL was injected in GC – MS (Clarus 600 GC gas chromatograph coupled to a SQ8 mass spectrometer, Perkin-Elmer). The injection was performed at 250 °C and the carrier gas was helium at a flow of 1 mL/min. The oven followed this heating program: 80 °C for 2 min, a rise from 80 to 190 °C at a rate of 10 °C/min, a second increase from 190 to 280 °C at a rate of 15 °C/min and hold for 5 min, then a final rise at 10 °C/min until 300 °C hold for 14 min. The column was a 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm-capillary column (J&W Scientific DB-5MS), and constituted by 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane fused-silica. The electron impact mode at 70 eV was performed for the ionization of the components and their identification was achieved by NIST library (US National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA, Edition of 2005) or by comparison of published mass spectra (Ekman, 1976; Ekman et al.,2002; Smeds et al., 2012; Willför

et al., 2005a). Relative composition of each injected sample was determined by integration of the area of it peaks obtained by TIC (Total Ion Current) mode.

3.5 Display of results and statistical analysis

The response variables to be analysed and modelled were the concentrations of either hexane or acetone knot extractives. All variables and factors listed in table 3 were tested for plotting the graphs and modelling. We plotted the observed data according to longitudinal profiles which are usual means to display diameter distribution of branches and decide the models to apply. The data were displayed according to the distance from the tree tip: depth inside crown (DINC).

Branch insertions beyond the crown can easily go unnoticed and so do knots. For the sake of completeness, data used for the modelling were subset so that only the records gathered above CB were retained. We followed a non-linear model approach. Let denote these responses by y_1 for acetone extractives and y_2 for hexane extractives. Let us also assign indices *i*, *j* and *k* to the schedule, the tree and the disc, respectively. In a preliminary step, a model for each response was independently fitted. First, an explanatory variable was selected to represent the variation of y_1 and y_2 over crown length, together with an adequate functional form. Most longitudinal variables in Table 3 were tested for this purpose. Then, some parameters of the resulting models were linearly expanded to consider additional variables thought to influence concentration extractives, such as DBH, DI, HI, Age or social status (tree level) and xD or ss (disc level). The two preliminary models selected after a visual check of the standardised residuals and comparison of AIC tested models (Akaike Information Criterion) were:

$$y_{1,ijk} = e^{\beta_0 + \beta_1 DINC_{ijk}} + \varepsilon_{1,ijk} \quad (1)$$

$$y_{2,ijk} = e^{\gamma_0 + \gamma_1 DINC_{ijk}} + \varepsilon_{2,ijk} \quad (2)$$

where $y_{\cdot,ijk}$ is the response, $\boldsymbol{\beta} = (\beta_0, \beta_1)$ and $\boldsymbol{\gamma} = (\gamma_0, \gamma_1)$ are vectors of estimable parameters and $\varepsilon_{\cdot,ijk}$ stands for the error terms. The latter are assumed normally distributed such that $\varepsilon_{1,ijk} \sim N(0, \sigma^2_1)$ and $\varepsilon_{2,ijk} \sim N(0, \sigma^2_2)$. Note that under this formulation, the errors from both models are considered independent, which is not necessarily a plausible assumption. Given that acetone and hexane extractives were measured at the same disc, a residual correlation would be expected instead. Not taking this correlation into account may lead to biased parameter estimates and unreliable variance terms (Gregoire et al., 1995). In order to consider this correlation, models in Eqs. 1 and 2 were simultaneously fitted through the so-called *seemingly unrelated regression* (SUR), cf. (Gallant, 1987). Basically, this technique consists in coupling both models through dummy variables, weighting the

residual variance according to the response type and allowing for a correlation structure at the disc level. The resulting model is expressed as

$$\boldsymbol{y_{m,ijk}} = \left(e^{\boldsymbol{\beta}(\mathbf{1},DINC_{ijk})}, e^{\boldsymbol{\gamma}(\mathbf{1},DINC_{ijk})}\right)\boldsymbol{d_{m,ijk}} + \left(\boldsymbol{\varepsilon_{m,ijk}}\right)\boldsymbol{d_{m,ijk}} \quad (3)$$

$$\boldsymbol{y_{m,ijk}} = \begin{bmatrix} y_{1,ijk} \\ y_{2,ijk} \end{bmatrix} \qquad \boldsymbol{d_{m,ijk}} = \begin{bmatrix} d_{1,ijk} \\ d_{2,ijk} \end{bmatrix} \qquad \boldsymbol{\varepsilon_{m,ijk}} = \begin{bmatrix} \varepsilon_{1,ijk} \\ \varepsilon_{2,ijk} \end{bmatrix} \sim N_2(\mathbf{0}, \boldsymbol{R})$$

where *m* is the response index such that *m* equals 1 or 2 when the response refers to acetone ($y_{1,ijk}$) or hexane ($y_{2,ijk}$) extractives, respectively; $d_{1,ijk}$ and $d_{2,ijk}$ are dummy variables that alternately adopt the value 1 or 0 when *m* = 1 and *m* = 2; and **R** is the variance-covariance matrix of the distribution of residuals. **R** can be factorized as σ^2_1**WCW**, where **W** is a diagonal matrix of the variance weights with elements w_m and **C** is a correlation matrix where off-diagonal elements ρ are identical and represent the within-disc error correlation (Pinheiro and Bates, 2000). A constant weight corresponding to the variance function $g(w_m) = \delta_m$ is compulsory in SUR, δ_m being a parameter to estimate. The first w_m element is conventionally set to 1 so that $\sigma^2_m = \sigma^2_1 \cdot \delta_m$. Complementarily, other variance functions depending on some variables can be used when heteroscedasticity is detected, as it was seemingly the case. In preliminary tests, the function $g(w_m) = \delta_{1,m} \cdot \exp(\delta_{2,m} \cdot DINC_{ijk})$ proved adequate to correct for non-constant variances. All parameters can be estimated through the maximisation of the likelihood function.

SUR admits as many models as whished. Although our primary objective was to deal with extractive concentrations, we took advantage of SUR flexibility to test the hypothesis that at least a part of the unaccounted variability at the disc level may be shared between extractive concentration and *Ss_above* and *xD*. In order to accomplish this objective, *Ss_above* and *xD*, let them be $y_{3,ijk}$ and $y_{4,ijk}$, were first separately modelled following the aforementioned procedure. The resulting models were

$$y_{3,ijk} = \eta_0 + \eta_1 \log\left(DINC_{ijk}\right) \cdot DBH_{ij} + \varepsilon_{3,ijk} \quad (4)$$

$$y_{4,ijk} = \vartheta_0 + \vartheta_1 DINC_{ijk} + \vartheta_2 \log\left(DINC_{ijk}\right) + \vartheta_3 DINC_{ijk} \cdot DBH_{ij} + \varepsilon_{4,ijk} \quad (5)$$

where $\boldsymbol{\eta}$ = (η_0, η_1) and $\boldsymbol{\vartheta}$ = (ϑ_0, ϑ_1, ϑ_2, ϑ_3) are estimable parameters and $\varepsilon_{3,ijk}$ and $\varepsilon_{4,ijk}$ are the errors terms, each of them independent and identically distributed according to N(0, σ^2_3) and N(0, σ^2_4), respectively. Model in Eq. 3 was then extended so that

$$\boldsymbol{y_{m,ijk}} = \begin{pmatrix} e^{\boldsymbol{\beta}\left(\mathbf{1},DINC_{ijk}\right)}, \\ e^{\boldsymbol{\gamma}\left(\mathbf{1},DINC_{ijk}\right)}, \\ \boldsymbol{\eta}\left(\mathbf{1},\log\left(DINC_{ijk}\right)\cdot DBH_{ij}\right), \\ \boldsymbol{\vartheta}\left(\mathbf{1},DINC_{ijk},\log\left(DINC_{ijk}\right),DINC_{ijk}DBH_{ij}\right) \end{pmatrix} \boldsymbol{d_{m,ijk}} + \left(\boldsymbol{\varepsilon_{m,ijk}}\right)\boldsymbol{d_{m,ijk}} \qquad (6)$$

$$\boldsymbol{y_{m,ijk}} = \begin{bmatrix} y_{1,ijk} \\ y_{2,ijk} \\ y_{3,ijk} \\ y_{4,ijk} \end{bmatrix} \qquad \boldsymbol{d_{m,ijkl}} = \begin{bmatrix} d_{1,ijk} \\ d_{2,ijk} \\ d_{3,ijk} \\ d_{4,ijk} \end{bmatrix} \qquad \boldsymbol{\varepsilon_{m,ijkl}} = \begin{bmatrix} \varepsilon_{1,ijk} \\ \varepsilon_{2,ijk} \\ \varepsilon_{3,ijk} \\ \varepsilon_{4,ijk} \end{bmatrix} \sim N_4(\mathbf{0},\boldsymbol{R})$$

Developments for the extended **R** matrix are similar to those corresponding to model in Eq. 3. In other words, the variance function was kept the same for all models, allowing for different parameters over *m*, whereas the **C** matrix becomes

$$\boldsymbol{C}(m,m') = \begin{bmatrix} 1 & \rho_{1-2} & \rho_{1-3} & \rho_{1-4} \\ & 1 & \rho_{2-3} & \rho_{2-4} \\ & & 1 & \rho_{3-4} \\ & & & 1 \end{bmatrix}$$

where the off-diagonal elements $\rho_{m\text{-}m'}$ represent the between-model within-disc residual correlation. Should our hypothesis hold, significantly non-null correlations will arise between errors from groups *m* = 1-2 and *m* = 3 or m = 4. This can be tested through the statistic $t = \rho\left((n-2)/(1-\rho^2)\right)^{1/2}$, which has a Student's t-distribution with *n* - 2 degrees of freedom under the null hypothesis of complete independence, *n* being sample size (Rahman, 1968).

Given the nested data structure, persistent correlations between observations from the same tree and/or treatment may exist. These correlations can be considered through a mixed-model approach. Random intercepts $u_{m,i\text{-}j}$ were included in the four models at the tree and treatment levels. For each level, random effects were assumed to be normally distributed such that $\boldsymbol{u}_{i\text{-}j} \sim N_4(\mathbf{0}, \mathbf{G}_{i\text{-}j})$, where $\mathbf{G}_{i\text{-}j}$ is the variance-covariance matrix. The AICs resulting from these fits were compared with those from the fixed-effect models.

All calculations were carried out with package nlme (Pinheiro et al., 2015) in R (R Core Team, 2015).

4 Results

4.1 Knot extractives determination

The lowest hexane concentration was 0.13 % of dry dust observed for S1.2 tree knots situated at 935 cm above ground, while the largest hexane concentration was 6.9 % calculated for loose knots of C1.2. The lowest acetone extractive concentration was 1.02 % determined for C3.2 tree knots situated at 665 cm while the highest acetone concentration was 34.1 % in loose knots of M1.1. The results displayed on Figure 1 show that extractives concentrations in acetone were far larger than concentrations in hexane, around tenfold over.

4.1.1 Knot extractives in the living crown

For all tees, the knots from the top of the stems (i.e. young knots) contained the lowest extractive concentrations. Then concentrations increase according to the DINC. This was very conspicuous for the acetone extractives while important noise blurs this trend for hexane extractives (Figure53). The largest hexane extractive contents occur for trees sampled in the medium schedule and secondarily for trees from the dynamic schedule. The largest acetone extractive contents occur in the medium schedule which has the trees with the longest crowns (Table 2). This latter trend shows similarities with the vertical profile of maxima branch diameter into a whorl (xD). This suggests a strong correlation between at least acetone concentrations and whorl branch diameters.

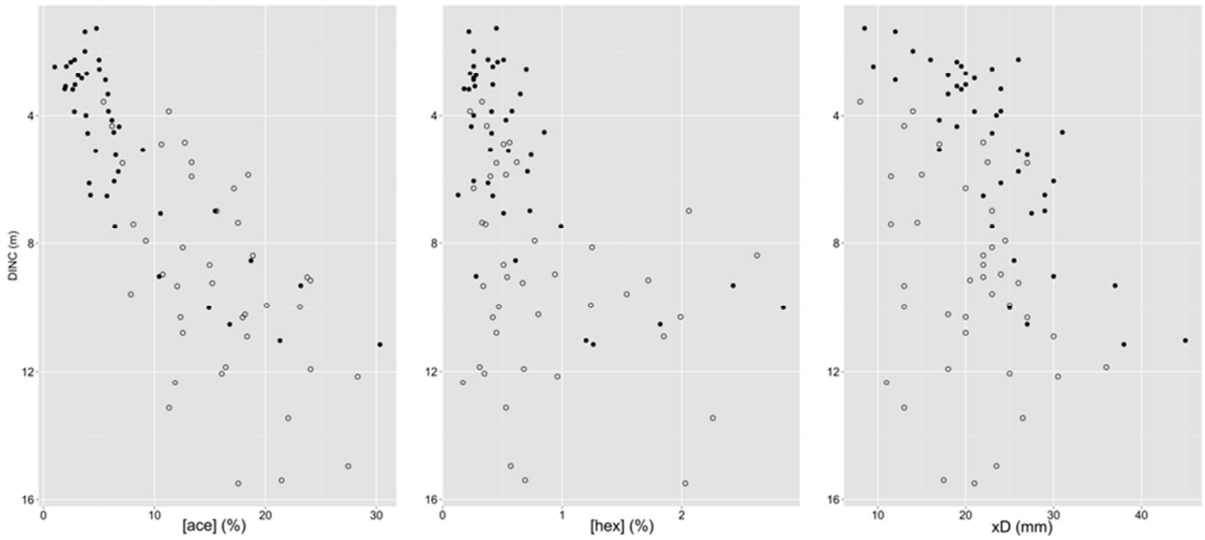


Figure 53 : Concentrations of acetone extracts (left), hexane extracts (centre) and xD (right) versus the depth inside crown (DINC). Data collected in discs above the base of the crown (CB) are in dots while those below CB are in circles.

4.1.2 Extractive concentrations in loose knots

The loose knots occur below the living crown except M1.1 tree which contained a loose knot at the base of the living crown. For each disc containing those dead knots, we could compare the

concentrations of extractives between the tight portion and the loose portion. It turns out that the loose zones contained larger concentrations of extractives, especially acetone extractives, than the corresponding tight zone (Figure 54a). The concentrations of hexane extractives were much lower than acetone extractives but the hexane extractives were quite similar between the loose and the tight portions except for two samples of loose zone considered as outliers (Figure 54b).



Figure 54 : Concentrations of acetone extracts in a) and hexane extracts in b) in the loose part and tight part of the knots which exhibit both parts.

4.2 Modelling the knot extractives in the living crown

Convergence problems prevented us from including random effects on the extended model, both at the tree and the treatment level. This is not surprising, provided that these random effects did not substantially improve the fit of any of the submodels individually. For example, when considering the tree level, the AIC without/with random effects for those models was: concentration (acetone) 196.2/209.2; concentration (hexane) 14.2/-9.5; xD 231.9/239.1; Ss_above 2.4/2.4. This lack of improvement suggests a negligible unnoticed variability at the tested levels.

All models exhibited an heteroscedastic behaviour. The above mentioned variance function $g(w_m) = \delta_{1,m} \cdot \exp(\delta_{2,m} \cdot DINC_{ijk})$ was ultimately used in the definitive model, as the one that reduced heteroscedastic pattern of standardized residuals to a minimum. Otherwise, no trend of residuals over the different explanatory variables or responses was to be found.

The concentrations of acetone and hexane extractives can be accurately accounted for by the same functional form. Given that only data from knots within the living crown are used, an increasing pattern of extractive concentration along depth into crown was observed. In our case, an exponential

model was enough to represent this concentrations trend. DINC proved highly efficient as an explanatory variable, no other available variables being needed to explain the response. This variable seems to summarize most of the between- and within-tree information in regard to concentration of extractives. A summary of parameter estimates, their standard errors and variance terms is shown in table 4.

m	parameter	estimate	standard error	p-value
1	β_0	0.7100	0.1203	< 0.0001
	β_1	0.2154	0.0198	< 0.0001
	$\delta_{1,0}$	1	-	-
	$\delta_{1,1}$	0.1905	-	-
	σ^2_1	0.7545	-	-
2	γ_0	-1.4152	0.1441	< 0.0001
	γ_1	0.1529	0.0339	< 0.0001
	$\delta_{2,0}$	0.0803	-	-
	$\delta_{2,1}$	0.2604	-	-
3	η_0	12.1353	0.9160	< 0.0001
	η_1	0.3450	0.0300	< 0.0001
	$\delta_{3,0}$	2.6762	-	-
	$\delta_{3,1}$	0.0758	-	-
4	ϑ_0	-0.3466	0.0645	< 0.0001
	ϑ_1	0.5166	0.0614	< 0.0001
	ϑ_2	-0.8987	0.1694	< 0.0001
	ϑ_3	0.0086	0.0011	< 0.0001
	$\delta_{4,0}$	0.0917	-	-
	$\delta_{4,1}$	0.2124	-	-

Table 4 : Maximum likelihood estimates of parameters and variance components of the extended model.

According to our model, concentration of acetone extractives is expected to be notably higher than that of hexane extractives. As an example, a 10-fold difference is predicted when DINC = 10 (acetone, 17.5 %; hexane 1.2 %). A significant positive residual correlation of almost 0.4 between both extractive types was found (table 5), which evidences the need for a simultaneous estimation approach such as SUR. This means that when the observed values were larger than predicted values for acetone concentrations at one disc, it was the same for the observed values of hexane concentrations at the same disc.

	estimate	t	p-value
$\rho_{1,2}$	0.3879	2.6948	0.0051
$\rho_{1,3}$	-0.1607	-1.0425	0.1516
$\rho_{1,4}$	-0.0688	-0.4416	0.3306
$\rho_{2,3}$	-0.2051	-1.3418	0.0935
$\rho_{2,4}$	-0.2351	-1.5488	0.0646
$\rho_{3,4}$	0.5539	4.2599	< 0.0001

Table 5 : Estimated residual correlations and inference based on the t statistic, which has Student's t-distribution with n - 2 degrees of freedom under the null hypothesis that ρm,m' = 0.

The model did not reveal any significant residual correlation between extractive concentration and ss_above and xD while a significant residual correlation between these latter was expectedly high (r=0.55, table 5). Thus, the maximum branch diameter (xD) or the sum of section areas of all branches inserted in- and above every disc (Ss_above) was not a significant variable to explain the profile of extractives concentrations once DINC was entered in the model. The profile of xD (or Ss_above) was very dependent on DINC as well but with a different function resulting of non-parallel profiles: for instance the profile of concentrations was more concave (exponential function) than the xD profile more convex (Figure 55).

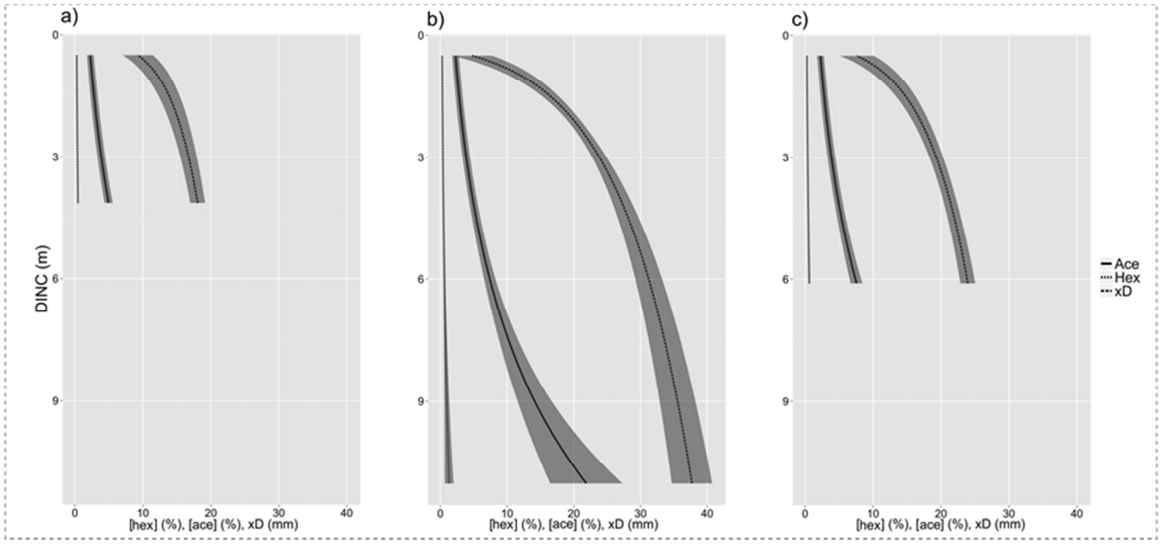


Figure 55 : Predictions (mean and standard deviation of the mean) of concentrations in hexane extracts (left curve), acetone extracts (centre curve) and of xD (right curve) versus DINC for a co-dominant tree from the control stand C2.2 (a); for a dominant tree from the medium schedule M1.1 (b); for a dominant tree from the dynamic schedule S1.2 (c).

4.3 Identification of the knot extractives

The hexane extracts contained almost exclusively terpenes with dehydrojuvabione and juvabione being the dominant compounds. Additionally, an unidentified terpene was present and small

amounts of other terpenes including epimanool, tumerone, farnesol, eudesmol, nerolidol and isopimaric acid were detected in some samples.

The acetone extracts contained mainly lignans with secoisolariciresinol being the dominant one. The other lignans were hydroxymatairesinol, lariciresinol and traces of matairesinol and pinoresinol. These compounds were not always present in the investigated fir trees, probably due to strong intra specific variation. The other molecules extracted with acetone were terpenes probably remained in wood after extraction by hexane. In addition acetone extracted sugars in the knots recovered from the top of the trees. Few unidentified substances were also present in those knots.

5 Discussion

5.1 About our methodology

Piispanen et al., (2008) sampled discs on systematic 4m intervals starting at 4m from the soil not considering the intra-tree variations. We consider that our sampling took more into account the characteristics of each tree. Indeed, we sampled the discs firstly at crown base and at the first living branch insertion and we sampled then discs in the living crown and also below. It turned out that this was a relevant sampling strategy. However our sampling leads to a deficit of discs under the crown base, preventing a relevant modelling under the crown base. Moreover, we analysed the vertical profile of all lignans pooled together in the "acetone extractives" as a whole and we did not analyse the individual lignans as Piispanen et al., (2008) did. They showed that the vertical trends of individual lignans and the sum of whole lignans in spruce knots are similar. We assumed thus that the vertical distribution of each of the different lignans was the same for *Abies alba* as it was for Norway spruce. This deserves to be demonstrated.

5.2 About the occurrence of lignans in the fir knot extractives

Extractives are biosynthesised in trees during two distinct events, either when sapwood is transformed into heartwood, or when wood is injured. Lignans occur in high concentrations in softwood knots while heartwood does not contain these substances or only in low concentrations (Willför et al. 2003a; 2003b; 2004a; 2004b). When softwoods are injured, they form traumatic resin canals. Lee and Eom (1988) reported the presence of traumatic canals only in the compression wood of pine branch, and Nagy et al (2000) found that traumatic canals are associated with parenchyma cells with high polyphenol concentration, and that epithelial cells of traumatic ducts exhibited phenylalanine activity. The latter is a key enzyme involved in lignification and polyphenol synthesis. Finally, Harworth and Kelly (1937) and Holmbom et al., (2008) showed that "callus resin" secreted by softwoods (spruce, pine, larch and Douglas fir) after wound and "normal resin" are chemically

different. The latter contained exclusively resin acids while the former contained lignans in addition to resin acids. Thus, it may be concluded that fir knots contain wound resin rather than normal resin since most fir species do not form normal resin ducts but only traumatic ducts in case of injuries. Altogether, this information supports the assumption that branches and knots are always under stressful environment, which requires structural and chemical adaptations (Burgert and Jungnil, 2004; Jungnikl et al., 2009; Lemoine et al., 2002; Müller et al., 2006; Spicer and Gartner, 1998). Furthermore, softwood knots and branches form compression wood on their undersides and one characteristic feature of compression wood is the high proportion of lignin within the thick cell wall of tracheids (Timell, 1982). Recently, Villalobos et al., (2012) evidenced a high transcriptional level of both lignan and lignin biosynthesis pathways in compression wood of maritime pine. Thus, lignans of knots may parallel lignin biosynthesis in compression wood.

5.3 About the within-tree variation

5.3.1 A conspicuous vertical profile of knot extractives in the living crown

We focused the modelling of the extractive concentrations only on knots present in the living crown. The general trend indicated that concentrations increased from the tree tip consisting of young knots toward the crown base irrespective of tree attributes (size or age) or silviculture conditions (social status or stand density) with the best independent variable being DINC. Our results confirm those gained on *Picea abies* by Piispanen et al., (2008). We did not establish a direct relation between knot extractive content and the diameter of the corresponding branch. However, branch diameter and its position along the living crown were evidenced to be dependent as our modelling showed. Thus it may be concluded that a possible indirect effect of branch diameter on knot extractive content may exist but it was by far lower than the DINC effect. Piispanen et al. (2008) did neither evidence a direct effect of branch diameter on knot extractive concentration. Furthermore, Ss_above was expected to be a better independent variable than xD, integrating more the photosynthetic potential of all the living crown above a given disc. That could not be proved and Ss-above effect was far below the effect of DINC once again.

Reasons for lower extractives in the highest knots of trees are likely due to their young age. Thus they probably consisted mainly of sapwood and the detection of non-structural carbohydrates in the youngest knots corroborates our hypothesis. Thus, extractive biosynthesis has probably not yet started in the youngest fir branches. Indeed, Kyker-Snowman and Wilson (1988) found that heartwood is formed in pine, hemlock or spruce branches when they are 5-8 year-old. In addition, these young knots probably do not face so much stress due perhaps to the high flexibility of the related branches. Thus, these knots formed low traumatic resin. Indeed, Klein (1992) stated that

resin accumulation in knots of young fir branches (12 -15 years old) is very low and restricted to the pith region.

On the other hand, the base of the living crown consists of larger, older and more mature branches. Thus, these branches and the knots attached to them probably formed more heartwood. Kramer et al., (2014) stated that heartwood proportion increases in branches that are not exposed to sunlight in redwood such as those in the lower-crown zone. Klein (1992) also found a large accumulation of resin in those branches (25 - 30 years old). Moreover, the crown-base-knots are larger and are oriented horizontally compared to those in the tree tip which are more fastigiated according to a pattern commonly found in most conifers (Dahle and Grabosky, 2009 ; Duchateau et al., 2013; Hein et al., 2007, 2008; Kantola et al., 2007). Thus, these knots contained probably more compression wood on their underside half. Interestingly, Stokes and Berthier (2000) found that compression wood in the stem forms earlier and higher proportion of heartwood than side wood and opposite wood. Analogy may be established with knots located at the crown base which may have formed more heartwood, which in turn may contain more extractives compared to knots located in the tree tip. In addition, Shigo (1985) stated that there is often a gap in the underside of the branch collar, especially the oldest and the largest ones. This means that there is an easy entrance for pathogens, air, oxygen, and other abiotic factors that usually stimulate extractive synthesis (Ramakrishna and Ravishankar, 2011; Sharma et al., 2012). However, Willför et al., (2003a, 2003b) reported less lignans in the compression wood and more terpenes than in the opposite and side woods for a given knot of either Norway spruce or Scots pine. Further studies on within-knot extractive may elucidate the variation between compression side and opposite woods in fir species.

5.3.2 High extractives content in the loose knots

Although we did not incorporate loose knots in our model we can give some hypothesis to explain the highest concentrations occurring in these knot parts. Indeed for almost all trees, the highest amounts of extractives were observed in their loose knots (18.3 to 35.9 % of dry mass) except in trees C2.1 and S2.2 for which we did not sample loose knots. We lacked information on the age, diameter and maturity of the branches attached to those loose knots. The branch death could have occurred as a natural senescence or be caused by pathogenic attacks that accelerated the branch self-pruning. Branch could have also been artificially pruned, broken by animals, wind or canopy collisions. In all these cases, the knot at this branch base may have form a protection zone characterised by high resin contents to allow separation of the loose branch from the living part of the stem (mainly the sapwood) (Aufsess, 1984; Klein, 1992; Shigo, 1985).

5.4 About the between-tree variation: a silvicultural influence on knot extractives

5.4.1 Lessons from modelling

The prominent lesson from our modelling is that the larger is DINC the larger are the extractive concentrations. This means that maximal concentrations occur for trees with longer living crowns. The inclusion of DBH or any other tree descriptor, thinning schedule or social status in the model was not possible. In fact, once DINC entered in the model, the effects of the silviculture and the social status were not significant. These effects hold only indirectly through the crown. This can be schematized by the following: silviculture influences environmental growth conditions and competition between trees. And tree competition controls the social status. Thus, both silviculture and social status control the crown length which in turn determinates the maximum knot extractive concentrations.

5.4.2 Between-plot variability

Trees sampled in the control plot exhibited the lowest knot extractive concentrations compared to trees from medium and dynamic plots. Control trees suffered from lack of resources which probably constrains these trees to allocate carbon to height growth (primary growth) rather than to radial growth. Indeed, the slenderness illustrates the instability of the control trees (average H/DBH = 94.98±25.71) compared with those from medium and dynamic plots (71.02± 14.92 and 71.65±7.45, respectively) (Table 2). On the other hand, trees may allocate carbon to the biosynthesis of cell wall components (cellulose, hemicellulose and lignin) instead of storage material for a later extractive biosynthesis. Furthermore, Watt et al., (2009) highlighted the reduction of resin pockets in guyed pine trees (*Pinus radiata*) and they attributed it at least to tree sway. Thus, in the highly dense stand, living crowns were likely protected by the neighbours from swaying and this is an additional possible explanation of the lowest extractive concentrations in the knots of these fir trees.

Thinning creates a new environment for the remaining trees which have more available resources and light and also more place. They are thus more subjected to wind stress and swaying, and this situation may induce more resin accumulation and traumatic resin pockets frequency (Klein 1992; Watt et al. 2009). Moreover, the acclimation to the mechanical stimuli results in a pronounced radial growth in the stem to increase the tree stability (Table 1; Kantola et al., 2007; Lundqvist and Elfving, 2010) and likely in the branches as well (Lowell et al., 2014; Newton et al., 2012; Watt et al. 2005). Telewski and Jaffe (1986) evidenced that the production of a high level of ethylene is the signal that induces radial growth. Ethylene is implied not only in cambial activity but also in heartwood formation (Shain and Hillis 1973a), compression wood formation (Telewski, 1990) and traumatic “phenolic” resin production (Holmbom et al., 2008; Hudgins and Franceschi, 2004; Nagy et al., 2000).

Altogether, it can be argued that the more the branch is subjected to wind swaying, the more it produces ethylene and then extractives. This may explain the richness of knots from thinned plots compared to knots of unthinned plot.

This reasoning predicts more extractives in the trees in the most dynamic schedule. Surprisingly, the above prediction was not totally supported since the knots of the trees sampled in the intermediate treatment, especially the two dominant ones, contained more extractives than those from the dynamic schedule. This is not totally surprising since these two dominant trees had the longest crowns of our sample and, according to our modelling, these trees must have the largest extractives concentrations. By the way, we already noticed that the medium schedule gives very close annual increments than the dynamic schedule (Table 1, Table 2). In fact what is surprising is not the high extractive concentrations in intermediate schedule which follow the pattern highlighted by our model but the very similar growth of the trees in the two thinned plots. This is maybe due to the shade tolerant behaviour of Silver fir. This deserves confirmation in other Abies experimental stands. One can conclude for the moment that thinning promotes high growth increments and concentrations of knot extractives up to a certain threshold of thinning intensity that remains to be quantified.

5.4.3 Within-plot variability

Social status of the fir trees within a stand affects also knot extractive contents. Suppressed fir trees were sampled only in the control plot because thinning results in producing vigorous trees and eliminating stunted ones even for a shade-tolerant species as Silver fir. Living crowns of suppressed trees are smaller with only young branches which contain small heartwood proportion. Maximal extractive concentrations do not reach the maximum levels of longer crowns observed in intermediate and dynamic schedules. Furthermore, suppressed trees experience lack of sunlight while they are in the shade of the neighbouring trees. Conversely, dominant trees take advantage of large available radiation. However they are under more wind loads and sway more (Sellier and Fourcaud, 2009). For the same reasons mentioned above, it might be supposed that suppressed trees allocate more photosynthetates for height growth than for radial growth because of phototropic stress (see H/DDH of C2.2, C3.1 and C3.2 in table 2) (Cameron and Thomas, 2008) while dominant fir trees form more traumatic resin enriched by phenols because of swaying. Moreover, Shain and Hillis (1973b) stated that dominant pines produce more ethylene in case of injury than suppressed trees. Thus the later contained less polyphenols than the former.

6 Conclusion and perspectives

Wood deals with several environmental perturbations to accomplish its mechanical, hydraulic and storage functions within tree. Knotwood may likely experience more challenges and it can be supposed that trade-offs may exist between biomass accumulation for growth, compression wood formation for biomechanical purposes and secondary metabolites synthesis for defence. This functional balance may change along with branch age and thus crown position.

To our knowledge, this is the first study focused on modelling knot extractive concentrations according to the within- tree position and between-tree variability. By modelling, we obtained a quite good representation of the within-tree variability in the form of a vertical trend of extractive concentrations, which clearly shows an increasing trend from tree tip to crown base. This model was strongly depending on DINC, meaning that the largest maximal concentrations were in the trees with the longest living crowns. Interestingly, Piispanen et al. (2008) evidenced that within the living canopy, the thickest knots of a whorl contained lower concentrations of lignans in comparison with the smallest knots of the same whorl. We did not separate the knots of the same disc, but a more in-depth inspection of the variability between knots within a branch whorl would allow confirmation of this observation.

The modelling of the vertical profile should be carried out on other species, especially species with well distinguishable discoloured heartwood such as larix, Douglas fir, and pine species. Extractives occur mainly in the heartwood part of the stem and of the branches probably as well. We did not take care of the heartwood presence in our knots which is quite difficult to distinguish since *Abies alba* has not a coloured heartwood. But this is indisputably a major factor of the vertical profiling of extractive concentrations since the pattern of extractives in fir knots fits exactly that of heartwood proportion in branches established for Scots pines (Mäkelä and. Vanninen, 2001). Moreover, Stokes and Berthier (2000) evidenced that compression wood forms earlier heartwood while Willför et al. (2003a, 2003b) found that compression wood of knots contains low extractives than opposite wood. So it is important to understand the relation between heartwood formation, compression wood occurrence and knot extractives. Heartwood formation in the branch has been tackled in rather a few species (Nakaba et al., 2012). Thus we need a better understanding of the very starts of the heartwood formation in both branch and knot since Willför et al. (2003a, 2003b, 2005b) evidenced a steep decrease of the lignan concentrations when passing from the encased knot to the branch outside.

The current study highlighted the influence of silvicultre treatments of knot extractives. Branch diameter, thus knot diameter, is dependent on both position of the branch within the tree canopy

and the position of the tree within the stand. As seen above, at a certain point, producing larger branches is not accompanied by higher knot extractive contents in silver fir. Thus, one may ask if there is an optimal threshold of branch diameter for optimising extractive contents. Indeed, Piispanen et al., (2008) reported that the fertilization stimulated the stem and branches radial growth (in the poorest stand) but not the knot extractive contents in Norway spruce. It is known that fertilisation promotes all the crown parts with an environment that do not change (no additional sway, enlightening, …) while thinning (i) promotes preferentially the lower part of the crown suddenly more enlightened, the tree top taking advantage of new soil resources and (ii) induces more swaying. These two different silvicultural interventions may result in different changes in extractives concentrations that could be further studied to better understand the extractives determinism on the same species and in the two species that have different shade tolerance.

This may help forest managers in order to better providing wood based industries. Indeed, the lowest part of the trunk is knot-free and should serve for high-added value products while the upper part of the trunk corresponding to the living crown is used for wood-based boards and pulp industries. The latter reject knots as waste material that green chemistry may use for extraction of valuable fine chemicals. Green chemistry may also integrate other forest exploitation by products such as leaves, branch base and bark (Backlund et al., 2014; Turley et al., 2006).

Acknowledgement

We warmly thank Charline Freyburger, Pierre Gelhaye, Emmanuel Cornu, Marwen Fatnassi, Frédéric Bordat and Loïc Dailly for field technical assistance, Fleur Longuetaud and Frédéric Mothe for management of sampling and field measurement, and the ONF RDI department “Pôle de Dole” (Dole) leaded by Bruno Chopard who puts at disposal the experimental design and helped in felling and logging the trees. The project was supported by the ONF-INRA ModelFor contract. The first author obtained a doctoral grant from the Institut National de la Recherche Agronomique (CJS no. 12-00006889). The UMR 1092 LERFOB and EA4370 LERMAB are supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investissements d’Avenir” programme (ANR-11-LABX-002-01, Lab of Excellence ARBRE).

Synthèse du chapitre 3

Les principales molécules identifiées dans les extraits nodaux du sapin sont des terpènes (la juvabione et la dehydrojuvabione) et des lignanes (le secoisolaricirésinol, l'hydroxymatairésinol, le laricirésinol et l'isolaricirésinol)

Les concentrations observées d'extractibles nodaux indiquent une variabilité intra-arbre. D'une part, les concentrations augmentent depuis la cime de l'arbre jusqu'à la base du houppier vert. D'autre part, les nœuds morts situés en dessous du houppier vert contiennent les plus fortes concentrations d'extractibles nodaux.

Le modèle appliqué aux concentrations d'extractibles des nœuds dans le houppier vert a permis de confirmer ce profil vertical des concentrations chez le sapin pectiné. Plusieurs variables ont été testées pour expliquer la variation verticale des extractibles nodaux telles que le diamètre maximal des branches d'une même rondelle. Mais la seule variable qui a permis d'expliquer ces variations est la position des nœuds dans le houppier. Ainsi, les concentrations sont minimales pour les nœuds situés en haut de l'arbre et augmentent en se dirigeant vers la base du houppier vert. Par conséquent, plus un houppier est long, plus la concentration d'extractibles est élevée. Or, c'est bien les interventions sylvicoles qui conditionnent la longueur du houppier. En effet, l'éclaircie d'un peuplement forestier permet d'éliminer les arbres les moins prometteurs (arbres dominés) pour offrir les meilleures conditions de croissance aux arbres « d'avenir ». Ces derniers disposant de plus de ressources et d'espace développent donc leurs houppiers et augmentent leurs diamètres (tronc et branches). Par conséquent, même si l'effet direct de la densité du peuplement et du statut social de l'arbre n'a pas été mis en évidence par le modèle, ces paramètres ont un effet indirect par le contrôle de la longueur du houppier.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Au terme de ces travaux, plusieurs conclusions peuvent être établies en réponse aux objectifs visés par le projet de thèse. L'étude interspécifique des extractibles nodaux a permis de mettre en évidence les variabilités quantitatives et qualitatives importantes entre les différentes espèces étudiées. Ces résultats confortent ceux existants au début de notre projet pour des essences résineuses telles que les épicéas, les pins, les mélèzes, le douglas et les sapins. Par ailleurs, les résultats confirment la richesse des nœuds en extractibles pour plusieurs essences jusqu'alors non étudiées (chêne, robinier, noyer, merisier, aulne, frêne, charme, cèdre de l'Atlas, pin maritime, if, ginkgo biloba, cyprès chauve, métasequoia, houx, buis et châtaignier). Ces travaux ont mis en lumière la biodiversité des molécules extractibles présentes dans ces différentes espèces et parties de l'arbre. Ainsi les (nor)lignanes sont particulièrement présents dans les nœuds des résineux ; les stilbènes sont caractéristiques du bois de pin. Quant aux flavonoïdes, ils sont majoritairement présents chez les feuillus, à l'exception du mélèze et du douglas qui en contiennent des quantités notables. Toutefois, étant donné qu'un seul arbre a été échantillonné pour chacune des vingt-trois espèces, des études complémentaires de variabilité intra-spécifique sont nécessaires pour la validation des résultats inédits pour les essences d'intérêt telles que les chênes, le châtaignier, le noyer, le robinier, le merisier, l'aulne, le cèdre, l'if.

L'étude intra-spécifique, intra-arbre, focalisée sur le sapin pectiné ayant poussé selon différentes conditions de croissance a permis d'établir le profil vertical des concentrations en extractibles nodaux. Celles-ci sont minimales en haut de l'arbre et augmentent en direction de la base du houppier vert. Toutefois, les nœuds morts localisés sous le houppier vivant sont les plus riches en extractibles. D'autre part, les résultats démontrent l'influence des interventions sylvicoles sur les concentrations en extractibles nodaux. Ainsi, les arbres issus des peuplements denses sont particulièrement pauvres en extractibles probablement par manque de ressources lumineuse et nutritive, alors que les arbres issus des peuplements éclaircis ont des concentrations plus élevées dues au développement de leurs houppiers.

1 Pourquoi les nœuds sont-ils riches en extractibles ?

Un des objectifs de ce projet était de comprendre les raisons de la richesse des nœuds en extractibles comparativement au bois du tronc, surtout le duramen réputé plus riche en extractibles que l'aubier. Les nœuds occupent une position primordiale mais délicate pour la croissance des arbres (voir chapitre 1). Les variations de la composition chimique (quantitative et qualitative) entre les nœuds et le duramen et/ou l'aubier d'un même arbre sont les signes d'un métabolisme tout à fait singulier se déroulant dans le bois des nœuds. Elles reflètent certainement la nécessité de satisfaire

plusieurs fonctions. Les raisons de la richesse chimique des nœuds ne sont pas totalement élucidées, et seules des hypothèses peuvent être formulées en faisant l'analogie avec la formation et les rôles attribués aux extractibles dans le bois du tronc, évoqués dans le premier chapitre de ce manuscrit. Ces hypothèses sont liées à la réponse des branches et des nœuds à des stimuli physiologiques (pour la duraminisation du bois), biologiques (réponse à une infection) et mécaniques (induction par la formation du bois de réaction).

1.1 Synthèse lors de la duraminisation

La synthèse des extractibles se déroule « normalement » lors de la transformation de l'aubier mature en duramen. Plusieurs éléments déclenchent cette transformation tels que la baisse de l'humidité du bois, la production de l'éthylène et l'altération de la respiration des cellules de parenchyme (Huang et al., 2013 ; Magel, 2000 ; Nelson, 1978 ; Shain and Hillis, 1973a ; Taylor et al., 2002). Même si aucune étude ne s'est intéressée à ce dernier événement dans les nœuds, les deux premiers s'y produisent, et peut être même de manière plus accentuée que dans le tronc. D'une part, la déshydratation doit être davantage accentuée dans le bois des nœuds étant donné leur faible conductivité hydrique, et ceci pourrait expliquer une duraminisation précoce des nœuds et des branches ainsi que l'accumulation des extractibles. D'autre part, Lev-Yadun and Aloni (1990) ont observé que les flux des hormones (auxine, éthylène, etc.) sont interrompus dans la zone de jonction entre le tronc et les branches et s'y accumulent. Il est donc raisonnable de suggérer que l'éthylène dans les nœuds induit leur duraminisation prématurée et accentuée. Ceci est conforté par les observations du début de duraminisation des branches chez certaines essences (e.g. lorsque les branches âgées d'un an chez l'épicéa rouge (Kyker-Snowman and Wilson, 1988)). De plus, Stokes and Berthier (2000) ont constaté que le bois de compression forme de manière précoce du duramen, et ce en plus grande proportion que le bois opposé et le bois de côté.

La duraminisation et la synthèse des extractibles dans le tronc se caractérisent par la diminution et la disparition des réserves : l'amidon, le sucrose, les matières grasses, etc. D'après les résultats obtenus pour les nœuds des arbres étudiés pendant cette thèse, les acides gras sont soit absents du bois de nœuds, soit présents en plus faibles proportions comparativement au duramen et à l'aubier. Concernant les carbohydrates, c'est l'aubier du tronc qui en contient les plus grandes concentrations, le duramen n'en contenant que peu ou pas du tout. Etant donné que lors de l'échantillonnage des nœuds, leur duramen et leur aubier n'ont pas été séparés, il est possible de supposer l'avancement de duraminisation dans les nœuds. L'exemple le plus illustratif est celui du pin maritime dont les nœuds jeunes sont chimiquement similaires à l'aubier de cet arbre (présence d'acides gras et de sucres) alors que les autres nœuds sont similaires à son duramen (présence de lignanes et de

stilbènes) ; la duraminisation des nœuds jeunes n'a donc pas débuté. Les quinze sapins échantillonnés dans la troisième campagne démontrent aussi la disparition des sucres en fonction de l'âge des nœuds au profit de la synthèse des extractibles.

1.2 Synthèse lors de la formation du bois de réaction ?

L'induction du bois de réaction est souvent attribuée à la perception d'une stimulation mécanique ou lumineuse (Tocquard et al., 2014) ; or dans le cas des branches les deux stimuli sont combinés, d'où une formation permanente de bois de réaction dans les nœuds et les branches. Ainsi, les caractéristiques anatomiques des nœuds sont reliées à la présence de ce bois de réaction qui conditionne aussi les caractéristiques chimiques, du moins pour les polymères structuraux. Une telle réponse des plantes à des stimuli mécaniques est nommée la thigmomorphogénèse. Toutefois, les mécanismes de perception des stimuli et d'induction du bois de réaction au niveau du cambium ne sont pas encore élucidés chez les arbres. Les espèces réactives à l'oxygène et le calcium seraient impliqués dans la perception des stimuli mécaniques (pour une revue voir Tocquard et al., 2014 ; Jayaraman et al., 2014). Les connaissances sur le calcium dans le bois des nœuds sont limitées. Les nœuds du chêne contiennent plus de calcium (1910 $mg.kg^{-1}$) que le duramen (420 $mg.kg^{-1}$) et l'aubier (480 $mg.kg^{-1}$). Les nœuds du pin contiennent entre 700 et 1300 ppm de calcium alors que le duramen présente des concentrations comprises entre 600 et 900 ppm selon la position des échantillons dans l'arbre (Krutul, 1996 ; Krutul and Sacharczuk, 1997).

La production de radicaux libres au niveau des nœuds à cause du mouvement perpétuel des branches a été évoquée par Pietarinen et al., (2006a). La synthèse de grandes quantités d'extractibles dans les nœuds pourrait alors avoir pour rôle de réagir face à cet excès de radicaux libres, grâce à leur propriété antioxydante (Neacsu et al., 2007a, 2007b ; Pietarinen et al., 2006a ; Wijayanto et al., 2015 ; Willför et al., 2003c). Par la suite, une fois les stimuli perçus, les hormones telles que l'auxine, l'éthylène et les gibbérellines sont les principaux éléments qui transmettent le signal au niveau du cambium qui se caractérise alors par une plus forte activité (c'est-à-dire une production plus importante de cellules du côté de l'excentricité due au bois de réaction) (Nelson and Hillis, 1978 ; Ruelle, 2014 ; Telewski, 1990 ; Telewski and Jaffe, 1986, Tocquard et al., 2014). De même, le rôle de l'éthylène dans l'initiation de la duraminisation a été discuté auparavant. Ces éléments servant de signaux pour la formation du bois de réaction et qui s'accumulent au niveau des nœuds seraient alors impliqués aussi dans la synthèse intensive des extractibles.

D'autre part, les caractéristiques chimiques des nœuds sont aussi probablement dues au fait que le bois de réaction est chimiquement différent du bois normal. Dans ce cas, il faut distinguer le bois de compression et le bois de tension. La principale caractéristique du bois de compression est sa

richesse en lignines dont les monomères sont synthétisés par la voie des phénylpropanoïdes. Or, cette même voie métabolique est impliquée dans la synthèse des extractibles de nature phénolique. Il est donc possible que l'expression accentuée de la voie des phénylpropanoïdes pour la production des monolignols de la lignine résulte en parallèle de la formation des lignanes caractéristiques des nœuds de résineux. Ceci est corroboré par la découverte récente de l'altération de l'expression des gènes impliqués dans la lignification et la synthèse des lignanes dans le bois de compression (Villalobos et al., 2012). Selon les auteurs, la lignification accrue du bois de compression génère des radicaux libres et les lignanes seraient synthétisés pour leur pouvoir de captage de ces radicaux. Par ailleurs, il n'est pas exclu que les lignanes soient des intermédiaires dans la synthèse de la lignine (Vander Mijnsbrugge et al., 2000). Le pinorésinol est un lignane reconnu dans la structure de la lignine, il en serait un des nombreux précurseurs (Fengel and Wegener, 1984). Tout comme le syringarésinol qui est un lignane retrouvé dans le bois des feuillus, il serait lié à la présence d'unités sinapyles dans la lignine des feuillus (Davin and Lewis, 2000).

Enfin, le mouvement des branches doit aussi affecter l'assise cambiale qui réagit alors en formant des canaux résinifères traumatiques chez les gymnospermes. Lee and Eom (1988) ont observé des files tangentielles de canaux traumatiques dans le bois de compression dans les branches du pin de Corée. Hudgins and Francheschi (2004) ont prouvé le rôle de l'éthylène dans l'induction de la formation des canaux résinifères traumatiques. Par ailleurs, Nagy et al., (2000) ont détecté une activité de la phénylalanine (PAL), enzyme impliquée dans la voie des phénylpropanoïdes, dans les cellules épithéliales entourant les canaux traumatiques. Enfin, des études ont montré que la résine traumatique est chimiquement différente de la résine normale (Harwoth and Kelly, 1937 ; Holmbom et al., 2008). En effet, cette dernière est constituée de terpènes alors que la résine traumatique contient des lignanes. Ceci expliquerait la richesse des nœuds des résineux en lignanes par rapport à leur aubier et leur duramen, et surtout par rapport aux feuillus qui n'en contiennent pas.

La principale caractéristique du bois de tension est l'apparition d'une couche gélatineuse constituée de cellulose. Ainsi, les hydrolysats du bois de tension sont très enrichis en glucose (75 %), galactose, mannoses, arabinoses et xyloses. Ces sucres sont issus de polysaccharides présents dans la couche G tels que la cellulose, les galactanes, xyloglucanes, arabinogalactanes II et les pectines (Fagerstedt et al., 2014 ; Stevanovic and Perrin, 2009). Ces caractéristiques du bois de tension expliqueraient la richesse des nœuds de feuillus en glucides par rapport aux nœuds des résineux. Il n'est pas exclu que les glucides présents dans le bois des feuillus proviennent des composés glycosilés. Dans ce dernier cas, une hydrolyse enzymatique préalable pratiquée sur les extraits des nœuds du peuplier a permis de séparer les flavonoïdes de leur moitié glucoside (Pietarinen et al., 2006b). Au contraire,

Beritognolo et al., (2002) ont ajouté de la β-glucono-lactone pour éviter l'hydrolyse des glycosides pendant l'extraction.

1.3 Réaction de défense contre les pathogènes

L'induction de la formation des extractibles lors d'une infection a été largement développée dans le chapitre bibliographique. La position stratégique des nœuds vis-à-vis de l'entrée des pathogènes et de l'air, ainsi que la présence de la zone de protection de la branche expliqueraient une surproduction d'extractibles qui ont de multiples propriétés antifongique, répulsives, toxiques et antioxydantes, pour participer à la protection de l'arbre. Selon Gachon et al., (2005) il existe une exclusion mutuelle de certaines familles de composés, c'est-à-dire qu'au cours de l'évolution, les plantes choisissent telle ou telle autre famille de métabolites secondaires (terpènes ou phénols) pour assurer leur défense. C'est un moyen de limiter le coût énergétique de biosynthèse de plusieurs groupes de composés. Ainsi, les résineux semblent donc favoriser la défense par les résines enrichies en lignanes synthétisées par les canaux traumatiques (Holmbom et al., 2008 ; Nagy et al., 2000) alors que les angiospermes semblent favoriser la défense par les composés issus des cellules de parenchyme tels que les flavonoïdes et les tanins, mais aussi par la production de thylles et de gommes. Encore une fois, ces caractéristiques permettent d'expliquer les différences chimiques entre les nœuds des résineux et ceux des feuillus.

Des études approfondies pour caractériser le bois des nœuds sont donc nécessaires pour tester ces différentes hypothèses. La détermination de la composition chimique complète de ce bois en polymères structuraux et en composés simples (minéraux et extractibles) est indispensable. Une caractérisation anatomique est aussi nécessaire pour quantifier les différences avec le bois de tronc. Il s'agira par exemple d'observer s'il y a une augmentation des canaux traumatiques et des cellules de parenchyme dans le bois des nœuds comparativement au bois du tronc dans lequel ceci a été constaté lors d'une blessure (e.g. Eyles et al., 2003 ; Hudgins et al., 2004 ; Lee and Eom, 1988 ; Ruelle, 2014). La compréhension du rôle de l'éthylène est nécessaire étant donnée son implication dans plusieurs processus : activité cambiale, duraminisation, formation du bois de réaction, réponse à une infection. Une caractérisation physique permettra de déterminer la densité du bois des nœuds ainsi que son humidité lors de l'abattage. Une étude de la variabilité intra-nœud nécessite 1) une meilleure séparation et extraction des différentes parties du nœud (duramen, aubier, bois de réaction, bois opposé, bois de côté) qui éclairera l'influence de chacune d'elle sur les extractibles nodaux, et 2) une étude de la duraminisation des branches et des nœuds qui éclairera les raisons de la « chute » des concentrations en lignanes en passant du nœud à la banche (Willför et al., 2003a, 2003b). Une décroissance de la concentration des lignanes dans les nœuds de l'épicéa depuis la

moelle du nœud jusqu'à sa périphérie et une augmentation des terpènes ont été mises en évidence dans le bois de côté (Willför et al. 2005b) mais qu'en est-il pour le bois de compression et le bois opposé des nœuds ? Enfin, des expérimentations induisant un stress supplémentaire au niveau du nœud (inoculer et/ou accrocher des poids au niveau de la base de la branche) devrait provoquer la synthèse supplémentaire d'extractibles et permettrait d'en identifier les causes.

Ces études de compréhension de la formation et du rôle des extractibles dans les nœuds sont indispensables pour pouvoir envisager leur valorisation à une échelle industrielle où il faudra un approvisionnement continu et de qualité.

2 Valorisation industrielle des extractibles nodaux

Plusieurs rôles de la forêt ont été évoqués en introduction, la fourniture de bois en est le principal. Les produits non ligneux sont d'autres services tout aussi importants parmi lesquels ceux issus de la cueillette et de la chasse. L'exploitation des molécules naturelles d'intérêt économique prend actuellement de l'ampleur étant donné le contexte socio-économico-environnemental dans lequel la pétrochimie est progressivement remplacée par la chimie verte. Dans ce contexte, les industries de transformation du bois s'adaptent et innovent pour valoriser l'ensemble de leurs produits et coproduits dans un schéma d'économie circulaire. Les nœuds sont des coproduits de ces industries, et à la lumière des résultats obtenus pendant ces travaux de thèse, il est possible d'envisager des voies de valorisation des nœuds en tant que ressource de plusieurs molécules d'intérêt.

Plus globalement, c'est toute la filière forêt-bois qui sera considérée dans ce processus de valorisation tout en gérant les conflits d'utilisation. En effet, la gestion forestière a pour but principal de fournir d'abord du bois de bonne qualité, et pour cela elle pratique différentes sylvicultures dont les éclaircies des peuplements (ces éclaircies ont aussi un effet positif sur les quantités d'extractibles nodaux). Ainsi, l'exploitation forestière approvisionnera toujours les industries en bois d'œuvre de qualité issu de la bille des arbres dépourvue de nœuds pour des valorisations en tant que matériau technologique, pour le tranchage et le déroulage. La partie du tronc reliée au houppier vert est très noueuse et peu valorisable, elle peut alors servir à prélever les nœuds puisque les extractibles nodaux y sont les plus concentrés. Les arbres des premières éclaircies pourraient aussi servir au prélèvement des nœuds puisque ces arbres sont de faibles diamètres pour des utilisations en bois d'œuvre. Le reste du bois du tronc de faible valeur peut servir à la trituration pour la fabrication des panneaux de particules, mais aussi au bois énergie qui valorise déjà les sciures sous forme de granulés de bois. La valorisation des nœuds nécessitent leur séparation du reste du bois de tronc. Les industries de pâtes et de papier opèrent déjà le tri et la séparation des nœuds du reste du bois à

cause des problèmes qu'ils causent lors du processus de défibrage et de mise en pâte. En effet, ces industries utilisent majoritaire des résineux dont les nœuds sont particulièrement denses, ce qui nécessite une surconsommation d'énergie pour les défibrer. Par ailleurs, la richesse des nœuds en résine pose un problème d'encrassement des machines mais surtout l'apparition de poches de résine sur le papier. Ceci entraine alors une surconsommation de produits chimiques de blanchissement pour dissoudre ces composés et éviter le jaunissement du papier (Fernando et al., 2008). Les nœuds issus de ces industries papetières peuvent donc alimenter les bio-raffineries d'extraction de biomolécules d'autant plus que ces nœuds de résineux sont plus concentrés en extractibles et particulièrement en lignanes.

Pour pouvoir approvisionner les bio-raffineries, il faut se poser la question des ressources en biomolécules. La ressource en molécules extraites des nœuds et à l'image de la diversité de la ressource forestière française et de nombreuses études sont consacrées à la caractérisation des propriétés antifongiques, antibactériennes, antioxydantes, anticancéreuses, etc. de ces composés, laissant envisager une myriade d'applications (Cosentino et al., 2007 ; Kangas et al., 2002 ; Kirker et al., 2013 ; Laavola et al., 2015 ; Loers et al., 2014 ; Peuhu et al., 2013 ; Phelan et al., 2009 ; Ravber et al., 2015 ; Schultz and Nicholas, 2000, 2002 ; Schultz et al., 2007 ; Singh and Singh, 2012 ; Spilioti et al., 2014 ; Turley et al., 2006 ; Yatkin et al., 2014). Le tableau ci-dessous dresse un bilan des principales molécules d'intérêt identifiées dans les nœuds des différentes essences étudiées pendant cette thèse. Toutefois, d'autres composés sont tout aussi intéressants tels que les terpènes (surtout pour la parfumerie et la cosmétique) ; les stérols et les acides gras (pour l'agroalimentaire). Par ailleurs, les nœuds ne sont pas les seuls coproduits des industries du bois et l'écorce représente un volume non négligeable de déchets qu'il conviendrait de mieux valoriser au même titre que les nœuds surtout pour les tanins qu'elle contient (Backlund et al., 2014 ; Ferreira et al., 2015 ; Lacoste et al., 2015).

Il serait donc souhaitable de poursuivre cette caractérisation de la biodiversité interspécifique en caractérisant les molécules non identifiées lors de ce travail mais aussi en s'intéressant aux autres espèces forestières françaises métropolitaine telles que le chêne sessile, le chêne pubescent, le bouleau, l'érable, le peuplier, mais aussi aux essences tropicales que l'on retrouve en Guyane par exemple.

Molécules	Espèces
Secoisolaricirésinol	Sapin Mélèze Douglas If Epicéa Pin maritime
Laricirésinol	Sapin Douglas Mélèze
Isolaricirésinol	Sapin
Nortrachelogénine	Pin maritime Pin sylvestre Cèdre de l'Atlas Mélèze Douglas If
Hydorixymatairésinol	Epicéa Sapin Douglas
Taxirésinol et isotaxirésinol	If
Agatharésinol	Cyprès chauve Métasequoia
Pinosylvine	Pin sylvestere Pin maritime
Monométhyl éther de pinosylvine	Pin sylvestre Pin maritime
Taxifoline	Mélèze Douglas
Catéchine	Merisier Chêne vert Noyer Hêtre Aulne
Robinétine et Dihydrorobinétine	Robinier
Pinocembrine	Douglas Merisier
Pinostrobine chalcone	Merisier
Tectochrysine	Merisier
Sakuranine	Merisier
Chrysine	Merisier
Quercétine	Châtaignier
Acides résiniques : acides pimarique, isopimariques, abiétiques, déhydroabiétique	Pin, Epicéa, Douglas, Mélèze, cyprès chauve, métasequoia
Juvabione et dehydrojuvabione	Sapin et Douglas
Epimanool	Mélèze, cyprès chauve, métasequoia

Tableau 5 : Principales molécules identifiées dans les noeuds des essences étudiées.

Par ailleurs, la caractérisation de la variabilité intra-arbre des extractibles nodaux permettra de mieux cibler les parties où les nœuds sont les plus concentrés en composés. L'étude menée sur les nœuds du sapin pectiné a aussi révélé l'influence des conditions de croissance sur les concentrations en extractibles. Une étude complète sur cette essence pour approvisionner les industries d'extraction des molécules nécessiterait d'échantillonner d'autres situations notamment de basse et haute altitude mais également plusieurs sites avec des indices de fertilité du sol différents et des risques de déficits hydriques différents pour étudier l'effet de la localisation géographique et des conditions climatiques sur les extractibles nodaux puisque les conditions environnementales sont connues pour influer la quantité et la nature des métabolites secondaire chez les plantes. Ensuite il conviendra de valider les résultats obtenus sur d'autres essences, si possible en tenant compte de l'effet génotype, non abordé jusqu'à présent.

Annexe A

Knotwoods of different wood species as potential sources of valuable natural phenolic compounds

Zineb KEBBI-BENKEDER[1,2,3], Nassim Touahri[1,2,3], Francis COLIN[1,2], Stéphane DUMARÇAY[3], Philippe GÉRARDIN[3]

[1] AgroParisTech, UMR 1092 LERFOB, F-54000 Nancy, France
[2] INRA, UMR 1092 LERFOB, F-54280 Champenoux, France
[3] Université de Lorraine, EA 4037 LERMAB, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

(In preparation)

Abstract

Previous studies reported that knotwood of several European species contains extractives contents much higher than stemwood consisting mainly of phenolic compounds such as flavonoids, lignans, stilbenes, which may find valuable applications in food, cosmetic or pharmaceutic sectors. Determination of extractives amounts present in knotwood and heartwood of different softwood and hardwood species not investigated up to now has been performed and their chemical composition has been analysed using GC-MS to evaluate their potential as new sources of naturally occurring phenolic compounds. The results showed that knotwood contains more extractives than the corresponding heartwood, softwood knots containing generally higher amounts of valuable phenolic compounds. Different lignans, flavonoids or stilbenes of interest have been identified allowing envisaging further chemical valorisation.

Keyword: antioxidant, extractives, flavonoid, lignan, knotwood, phenolic compounds, stilbene

Introduction

Plant secondary metabolites represent a huge diversity of chemical families that possess numerous interesting biological activities for applications in food, pharmaceutical or cosmetic industries (Turley et al., 2006). These substances are usually classified into three main groups: alkaloids, terpenes and terpenoids and phenolic compounds (Kennedy and Wightman, 2011; Obst, 1998).

Wood secondary metabolites, usually designed as extractives, are responsible of its colour, flavour and defence against different stresses. Indeed, pathogens like micro-organisms and insects (Pearce, 1996; Ringman et al., 2014); and abiotic factors (UV-light, pH, temperature, etc.) (Ramakrishna and Ravishankar, 2011; Sharma et al., 2012) are the main parameters responsible of wood degradation since they generate active oxygen species which are key parameters of wood cell wall polymers depolymerisation. Wood phenolic compounds are known to possess strong antioxidant properties

and free radical scavenging activities as well as different antimicrobial properties, appear therefore as crucial in the mechanisms responsible of wood durability (Schultz and Nicholas, 2000; Singh and Singh, 2012). In addition, it was reported that lipophilic constituents are present in cell lumens probably to act as a physical barrier in case of fungi and mycelium propagation; and, on the other hand, hydrophilic molecules are impregnated within cell wall layers to insure cohesion of the lignocellulosic matrix (Golpayegani et al., 2012; Grabner et al., 2005a; Yano, 1994). Thus, extractives participate in the dimensional stability of heartwood.

Recent studies highlighted that knots of various industrial tree species such as spruces, firs, pines and other softwood species contain high amounts of phenolic compounds comparatively to surrounding stemwood (Pietarinen et al., 2005; Willför et al., 2003a, 2003b, 2004a). The extractive richness of knots is probably due to their strategically localisation in the tree. Consequently these compounds may be involved in defense mechanisms against pathogens thanks to their wide range of bioactive properties and antioxidant activities (Eklund et al., 2005; Karppanen et al., 2007; Lindberg et al., 2004; Neacsu et al., 2007b; Välimaa et al., 2007; Willför et al., 2003c). In addition, extractives in knots may also confer a higher mechanical stability for this junction of great importance for the whole tree. Indeed, knotwood may need to be reinforced to support mechanical loads such as branches and leaves weights, wind, precipitations and other environmental constraints. Mechanical contribution of extractives was already investigated in stem heartwood and it was highlighted that extractives contribute to the vibrational properties of wood (Bremaud et al., 2011; Grabner et al., 2005a).

The aims of this study are to complement the screening of the natural biodiversity of extractives present in knotwood already started in our previous study dealing with the quantification and characterization of knotwood extractives of twelve European softwood and hardwood species (Kebbi-Benkeder et al., 2015a). Different softwood and hardwood species not studied until now to our knowledge were investigated regarding their knotwood extractive determination. The final goal of this research is the evaluation of natural knotwood biodiversity as a potential new source of phenolic compounds of interest susceptible of further valorisation for food, cosmetic or pharmaceutical applications.

Material and Methods

Wood material

Hardwood and softwood species selected for this study were chestnut [*Castanea sativa* Mill.], European box [*Buxus sempervirens* L.], holly [*Ilex aquifolium* L.], walnut [*Juglans regia* L.], Atlantic cedar [*Cedrus atlantica* (Endl.) Carr.], ginkgo [*Ginkgo biloba* L.], metasequoia [*Metasequoïa glyptostroboides* L.], bald cypress [*Taxodium distichum* (L.) L.C.M. Rich] and yew [*Taxus baccata* L.]

were felled in northeast France. Holm oak [*Quercus ilex* L.] was harvested in southeast France and maritime pine [*Pinus pinaster* Ait.] was felled in Orléans (Centre France). One tree for each species was harvested during winter 2013 – 2014 (Table 1).

Common name	Height (m)	DBH (cm)	Age (year)
Maritime pine	14.0	29.9	36
Atlas cedar	8.6	14.4	24
Yew	5.6	12.6	41
Bald cypress	6.9	16.2	39
Metasequoia	12.0	22.3	35
Ginkgo biloba	5.8	8.2	43
Chestnut	14.4	24.7	18
Holm oak	7.1	18.3	46
Walnut	8.3	18.4	41
European box	7.5	11.4	110
Holly tree	15.3	22.5	73

Table 1. Characteristics of the tree samples.

On each tree, several discs knots were sawn: a disc with only dead knots and three discs with living knots in the bottom (Old knots), middle (Intermediate knots) and upper (Young knots) parts of the trunk. In addition, two discs at the stump and at a height of 1.3m were sawn for age determination and trunk heartwood sampling, respectively. A wood chisel was used to remove knotwood and heartwood from the discs. All samples were dried at 50 °C and ground to fine sawdust. Sawdusts were frozen until extraction.

Extraction, identification and quantification of the extractives

Heartwood and knotwood powders were successively Soxhlet extracted using four solvents of increasing polarity. Methylene chloride was used to extract lipophilic compounds. Hydrophilic substances were removed by acetone, toluene/ethanol (2/1, v/v) and water. Extractives were gravimetrically quantified as percentage of the dry initial mass of the different samples before analysis by gas chromatography (GC-MS) as described in (Kebbi-Benkeder et al., 2015a). Briefly, 1 mg

of the acetone extracts was silylated by adding 80 µL of BSTFA/TMSCl (99/1, v/v) and heated for 24 hours at 70 °C. Silylated extracts were then evaporated to dryness to remove the remaining derivatization reagent and diluted in 1 mL of ethyl acetate. 1 µL of this solution was injected in GC-MS (Clarus 600 GC gas chromatograph coupled to a SQ8 mass spectrometer, Perkin-Elmer). The injection was performed at 250 °C and the carrier gas was helium at a flow of 1 mL/min and the oven followed this heating program: 80 °C for 2 min, a rise from 80 to 190 °C at a rate of 10 °C/min, a second increase from 190 to 280 °C at a rate of 15 °C/min and hold for 5 min, then a final rise at 10 °C/min until 300 °C hold for 14 min. The column was a 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm-capillary column (J&W Scientific DB-5MS), and constituted by 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane fused-silica. The electron impact mode at 70 eV was performed for the ionization of the components and their identification was achieved by NIST library or comparison of published mass spectra. The quantification of the main families of compounds present in each sample was determined as a relative composition by integration of peaks areas obtained by TIC (Total Ion Current).

Results and discussion

Results obtained during this study on several tree species not investigated up to now complete our previous screening of the biodiversity of extractives present in knotwood (Kebbi-Benkeder et al., 2015a).

Total extractive contents

The extractive contents of the knots and heartwood according to the solvents are presented in Figure 1 and Figure 2 for the softwood and hardwood species respectively. A first conclusion that can be made, is that knotwood present generally higher extractives contents than corresponding heartwood as it was reported previously (Hovelstad et al., 2006; Pietarinen et al., 2005, 2006b; Pohjamo et al., 2003; Willför et al., 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2007, 2005b).

Total extractive concentrations in softwood knots ranged from 6.8 to 45.3 % (w/w of dry sawdust) in young and dead knots of maritime pine, respectively. In trunk heartwood, the amounts ranged from 5.1 (Ginkgo biloba) to 11.8% (yew). Gymnosperms extractives were mainly extracted with dichloromethane, except for yew and Ginkgo biloba, which contained more hydrophilic compounds extracted with acetone, toluene-ethanol and water. Youngest knots of maritime pine and Atlas cedar and intermediate knots of metasequoia contained also more hydrophilic than lipophilic compounds. In maritime pine and Atlas cedar, the dead knots are the richest ones, whereas the oldest living knots present the highest extractive contents in metasequoia, bald cypress and yew. For knots of maritime pine, yew and metasequoia there was a linear decreasing of extractive contents from the oldest

living knots to the youngest ones, and in the opposite, there was an increasing content from the oldest to the youngest knots in Ginkgo biloba.

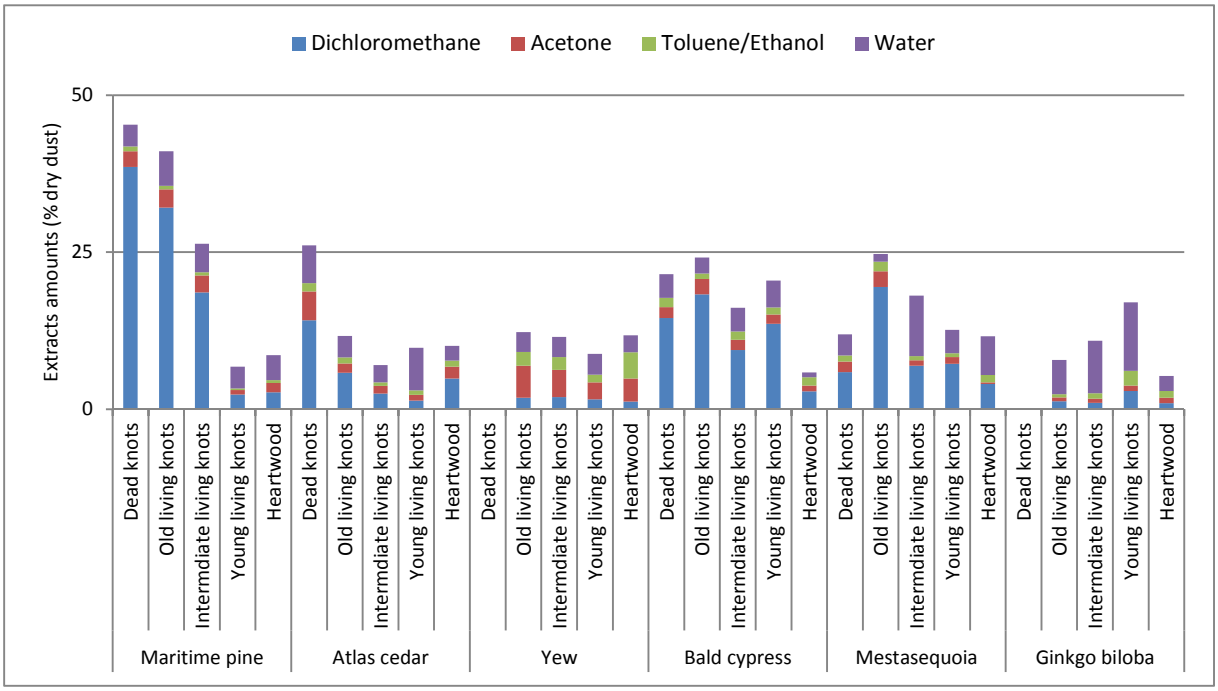


Figure 1. Knotwood and heartwood extractive contents obtained by four successive extractions of the different softwood species.

Total extractive contents in knots of hardwood species ranged from 6.3 to 22.4 % in intermediate knots of walnut and dead knots of chestnut respectively, while extractive content of heartwood ranged from 5.2 to 12.5 % for of European box and walnut respectively (Figure 2). Angiosperm extracts were almost soluble in water indicating very few amounts of lipophilic compounds. In most cases, and depending on the position of the knots along the trunk, knots of softwood species contained higher extractive amounts than hardwood knots. Intraspecific knotwood content variability was investigated according to the knot position in the trunk. Generally, dead knots contained more extractives than the living ones, which could be linked with a production or an accumulation of the protective extractives when the branch have been declining and microorganisms decayed until it died.

Quantitative determination of extractives highlights a within-stem variation of knotwood extractives. However, it was difficult to establish a systematic specific vertical tendency, likely because of the limited sample of disks for each species and to the diversity of the species investigated. Piispanen et al., (2008) reported also a within-tree distribution of lignans in Norway spruce knots and noted an increase of lignan amounts from the stump to the starting point of living crown, where the largest branches were inserted supporting more biomass and then a decrease until the highest knots.

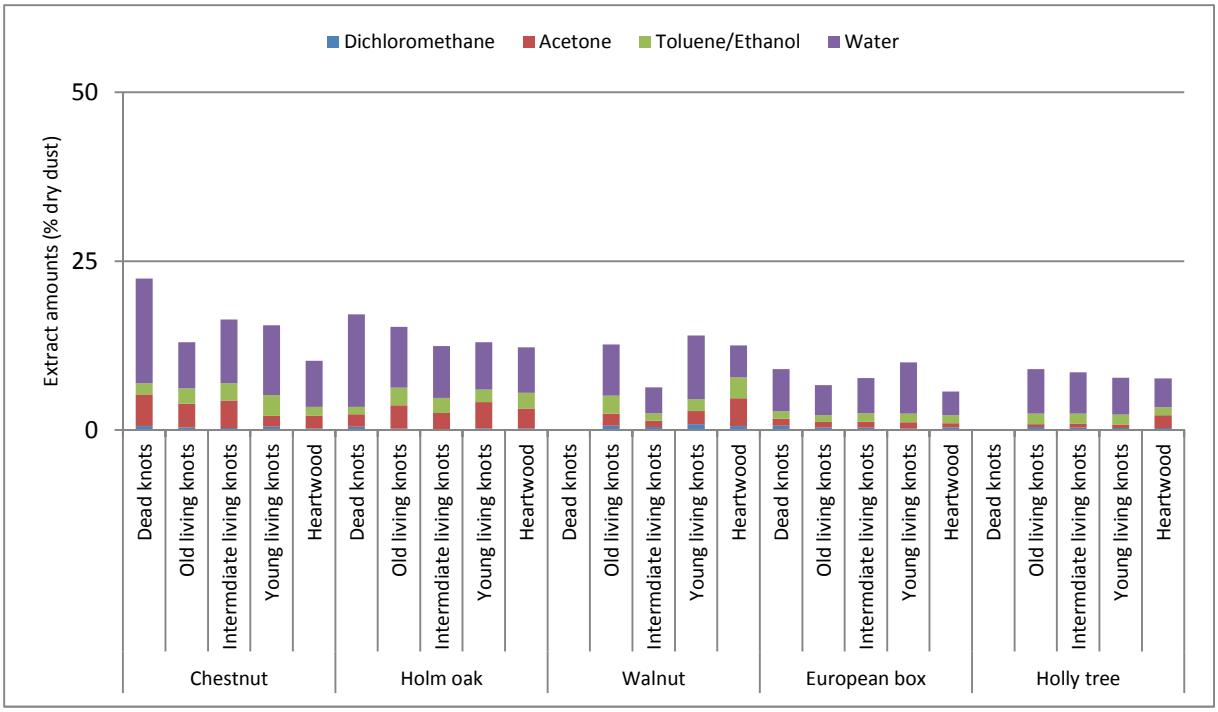


Figure 2. Knotwood and heartwood extractive contents obtained by four successive extractions of the different hardwood species.

Identification and quantification of the main extractive groups

Figure 3 and Figure 4 summarise the relative proportions of the different families of compounds detected in the knots and heartwood of the softwood and the hardwood species respectively. The main compounds present in all samples are sugars, especially in ginkgo biloba, holly and European box samples. The phenolic compounds identified were lignans, stilbenes, flavonoids and gallic acid. These compounds were mainly detected in the acetone-soluble fraction. The relative content of each chemical family differed markedly according to the species and the type of knots sampled.

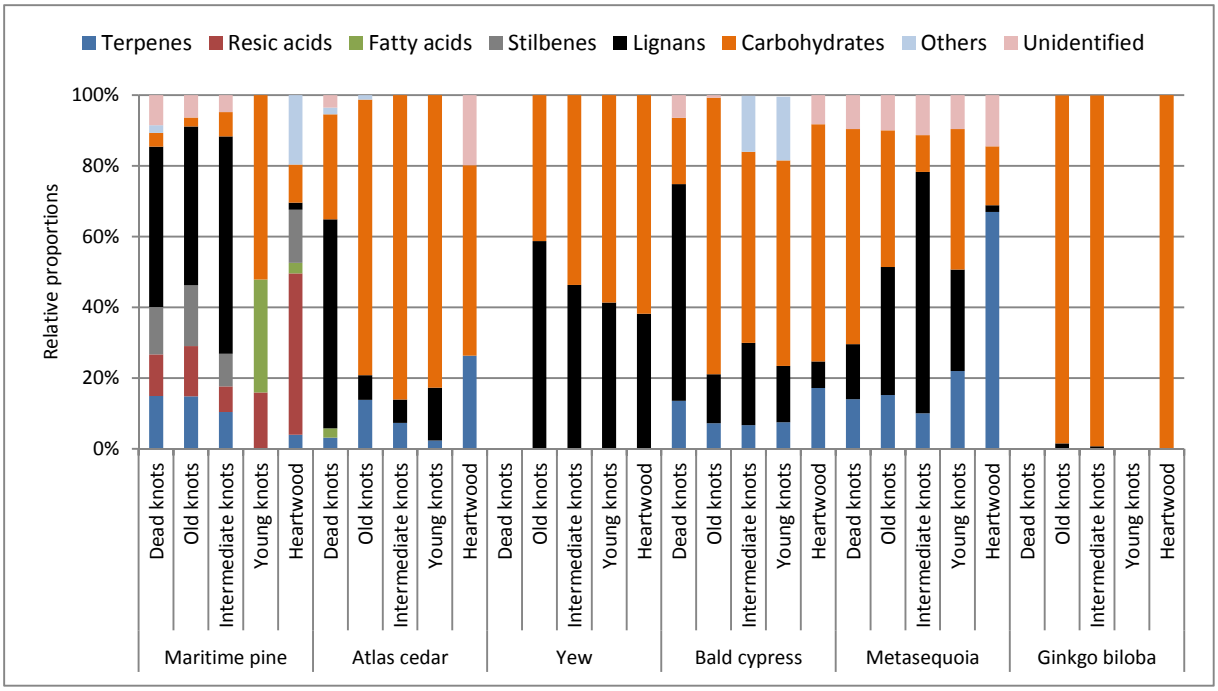


Figure 3. Main chemical families detected in the acetone fraction of softwood species

Lignans were present only in the softwood species, especially in knotwood (Figure 3). The highest proportions of lignans were detected in intermediate living knots of maritime pine and in dead knots of Atlas cedar, both containing the nortrachelogenin as main component (Figure 5). The only heartwoods containing lignans were those of yew and maritime pine. Willför et al., (2004a) reported that knotwood of Norway spruce contained lignans up to 560 fold in comparison to stemwood. Yew knotwood and heartwood contained three lignans identified as isotaxiresinol, taxiresinol and secoisolariciresinol. Bald cypress and metasequoia contained the norlignan agatharesinol, already identified in other species from the cupressaceous genera (Imai et al., 2005, 2009b; Suzuki and Umezawa, 2007). Only traces of non-identified lignan-like structure were detected in ginkgo biloba knots under the experimental conditions used for GC-MS analysis even if other LC-MS experiment showed evidence of liovil presence (data not shown).

Maritime pine was the only species containing stilbenes identified as pinosylvin and pinosylvin monomethyl ether (Figure 5). Stilbenes were reported in other pine species (Hovelstad et al., 2006; Karppanen et al., 2007; Lindberg et al., 2004; Pietarinen et al., 2006a; Willför et al., 2003a). However, the youngest knots of maritime pine contained neither lignans nor stilbenes. This could be interpreted in parallel to the heartwood formation in youngest branches which would not have started yet in these tissues and thus extractives accompanying heartwood formation being not yet produced. Besides lignans, softwood knots contained also large amounts of carbohydrates, fatty acids (palmitic, oleic and linoleoic acids) and, only for some species, terpenes which have not been

completely extracted by the former methylene chloride extraction step like juvabione, bisabolol, epimanool, agathadiol, dehydroabietic acid and even traces of himachalene.

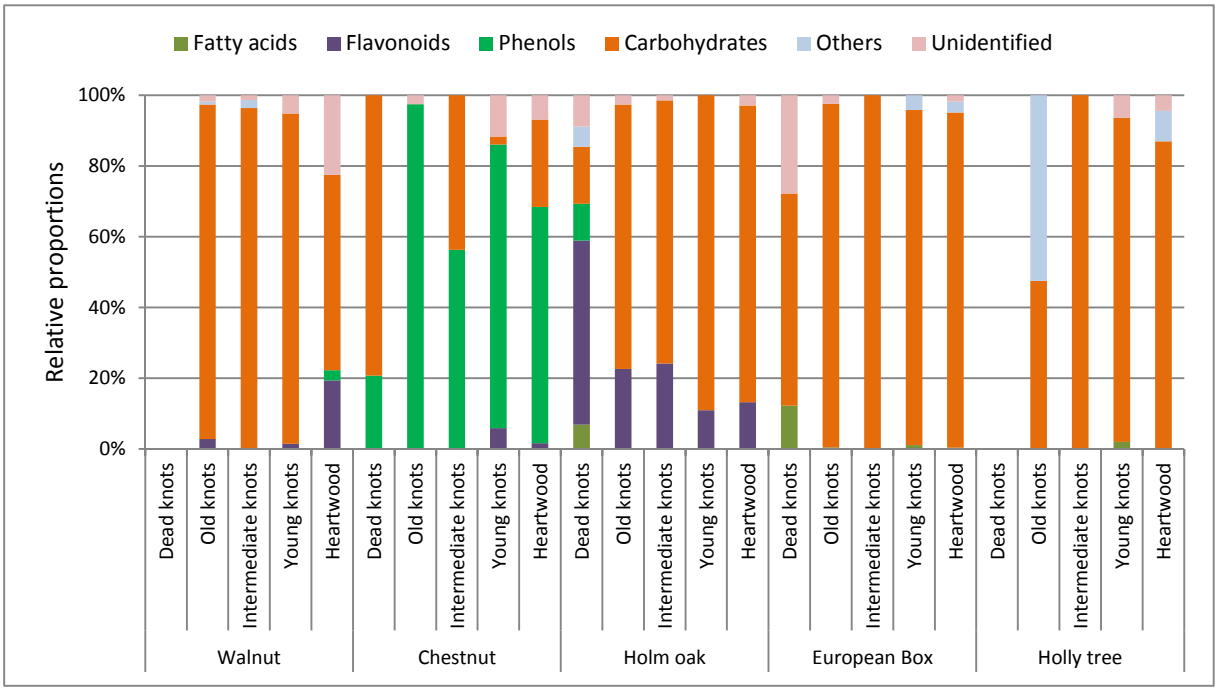


Figure 4. Main chemical families detected in the acetone fraction of hardwood species.

Except for chestnut, knots of hardwood species contained mainly saccharides. Phenolic compounds present in hardwood knots were flavonoids and gallic acid (Figure 5). Chestnut samples, dead knots of holm oak and heartwood of walnut were the only samples containing gallic acid, which could be released after the degradation of hydrolysable tannins as confirmed by some studies (Imai et al., 2009a, 2013; Pasch and Pizzi, 2002). Holm oak and walnut contained catechin, while chestnut wood contained quercetin, two flavonoids widespread in wood extractives. Flavonoids were detected neither in holly tree and European box nor in the six coniferous species investigated in this study, except in maritime pine heartwood which contained small amounts of pinocembrin (less than 3%). The other extractives present in hardwood knots were fatty acids. According to Burtin et al., (1998), dehydrojuglone is present in walnut wood, but we did not succeed to identify it. None of the hardwood investigated in this study contained lignans. There were rare studies dealing with hardwood knots like *Salix caprea, Betula pendula, Fagus salvatica, Acacia crassicarpa, Populus tremula*, and none of them reported the presence of lignans corroborating our observations (Neacsu et al., 2007b; Pietarinen et al., 2005, 2006a, 2006b; Pohjamo et al., 2003).

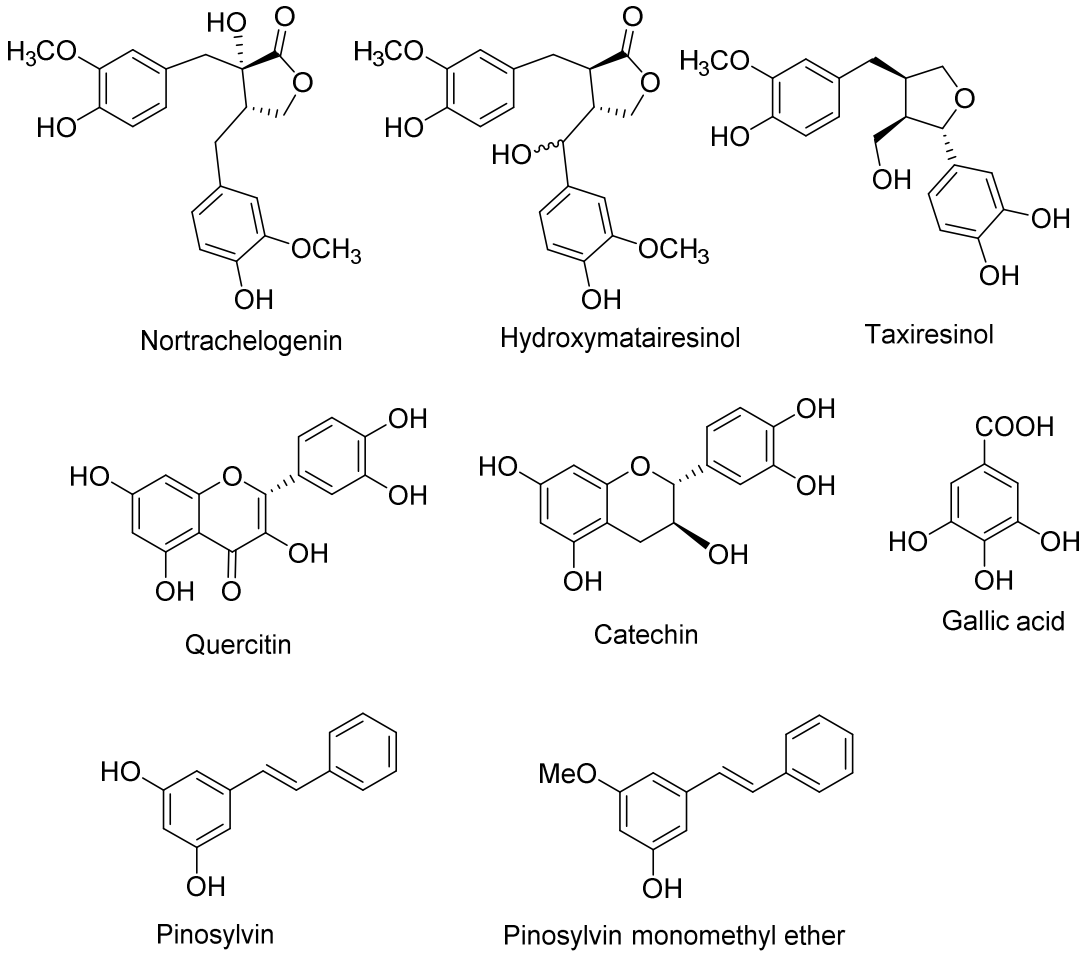


Figure 5. Main phenolic compounds identified in the heartwood and knotwood samples.

Discussion on the industrial processing and valorisation of knotwood

To obtain a deeper insight of the diversity of the knotwood extractive contents according to the wood species and detect which species are the richest in phenols, results concerning the total extractive content obtained in our previous study (Kebbi-Benkeder et al., 2015a) were combined with those obtained in the current study and displayed in decreasing order of knot extractive contents.

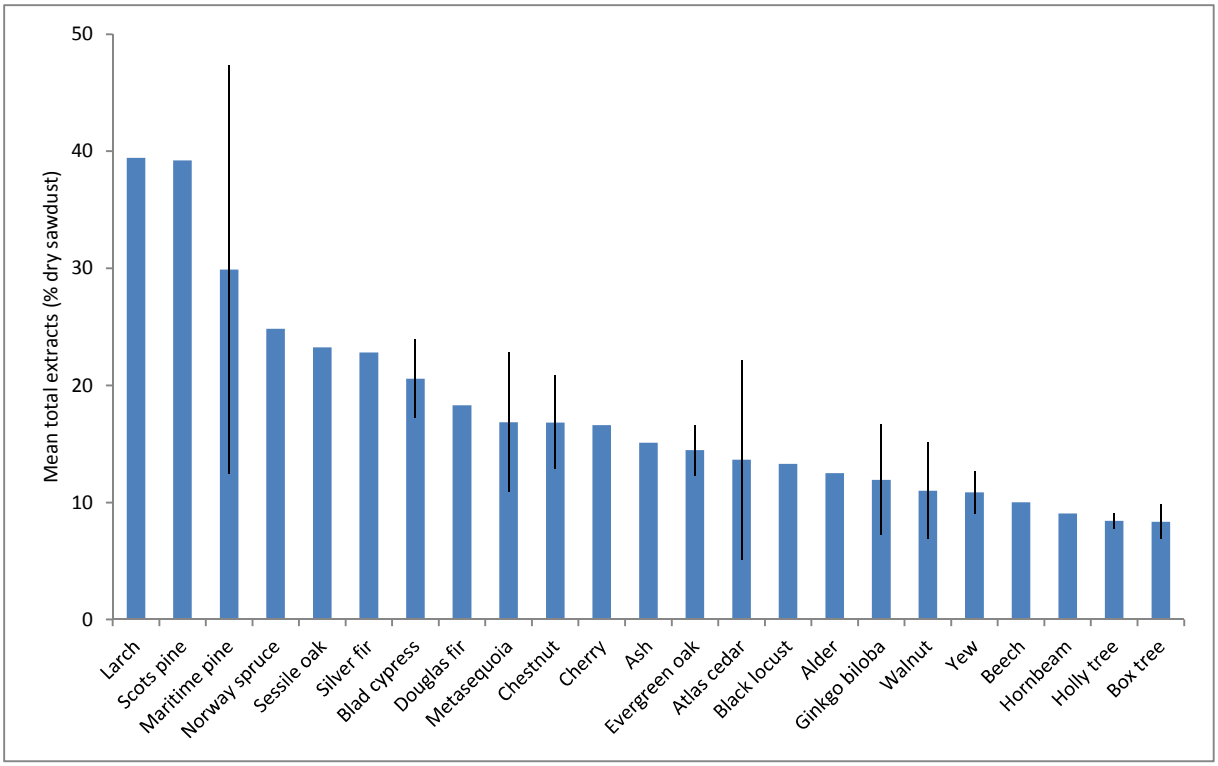


Figure 6. Knots mean total extractive contents ordered for twenty three species.

Vertical bars are the standard deviation of the different knot samples from each tree (Figures 1 and 2). The other results were adapted from (Kebbi-Benkeder et al., 2015a)

Apart from few exceptions, such as Atlas cedar and yew, softwood species present clearly the highest amounts of extractives in knotwood comparatively to hardwood species. Nevertheless some hardwood species, like pedunculate oak, presents quite higher knotwood extractive content comparatively to most of the other hardwood species. Knots are waste material of pulp and paper mills because of their lack of technological properties and used to be burnt but environmental issues imply the development of biorefineries and improve operational conditions to explore the whole tree by-products (Conde et al., 2013a, 2013b; Domingues et al., 2010; Fang et al., 2013; Holmbom et al., 2003; Pietarinen et al., 2005, 2006a; Ravber et al., 2015; Willför et al., 2004a, 2004b).

Interspecific variability investigated in our studies indicated that softwood knots appear as an interesting source for valorisation of phenolic compounds, especially lignans such as hydroxymatairesinol, secoisolariciresinol and nortrachelogenin. On the other hand, knots of hardwoods contained high levels of flavonoids such as robinetin, dihydrorobinetin, catechin, and quercetin. Taxifolin was present in larch and Douglas fir knots. Gallic acid is present in oaks and chestnut while stilbenes are present in pines. Some knots contained mainly phenols such as spruce, fir, pines, yew, larch, cherry, black locust, chestnut, oaks; thus, purification and separation of those compounds are easier. In addition, flavonoids, lignans and stilbenes extracted from the knotwood

are aglycones, meaning a more antioxidant activity than their glycosides (Hopia and Heinonen, 1999). Phenolic compounds are naturally present in human diet (fruits, cereals, oilseeds, spice...) (Bonzanini et al., 2009; Latruffe and Rifler, 2013; Rauha et al., 2000; Sicilia et al., 2003; Smeds et al., 2007, 2012b) preventing cell aging and diseases such as obesity, diabetes and cancer because of their proton donors, metal chelators or oxygen scavengers properties able to stop free radicals propagation, which cause multiple damages such as oxidation of DNA and proteins, lipid peroxidation and proliferation of cancerous cells (Chang et al., 2008; Eklund et al., 2005; Kennedy and Wightman, 2011; Marchal et al., 2015; Meydani and Hasan, 2010; Pérez-Jiménez et al., 2011; Turan et al., 2012). Knotwood lignans, especially hydroxymatairisol extracted from spruce knots, are converted to mammalian lignans in human body and, due to their estrogenic properties; they could be used against breast and prostate cancers. HMR and stilbenes have also anti-inflammatory activities, cytoprotective effects and showed good results in prevention of cardiovascular diseases while larch knots contained extractives that enhance neural activity (Cosentino et al., 2007; Kangas et al., 2002; Laavola et al., 2015; Loers et al., 2014; Phelan et al., 2009; Spilioti et al., 2014; Yatkin et al., 2014). Thus, extraction of knotwood, especially obtained from pulp and paper mills which process huge quantities of softwoods, is a sustainable solution to provide natural products and use it as food supplements, cosmetics and drugs.

Conclusion

In this study, the bioavailability of several phenolic compounds from different tree species was investigated. Knotwood is quantitatively and qualitatively different from heartwood. Although there are inter-species and within-species variability, and even within-stem variation, knotwood appear as an interesting new raw material for providing highly bioactive molecules, especially phenols, which are easily extracted by aqueous or organic solvents. Further studies may investigate other species available at local scales for the provision of biorefineries and extraction of therapeutic substances. On the other hand, a more detailed sampling of knots may elucidate the within-stem variation according to the branch diameter and position.

Acknowledgments

Authors thank warmly Bruno GARNIER, Loïc DAILLY, Alain MERCANTI and Nicolas HOUSSEMENT for their technical support. The authors gratefully acknowledge the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) for the doctoral fellowship granted to the first author (CJS n°12-00006889). The UMR 1092 LERFoB and EA 4370 LERMAB are supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). Thanks at last to J. Adam from pépinière ADAM and the forest managers for providing the woody material: T. Curt and J-M. Lopez from Irstea, P. Ley and B. Guespin from the National Forest Service ONF, P. Poursat, L. Pâques and J-P. Charpentier from INRA.

Références bibliographiques

Académie de l'agriculture (2014). Quelle place pour le Bois dans la chimie verte ? Dans La forêt et le bois en 100 questions.

Aloni, R., Alexander, J.D., and Tyree, M.T. (1997). Natural and experimentally altered hydraulic architecture of branch junctions in Acer saccharum Marsh and Quercus velutina Lam trees. Trees-Struct. Funct. *11*, 255–264.

Anderegg, R.J., and Rowe, J.W. (1974). Lignans, the major component of resin from Araucaria angustifolia knots. Holzforschung *28*, 171–175.

André, J.-P. (2002). Organisation vasculaire des angiospermes : une vision nouvelle (INRA).

Arganbright (1970). Influence of extractives on bending strenght of redwood (Sequoia sempervirens). Wood Sci. Fiber 367–372.

Aufsess, H. von (1984). Some Examples of Wood Discolourations Related to Mechanisms for Potential Protection of Living Trees Against Fungal Attack. IAWA Bull. *5*, 133–138.

Backlund, I., Arshadi, M., Hunt, A.J., McElroy, C.R., Attard, T.M., and Bergsten, U. (2014). Extractive profiles of different lodgepole pine (Pinus contorta) fractions grown under a direct seeding-based silvicultural regime. Ind. Crops Prod. *58*, 220–229.

Badel, E., Ewers, F.W., Cochard, H., and Telewski, F.W. (2015). Acclimation of mechanical and hydraulic functions in trees: impact of the thigmomorphogenetic process. Front. Plant Sci. *6,266*.

Baldwin, I.T. (2010). Plant volatiles. Curr. Biol. *20*, R392–R397.

Baldwin, I., and Schultz, J. (1983). Rapid Changes in Tree Leaf Chemistry Induced by Damage - Evidence for Communication Between Plants. Science *221*, 277–279.

Baldwin, I.T., Kessler, A., and Halitschke, R. (2002). Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: What is real? Curr. Opin. Plant Biol. *5*, 351–354.

Beal, E., Webber, J.F., and Eaton, R.A. (2010). Comparative susceptibility of pine, spruce and larch to sapstain. For. Pathol. *40*, 116–128.

Bergström, B. (2003). Chemical and structural changes during heartwood formation in Pinus sylvestris. Forestry *76*, 45–53.

Beritognolo, I., Magel, E., Abdel-Latif, A., Charpentier, J.P., Jay-Allemand, C., and Breton, C. (2002). Expression of genes encoding chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase correlates with flavanol accumulation during heartwood formation in Juglans nigra. Tree Physiol. *22*, 291–300.

Bito, N., Nakada, R., Fukatsu, E., Matsushita, Y., Fukushima, K., and Imai, T. (2011). Clonal variation in heartwood norlignans of Cryptomeria japonica : evidence for independent control of agatharesinol and sequirin C biosynthesis. Ann. For. Sci. 68, 1049-1056.

Boddy, L., and Rayner, A. (1984). Internal Spread of Fungi Inoculated into Attached Oak Branches. New Phytol. *98*, 155–164.

Boddy, L., and Thompson, W. (1983). DECOMPOSITION OF SUPPRESSED OAK TREES IN EVEN-AGED PLANTATIONS. New Phytol. *93*, 261–276.

Boddy, L., Bardsley, D.W., and Gibbon, O.M. (1987). Fungal communities in attached ash branches. New Phytol. *107*, 143–154.

Bonzanini, F., Bruni, R., Palla, G., Serlataite, N., and Caligiani, A. (2009). Identification and distribution of lignans in Punica granatum L. fruit endocarp, pulp, seeds, wood knots and commercial juices by GC-MS. Food Chem. *117*, 745–749.

Bremaud, I., Cabrolier, P., Gril, J., Clair, B., Gerard, J., Minato, K., and Thibaut, B. (2010). Identification of anisotropic vibrational properties of Padauk wood with interlocked grain. Wood Sci. Technol. *44*, 355–367.

Bremaud, I., Gril, J., and Thibaut, B. (2011). Anisotropy of wood vibrational properties: dependence on grain angle and review of literature data. Wood Sci. Technol. *45*, 735–754.

Bremaud, I., El Kaim, Y., Guibal, D., Minato, K., Thibaut, B., and Gril, J. (2012). Characterisation and categorisation of the diversity in viscoelastic vibrational properties between 98 wood types. Ann. For. Sci. *69*, 373–386.

Burgert, I., and Jungnikl, K. (2004). Adaptive growth of gymnosperm branches-ultrastructural and micromechanical examinations. J. Plant Growth Regul. *23*, 76–82.

Burtin, P., Jay-Allemand, C., Charpentier, J.-P., and Janin, G. (1998). Natural wood colouring process in Juglans sp. (J. nigra, J. regia and hybrid J. nigra 23 ×J. regia) depends on native phenolic compounds accumulated in the transition zone between sapwood and heartwood. Trees *12*, 258–264.

Burtin, P., Jay-Allemand, C., Charpentier, J.P., and Janin, G. (2000). Modifications of hybrid walnut (Juglans nigra 23 x Juglans regia) wood colour and phenolic composition under various seasoning and toasting. Holzforschung 54, 33-38.

Cadahia, E., Munoz, L., de Simon, B.F., and Garcia-Vallejo, M.C. (2001). Changes in low molecular weight phenolic compounds in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. J. Agric. Food Chem. *49*, 1790–1798.

Cameron, A., and Thomas, K, (2008). Effect of thinning on the development of compression wood in stems of Corsican pine. Eur. J. For. Res. 127, 247-251.

Canas, S., Leandro, M.C., Spranger, M.I., and Belchior, A.P. (1999). Low molecular weight organic compounds of chestnut wood (Castanea sativa L.) and corresponding aged brandies. J. Agric. Food Chem. *47*, 5023–5030.

Canas, S., Leandro, M.C., Spranger, M.I., and Belchior, A.P. (2000). Influence of botanical species and geographical origin on the content of low molecular weight phenolic compounds of woods used in Portuguese cooperage. Holzforschung *54*, 255–261.

Caron, A., Altaner, C.M., Gardiner, B., and Jarvis, M.C. (2013). Distribution of extractives in Sitka spruce (Picea sitchensis) grown in the northern UK. Eur. J. Wood Wood Prod. *71*, 697–704.

Castro, M.A., Gordaliza, M., Miguel Del Corral, J.M., and Feliciano, A.S. (1996). The distribution of lignanoids in the order coniferae. Phytochemistry *41*, 995–1011.

Cerezo, A.B., Álvarez-Fernández, M.A., Hornedo-Ortega, R., Troncoso, A.M., and García-Parrilla, M.C. (2014). Phenolic Composition of Vinegars over an Accelerated Aging Process Using Different Wood Species (Acacia, Cherry, Chestnut, and Oak): Effect of Wood Toasting. J. Agric. Food Chem. *62*, 4369–4376.

Chang, H., Mi, M., Ling, W., Zhu, J., Zhang, Q., Wei, N., Zhou, Y., Tang, Y., and Yuan, J. (2008). Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells in vitro. Arch. Pharm. Res. *31*, 1137–1144.

Chapela, I.H., and Boddy, L. (1988a). Fungal colonization of attached beech branches. I. Early stages of development of fungal communities. New Phytol. 110, 39–45.

Chapela, I.H., and Boddy, L. (1988b). Fungal colonization of attached beech branches. II. Spatial and temporal organization of communities arising from latent invaders in bark and functional sapwood, under different moisture regimes. New Phytol. *110*, 47–57.

Chen, C., Bock, C.H., Hotchkiss, M.H., Garbelotto, M.M., and Cottrell, T.E. (2015). Observation and identification of wood decay fungi from the heartwood of peach tree limbs in central Georgia, USA. Eur. J. Plant Pathol. *143*, 11–23.

Chong, J., Poutaraud, A., and Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Sci. *177*, 143–155.

Climent, J., Chambel, M.R., Gil, L., and Pardos, J.A. (2003). Vertical heartwood variation patterns and prediction of heartwood volume in Pinus canariensis Sm. For. Ecol. Manag. *174*, 203–211.

Conde, E., Hemming, J., Smeds, A., Diaz Reinoso, B., Moure, A., Willfor, S., Dominguez, H., and Parajo, J.C. (2013a). Extraction of low-molar-mass phenolics and lipophilic compounds from Pinus pinaster wood with compressed CO2. J. Supercrit. Fluids *81*, 193–199.

Conde, E., Fang, W., Hemming, J., Willfor, S., Moure, A., Dominguez, H., and Carlos Parajo, J. (2013b). Water-Soluble Components of Pinus pinaster Wood. Bioresources *8*, 2047–2063.

Conrad (2012). Dépressage précoce sapin-épicéa-hêtre. compte rendu d'analyse des mesures et de l'inventaire de l'hiver 2011/2012 (Forêt Domaniale de Mont-Sainte-Marie (Doubs), Parcelle 34. Essai AR 1990-16-01).

Cosentino, M., Marino, F., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Luini, A., Legnaro, M., Delle Canne, M.G., Luzzani, M., Crema, F., et al. (2007). Estrogenic activity of 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMR/lignan (TM)) from Norway spruce (Picea abies) knots and of its active metabolite enterolactone in MCF-7 cells. Pharmacol. Res. *56*, 140–147.

Côté, W.A., Day, A.C., Simson, B.W., and Timell, T.E. (1966). Studies on Larch Arabinogalactan. I. The Distribution of Arabinogalactan in Larch Wood. Holzforsch. - Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood *20*, 178–192.

Courbet, F., Herve, J.-C., Klein, E.K., and Colin, F. (2012). Diameter and death of whorl and interwhorl branches in Atlas cedar (Cedrus atlantica Manetti): a model accounting for acrotony. Ann. For. Sci. *69*, 125–138.

Cuny, H.E. (2013). Thèse : Dynamique intra-annuelle de la formation du bois de trois espèces de conifères (sapin pectiné, épicéa commun et pin sylvestre) dans les Vosges : De la description des patrons saisonniers de la croissance à l'étude de l'influence de l'environnement sur la cinétique du développement cellulaire et les caractéristiques anatomiques du xylène.

Cuny, H.E., and Rathgeber, C.B.K. (2014). Overview of the function and regulation of cell processes in wood formation. Rev. For. Fr. *LXVI*, 761–777.

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

Dahle, G.A., and Grabosky, J.C. (2009). Review of Literature on the Function and Allometric Relationships of Tree Stems and Branches. Arboric. Urban For. *35*, 311–320.

Daniewski, W.M., Gumulka, M., Anczewski, W., Masnyk, M., Bloszyk, E., and Gupta, K.K. (1998). Why the yew tree (Taxus baccata) is not attacked by insects. Phytochemistry *49*, 1279–1282.

Davin, L.B., and Lewis, N.G. (2000). Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. Plant Physiol. *123*, 453–461.

Davin, L.B., and Lewis, N.G. (2005a). Lignin primary structures and dirigent sites. Curr. Opin. Biotechnol. *16*, 407–415.

Davin, L.B., and Lewis, N.G. (2005b). Dirigent phenoxy radical coupling: advances and challenges. Curr. Opin. Biotechnol. *16*, 398–406.

De Filippis, L., and Magel, E. (2012). Identification of biochemical differences between the sapwood and transition zone in Robinia pseudoacacia L. by differential display of proteins. Holzforschung *66*, 543–549.

Deflorio, G., Barry, K.M., Johnson, C., and Mohammed, C.L. (2007). The influence of wound location on decay extent in plantation-grown Eucalyptus globulus and Eucalyptus nitens. For. Ecol. Manag. *242*, 353–362.

Deflorio, G., Johnson, C., Fink, S., and Schwarze, F.W.M.R. (2008). Decay development in living sapwood of coniferous and deciduous trees inoculated with six wood decay fungi. For. Ecol. Manag. *255*, 2373–2383.

Domingues, R.M.., Sousa, G.D.., Freire, C.S.., Silvestre, A.J.., and Pascoal Neto, C. (2010). Eucalyptus globulus biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds. Ind. Crops Prod. *31*, 65–70.

Donoso-Fierro, C., Becerra, J., Bustos-Concha, E., and Silva, M. (2009). Chelating and antioxidant activity of lignans from Chilean woods (Cupressaceae). Holzforschung *63, 559-563*.

Dorado, J., Claassen, F.W., van Beek, T.A., Lenon, G., Wijnberg, J.B.P.A., and Sierra-Alvarez, R. (2000). Elimination and detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. J. Biotechnol. *80*, 231–240.

Duchateau, E., Longuetaud, F., Mothe, F., Ung, C., Auty, D., and Achim, A. (2013). Modelling knot morphology as a function of external tree and branch attributes. Can. J. For. Res. *43*, 266–277.

Eisner, N., Gilman, E., Grabosky, J., and Beeson, R. (2002a). Branch junction characteristics affect hydraulic segmentation in red maple. J. Arboric. *28*, 245–251.

Eisner, N., Gilman, E., and Grabosky, J. (2002b). Branch morphology impacts compartimentalization of pruning wounds. J. Arboric. *28*, 99–105.

Eklund, P.C., Långvik, O.K., Wärnå, J.P., Salmi, T.O., Willför, S.M., and Sjöholm, R.E. (2005). Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. Org. Biomol. Chem. *3*, 3336–3347.

Ekman, R. (1976) Analysis of lignans in Norway spruce by combined gas chromatography - mass spectrometry. Holzforschung 30, 79-85.

Ekman, R., Willför, S., Sjöholm, R., Reunanen, M., Mäki, J., Lehtilä, R., and Eckerman, C. (2002). Identification of the lignan nortrachelogenin in knot and branch heartwood of scots pine (pinus sylvestris L.). Holzforschung *56*, 253–256.

Erdtman, H., and Tsuno, K. (1969). Taxus heartwood constituents. Phytochemistry *8*, 931–932.

Eyles, A., Davies, N.W., and Mohammed, C. (2003). Wound wood formation in Eucalyptus globulus and Eucalyptus nitens: anatomy and chemistry. Can. J. For. Res. *33*, 2331–2339.

Eyles, A., Jones, W., Riedl, K., Cipollini, D., Schwartz, S., Chan, K., Herms, D.A., and Bonello, P. (2007). Comparative phloem chemistry of manchurian (Fraxinus mandshurica) and two north american ash species (Fraxinus americana and fraxinus pennsylvanica). J. Chem. Ecol. *33*, 1430–1448.

Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R., and Mohammed, C. (2010). Induced resistance to pests and pathogens in trees. New Phytol. *185*, 893–908.

Fagerstedt, K., Mellerowicz, E.J., Gorshkova, T., Ruel, K., and Joseleau, J.-Pa. (2014). Cell Wall Polymers in Reaction Wood. In The Biology of Reaction Wood, (Springer), pp. 37–106.

Fang, W., Hemming, J., Reunanen, M., Eklund, P., Conde Pineiro, E., Poljansek, I., Oven, P., and Willfor, S. (2013). Evaluation of selective extraction methods for recovery of polyphenols from pine. Holzforschung *67*, 843–851.

Farber, J., Lichtenegger, H.C., Reiterer, A., Stanzl-Tschegg, S., and Fratzl, P. (2001). Cellulose microfibril angles in a spruce branch and mechanical implications. J. Mater. Sci. *36*, 5087–5092.

Fengel, D., and Wegener (1984). Wood—chemistry, ultrastructure, reactions (Walter de Gruyter).

Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Poveda, P., and Broto, M. (2006). Chemical Characterization of Oak Heartwood from Spanish Forests of Quercus pyrenaica (Wild.). Ellagitannins, Low Molecular Weight Phenolic, and Volatile Compounds. J. Agric. Food Chem. *54*, 8314–8321.

Fernández de Simón, B., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., Cadahía, E., and Sanz, M. (2009). Volatile compounds in acacia, chestnut, cherry, ash, and oak woods, with a view to their use in cooperage. J. Agric. Food Chem. *57*, 3217–3227.

Fernando, D., Hafrén, J., Gustafsson, J., and Daniel, G. (2008). Micromorphology and topochemistry of extractives in Scots pine and Norway spruce thermomechanical pulps: a cytochemical approch. J. Wood Sci. 54, 134-142.

Ferreira, J.P.A., Miranda, I., Gominho, J., and Pereira, H. (2015). Selective fractioning of Pseudotsuga menziesii bark and chemical characterization in view of an integrated valorization. Ind. Crops Prod. *74*, 998–1007.

Fink, S. (1986). Microscopal investigations on wood formation and function in diseased trees. IAWA Bull. *7*, 351–355.

Fisher, J., and Stevenson, J. (1981). Occurrence of Reaction Wood in Branches of Dicotyledons and Its Role in Tree Architecture. Bot. Gaz. *142*, 82–95.

Fossdal, C.G., Hietala, A.M., Kvaalen, H., and Solheim, H. (2006). Changes in host chitinase isoforms in relation to wounding and colonization by Heterobasidion annosum: early and strong defense response in 33-year-old resistant Norway spruce clone. Tree Physiol. *26*, 169–177.

Freudenberg, K., and Weinges, K. (1959). Lignane des lärchen- und erlenholzes (Larix decidua und Alnus glutinosa). Tetrahedron Lett. *1*, 19–22.

Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M., and Saindrenan, P. (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. Trends Plant Sci. *10*, 542–549.

Gallant, R.H. (1987). Nonlinear Equation Estimation.

Gang, D.R., Costa, M.A., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A.T., Wang, H.B., Burlat, V., Martin, W., Sarkanen, S., Davin, L.B., and Lewis, N.G. (1999). Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. Chem. Biol. *6*, 143–151.

Gerrienne, P., Gensel, P.G., Strullu-Derrien, C., Lardeux, H., Steemans, P., and Prestianni, C. (2011). A Simple Type of Wood in Two Early Devonian Plants. Science *333*, 837–837.

Gershenzon, J., and Engelberth, J. (2010). Secondary metabolites and plant defense. In Plant Physiology, L. Taiz, and E. Zeiger, eds. pp. 369–399.

Gierlinger, N., Jacques, D., Schwanninger, M., Wimmer, R., Hinterstoisser, B., and Paques, L.E. (2003). Rapid prediction of natural durability of larch heartwood using Fourier transform near-infrared spectroscopy. Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For. *33*, 1727–1736.

Gierlinger, N., Jacques, D., Grabner, M., Wimmer, R., Schwanninger, M., Rozenberg, P., and Paques, L.E. (2004). Colour of larch heartwood and relationships to extractives and brown-rot decay resistance. Trees-Struct. Funct. *18*, 102–108.

Gilman, E., and Grabosky, J. (2006). Branch union morphology affects decay following pruning. Arboric. Urban For. *32*, 74–79.

Golpayegani, A.S., Bremaud, I., Gril, J., Thevenon, M.-F., Arnould, O., and Pourtahmasi, K. (2012). Effect of extractions on dynamic mechanical properties of white mulberry (Morus alba). J. Wood Sci. *58*, 153–162.

Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L., and Xu, G. (1997). Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. J. Biotechnol. *53*, 133–162.

Gottlieb, O.R. (1990). Phytochemicals: Differentiation and function. Phytochemistry 29, 1715–1724.

Grabner, M., Muller, U., Gierlinger, N., and Wimmer, R. (2005a). Effects of heartwood extractives on mechanical properties of larch. Iawa J. *26*, 211–220.

Grabner, M., Wimmer, R., Gierlinger, N., Evans, R., and Downes, G. (2005b). Heartwood extractives in larch and effects on X-ray densitometry. Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For. *35*, 2781–2786.

Gregoire, T., Schabenberger, O., and Barrett, J. (1995). Linear modeling of irregularly spaced, unbalanced, longitudinal data from permanent-plot Measurements. Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For. 25, 137-156.

Grosclaude, C. (1993). Pathologie des blessures mettant à nu le bois chez les végétaux ligneux. Agronomie *13*, 441–456.

Guchu, E., Díaz-Maroto, M.C., Díaz-Maroto, I.J., Vila-Lameiro, P., and Pérez-Coello, M.S. (2006). Influence of the species and geographical location on volatile composition of Spanish oak wood (Quercus petraea Liebl. and Quercus robur L.). J. Agric. Food Chem. *54*, 3062–3066.

Guleria, S., Tiku, A.K., Singh, G., Vyas, D., and Bhardwaj, A. (2011). Antioxidant Activity and Protective Effect Against Plasmid DNA Strand Scission of Leaf, Bark, and Heartwood Extracts from Acacia catechu. J. Food Sci. *76*, C959–C964.

Hammerbacher, A., Paetz, C., Wright, L.P., Fischer, T.C., Bohlmann, J., Davis, A.J., Fenning, T.M., Gershenzon, J., and Schmidt, A. (2014). Flavan-3-ols in Norway Spruce: Biosynthesis, Accumulation, and Function in Response to Attack by the Bark Beetle-Associated Fungus Ceratocystis polonica1[C][W][OPEN]. Plant Physiol. *164*, 2107–2122.

Harju, A.M., Venäläinen, M., Laakso, T., and Saranpää, P. (2009). Wounding response in xylem of Scots pine seedlings shows wide genetic variation and connection with the constitutive defence of heartwood. Tree Physiol. *29*, 19–25.

Hart, J.H. (1979). Role of Stilbenes in Resistance of Wood to Decay. Phytopathology *69*, 1138.

Hartonen, K., Parshintsev, J., Sandberg, K., Bergelin, E., Nisula, L., and Riekkola, M.-L. (2007). Isolation of flavonoids from aspen knotwood by pressurized hot water extraction and comparison with other extraction techniques. Talanta *74*, 32–38.

Hasegawa, M., and Shirato, T. (1959). Abnormal constituents of Prunus wood: Isoolivil from the wood of Prunus jamasakura. Jpn. For. Soc. *41*, 1–3.

Hauch, S., and Magel, E. (1998). Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of Robinia pseudoacacia L. are related to cambial wood production and heartwood formation. Planta *207*, 266–274.

Haworth, R.D., and Kelly, W. (1937). The constituents of natural phenolic resins. Part VIII Lariciresinol, cubelien, and some stereochemical relationships. J Chem Soc 384–391.

Hein, S., Makinen, H., Yue, C., and Kohnle, U. (2007). Modelling branch characteristics of Norway spruce from wide spacings in Germany. For. Ecol. Manag. *242*, 155–164.

Hein, S., Weiskittel, A.R., and Kohnle, U. (2008). Branch characteristics of widely spaced Douglas-fir in south-western Germany: Comparisons of modelling approaches and geographic regions. For. Ecol. Manag. *256*, 1064–1079.

Hernandez, R.E. (2007a). Swelling properties of hardwoods as affected by their extraneous substances, wood density, and interlocked grain. Wood Fiber Sci. *39*, 146–158.

Hernandez, R.E. (2007b). Influence of accessory substances, wood density and interlocked grain on the compressive properties of hardwoods. Wood Sci. Technol. *41*, 249–265.

Hernandez, R.E. (2007c). Moisture sorption properties of hardwoods as affected by their extraneous substances, wood density, and interlocked grain. Wood Fiber Sci. *39*, 132–145.

Hillis, W.E. (1960). Factors influencing the formation of phloem and heartwood polyphenols. Holzforschung *14*, 105–110.

Hillis, W.E. (1971). Distribution, properties and formation of some wood extractives. Wood Sci. Technol. *5*, 272–289.

Hillis, W.E. (1975). Ethylene and extraneous material formation in woody tissues. Phytochemistry *14*, 2559–2562.

Hillis, W.E. (1986) Forever Amber-a story of the secondary wood components. Wood Sci. Technol. 20, 203-2227.

Hillis, W., and Hasegawa, M. (1963). The formation of polyphenols in trees I. Administration of c glucose and subsequent distribution of radioactivity. Phytochemistry *2*, 195–199.

Hiltunen, E., Pakkanen, T.T., and Alvila, L. (2004). Phenolic extractives from wood of birch (Betula pendula). Holzforschung *58*, 326–329.

Hiltunen, E., Pakkanen, T.T., and Alvila, L. (2006). Phenolic compounds in silver birch (Betula pendula Roth) wood. Holzforschung *60*, 519–527.

Hiroshi, S. (1982). The structure of domestic and imported woods in Japan - An atlas of scanning electron micrographs.

Holmbom, B., Eckerman, C., Eklund, P., Hemming, J., Nisula, L., Reunanen, M., Sjöholm, R., Sundberg, A., Sundberg, K., and Willför, S. (2003). Knots in trees–a new rich source of lignans. Phytochem. Rev. *2*, 331–340.

Holmbom, T., Reunanen, M., and Fardim, P. (2008). Composition of callus resin of Norway spruce, Scots pine, Eureopean larch and Douglas fir. Holzforschung *62*, 417–422.

Hopia, A., and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. J. Am. Oil Chem. Soc. *76*, 139–144.

Hostettler, F., and Seikel, M. (1969). Lignans of Ulmus thomasii heartwood-II Lignans related to thomasic acid. Tetrahedron *25*, 2325–2337.

Houllier, F., Leban, J., and Colin, F. (1995). Linking Growth Modeling to Timber Quality Assessment for Norway Spruce. For. Ecol. Manag. *74*, 91–102.

Hovelstad, H., Leirset, I., Oyaas, K., and Fiksdahl, A. (2006). Screening analyses of pinosylvin stilbenes, resin acids and lignans in Norwegian conifers. Molecules *11*, 103–114.

Hsieh, C.-Y., and Chang, S.-T. (2010). Antioxidant Activities and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of Phenolic Phytochemicals from Acacia confusa Twigs and Branches. J. Agric. Food Chem. *58*, 1578–1583.

Huang, Y.-S., Hung, L.-F., and Kuo-Huang, L.-L. (2010). Biomechanical modeling of gravitropic response of branches: roles of asymmetric periphery growth strain versus self-weight bending effect. Trees-Struct. Funct. *24*, 1151–1161.

Huang, Z., Zhao, P., Medina, J., Meilan, R., and Woeste, K. (2013). Roles of JnRAP2.6-like from the Transition Zone of Black Walnut in Hormone Signaling. Plos One *8*, e75857.

Hudgins, J.W., and Franceschi, V.R. (2004). Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. Plant Physiol. *135*, 2134–2149.

Hudgins, J.W., Christiansen, E., and Franceschi, V.R. (2003). Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. Tree Physiol. *23*, 361–371.

Hudgins, J.W., Christiansen, E., and Franceschi, V.R. (2004). Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. Tree Physiol. *24*, 251–264.

Hudgins, J.W., McDonald, G.I., Zambino, P.J., Klopfenstein, N.B., and Franceschi, V.R. (2005). Anatomical and cellular responses of Pinus monticola stem tissues to invasion by Cronartium ribicola. For. Pathol. *35*, 423–443.

Imai, K., Mitsunaga, T., Takemoto, H., Yamada, T., Ito, S., and Ohashi, H. (2009a). Extractives of Quercus crispula sapwood infected by the pathogenic fungi Raffaelea quercivora I: comparison of sapwood extractives from noninfected and infected samples. J. Wood Sci. *55*, 126–132.

Imai, K., Yamauchi, K., and Mitsunaga, T. (2013). Extractives of Quercus crispula sapwood infected by the pathogenic fungus Raffaelea quercivora II: isolation and identification of phenolic compounds from infected sapwood. J. Wood Sci. *59*, 517–521.

Imai, T., Sato, M., Takaku, N., Kawai, S., Ohashi, H., Nomura, M., and Kushi, M. (2005). Characterization of physiological functions of sapwood IV: Formation and accumulation of lignans in sapwood of Cryptomeria japonica (L.f.) D. Don after felling. Holzforschung *59*, 418–421.

Imai, T., Asai, K., Takino, M., and Fukushima, K. (2009b). In vitro hydroxylation of a norlignan: From agatharesinol to sequirin C and metasequirin C with a microsomal preparation from Cryptomeria japonica. Phytochem. Lett. *2*, 196–200.

Jayaraman, D., Gilroy, S., and Ané, J.-M. (2014). Staying in touch: mechanical signals in plant–microbe interactions. Curr. Opin. Plant Biol. *20*, 104–109.

Jungnikl, K., Goebbels, J., Burgert, I., and Fratzl, P. (2009). The role of material properties for the mechanical adaptation at branch junctions. Trees *23*, 605–610.

Jyske, T., Laakso, T., Latva-Maenpaa, H., Tapanila, T., and Saranpaa, P. (2014). Yield of stilbene glucosides from the bark of young and old Norway spruce stems. Biomass Bioenergy *71*, 216–227.

Kane, B., Farrell, R., Zedaker, S., Loferski, J.R., and Smith, D.W. (2008). Failure mode and prediction of the strength of branch attachments. Arboric. Urban For. *34*, 308–316.

Kangas, L., Saarinen, N., Mutanen, M., Ahotupa, M., Hirsinummi, R., Unkila, M., Perala, M., Soininen, P., Laatikainen, R., Korte, H., et al. (2002). Antioxidant and antitumor effects of hydroxymatairesinol (HM-3000, HMR), a lignan isolated from the knots of spruce. Eur. J. Cancer Prev. *11*, S48–S57.

Kantola, A., Mäkinen, H., and Mäkelä, A. (2007). Stem form and branchiness of Norway spruce as a sawn timber—Predicted by a process based model. For. Ecol. Manag. *241*, 209–222.

Karppanen, O., Venäläinen, M., Harju, A.M., Willför, S., Pietarinen, S., Laakso, T., and Kainulainen, P. (2007). Knotwood as a window to the indirect measurement of the decay resistance of scots pine heartwood. Holzforschung *61*, 600–604.

Kawamura, F., Mahamud, A., Sulaiman, O., and Hashim, R. (2010). Antifungal Activities of Extracts from Heartwood, Sapwood and Bark of 11 Malaysian Timbers Against Gloeophyllum Trabeum and Pycnoporus Sanguineus. J. Trop. For. Sci. *22*, 170–174.

Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S., and Gérardin, P. (2015a). Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. Ann. For. Sci. *72*, 277–284.

Kebbi-Benkeder, Z., Touahri, N., Colin, F., Dumarçay, S., and Gérardin, P. (2015b) Knotwoods of different wood species as potential sources of valuable natural phenolic compounds. In preparation

Kelsey, R., and Harmon, M. (1989). DISTRIBUTION AND VARIATION OF EXTRACTABLE TOTAL PHENOLS AND TANNINS IN THE LOGS OF 4 CONIFERS AFTER 1 YEAR ON THE GROUND. Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For. *19*, 1030–1036.

Kennedy, D.O., and Wightman, E.L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. Adv. Nutr. Int. Rev. J. *2*, 32–50.

Kenrick, P., and Crane, P.R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. Nature *389*, 33–39.

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

Klein, E. (1992). Verkienung von Asten am Beispiel der Weisstanne-Beobachtungen und schlussfolgerungen. [Resinosis of branches in silver fir: observations and conclusions.]. Allg Forst Jagdz *163*, 182–187.

Knapic, S., and Pereira, H. (2005). Within-tree variation of heartwood and ring width in maritime pine (Pinus pinaster Ait.). For. Ecol. Manag. *210*, 81–89.

Koch, G., Richter, H.-G., and Schmitt, U. (2006). Topochemical investigation on phenolic deposits in the vessels of afzelia (Afzelia spp.) and merbau (Intsia spp.) heartwood. Holzforschung *60*, 583–588.

Köester (1934). Die astreinigung der fichte. Maitteil Forstwirtsch Fortstwiss *5*, 393–416.

Kramer, E.M., and Borkowski, M.H. (2004). Wood grain patterns at branch junctions: modeling and implications. Trees-Struct. Funct. *18*, 493–500.

Kramer, R.D., Sillett, S.C., and Carroll, A.L. (2014). Structural development of redwood branches and its effects on wood growth. Tree Physiol. *34*, 314–330.

Krekling, T., Franceschi, V.R., Krokene, P., and Solheim, H. (2004). Differential anatomical response of Norway spruce stem tissues to sterile and fungus infected inoculations. Trees *18*, 1–9.

Krogell, J., Holmbom, B., Pranovich, A., Hemming, J., and Willfor, S. (2012). Extraction and chemical characterization of Norway spruce inner and outer bark. Nord. Pulp Pap. Res. J. *27*, 6–17.

Krokene, P., Nagy, N.E., and Solheim, H. (2008). Methyl jasmonate and oxalic acid treatment of Norway spruce: anatomically based defense responses and increased resistance against fungal infection. Tree Physiol. *28*, 29–35.

Krutul, D. (1996). Content of mineral substances in knots and wood of scots pine (Pinus silvestris L.). Ann WULS - SGGW For. Wood Technol. *47*, 117–127.

Krutul, D., and Sacharczuk, A. (1997). The content of extractive substances and hemicelluloses in oak (Quercus robur L.) wood. Ann WULS - SGGW For. Wood Technol. *48*, 51–57.

Krutul, D., Zawadzki, Janusz, and Kazem-Bek, D. (2004). The effect of knots on the content of certain chemical substances in the knot-adjacent wood of Quercus robur L. of the youngest age classes. Ann WULS - SGGW For. Wood Technol. *55*, 301–307.

Krutul, D., Zawadzki, J., radomski, A., Zielenkiewicz, T., and Antczak, A. (2007). The content of chemical substances in the bark, rose and wood of common oak (Quercus petraea Liebl.). Ann WULS - SGGW For. Wood Technol. *61*, 382–387.

Kuo, M., and Arganbright, D. (1980a). Cellular-Distribution of Extractives in Redwood and Incense Cedar .2. Microscopic Observation of the Location of Cell-Wall and Cell Cavity Extractives. Holzforschung *34*, 41–47.

Kuo, M., and Arganbright, D. (1980b). Cellular-Distribution of Extractives in Redwood and Incense Cedar .1. Radial Variation in Cell-Wall Extractive Content. Holzforschung *34*, 17–22.

Kuroda, K., Fujiwara, T., Hashida, K., Imai, T., Kushi, M., Saito, K., and Fukushima, K. (2014). The accumulation pattern of ferruginol in the heartwood-forming Cryptomeria japonica xylem as determined by time-of-flight secondary ion mass spectrometry and quantity analysis. Ann. Bot. *113*, 1029–1036.

Kyker-Snowman, T.D., and Wilson, B.F. (1988). Total wood, sapwood, and heartwood in branch bases of three conifers. Can. J. For. Res. *18*, 1332–1336.

Laavola, M., Nieminen, R., Leppanen, T., Eckerman, C., Holmbom, B., and Moilanen, E. (2015). Pinosylvin and Monomethylpinosylvin, Constituents of an Extract from the Knot of Pinus sylvestris, Reduce Inflammatory Gene Expression and Inflammatory Responses in Vivo. J. Agric. Food Chem. *63*, 3445–3453.

Lachenbruch, B., and McCulloh, K.A. (2014). Traits, properties, and performance: how woody plants combine hydraulic and mechanical functions in a cell, tissue, or whole plant. New Phytol. *204*, 747–764.

Lacoste, C., Cop, M., Kemppainen, K., Giovando, S., Pizzi, A., Laborie, M.-P., Sernek, M., and Celzard, A. (2015a). Biobased foams from condensed tannin extracts from Norway Spruce (Picea abies) bark. Ind. Crops Prod. 73, 144-153

Latruffe, N., and Rifler, J.-P. (2013). Bioactive Polyphenols from Grapes and Wine Emphasized with Resveratrol. Curr. Pharm. Des. *19*, 6053–6063.

Lawoko, M., Henriksson, G., and Gellerstedt, G. (2005). Structural Differences between the Lignin−Carbohydrate Complexes Present in Wood and in Chemical Pulps. Biomacromolecules *6*, 3467–3473.

Lee, P.W., and Eom, Y.G. (1988). Anatomical Comparison Between Compression Wood and Opposite Wood in a Branch of Korean Pine (Pinus Koraiensis). IAWA J. *9*, 275–284.

Lee, H., Watanabe, N., Sasaya, T., and Ozawa, S. (1993). Extractives of Short-Rotation Hardwood Species .1. Phenolics of the Wood. Mokuzai Gakkaishi *39*, 1409–1414.

Lemoine, D., Jacquemin, S., and Granier, A. (2002). Beech (Fagus sylvatica L.) branches show acclimation of xylem anatomy and hydraulic properties to increased light after thinning. Ann. For. Sci. *59*, 761–766.

Lev-Yadun, S., and Aloni, R. (1990). Vascular differentiation in branch junctions of trees: circular patterns and functional significance. Trees-Struct. Funct. *4*, 49–54.

Liimatainen, J., Karonen, M., Sinkkonen, J., Helander, M., and Salminen, J.-P. (2012). Characterization of phenolic compounds from inner bark of Betula pendula. Holzforschung *66,* 171-181.

Lindberg, L.E., Willför, S.M., and Holmbom, B.R. (2004). Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. *31*, 137–147.

Little, N.S., Schultz, T.P., and Nicholas, D.D. (2010). Termite-resistant heartwood. Effect of antioxidants on termite feeding deterrence and mortality. Holzforschung *64,* 395-398.

Loers, G., Yashunsky, D.V., Nifantiev, N.E., and Schachner, M. (2014). Neural Cell Activation by Phenolic Compounds from the Siberian Larch (Larix sibirica). J. Nat. Prod. *77*, 1554–1561.

Lowell, E., Maguire, D.a., Briggs, D., Turnblom, E., Jayawickrama, K., and Bryce, J. (2014). Effects of silviculture and genetics on branch/knot attributes of coastal pacific northwest Douglas-fir and implications for wood quality - A synthesis. Forests 5, 1717-1736.

Lundqvist, L., and Elfving, B. (2010). Influence of biomechanics and growing space on tree growth in young Pinus sylvestris stands. For. Ecol. Manag. *260*, 2143–2147.

Luostarinen, K., and Heräjärvi, H. (2013). Relation of arabinogalactans to density, growth rate and shear strength in wood of cultivated Siberian larch. Eur. J. Wood Wood Prod. *71*, 29–36.

Magel, E. (2000). Biochemistry and physiology of heartwood formation. In CELL AND MOLECULAR BIOLOGY OF WOOD FORMATION, R.A. Savidge, J.R. Barnett, and R. Napier, eds. (Bios Scientific Publishers Ltd), pp. 363–376.

Magel, E., and Hübner, B. (1997). Distribution of Phenylalanine Ammonia Lyase and Chalcone Synthase within Trunks of Robinia pseudoacacia L. Bot. Acta *110*, 314–322.

Magel, E., Drouet, A., Claudot, A., and Ziegler, H. (1991). Formation of Heartwood Substances in the Stem of Robinia-Psudoacacia L. I. Distribution of phenylalanine ammonium lyase and chalcone synthase across the trunk. Trees-Struct. Funct. *5*, 203–207.

Magel, E., Jay-Allemand, C., and Ziegler, H. (1994). Formation of heartwood substances in the stemwood of Robinia pseudoacacia L. II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. Trees *8*, 165–171.

Magel, E., Abdel-Latif, A., and Hampp, R. (2001a). Non-structural carbohydrates and catalytic activities of sucrose metabolizing enzymes in trunks of two Juglans species and their role in heartwood formation. Holzforschung *55*, 135–145.

Magel, E.A., Hillinger, C., Wagner, T., and Holl, W. (2001b). Oxidative pentose phosphate pathway and pyridine nucleotides in relation to heartwood formation in Robinia pseudoacacia L. Phytochemistry *57*, 1061–1068.

Makela, A., and Vanninen, P. (2001). Vertical structure of Scots pine crowns in different age and size classes. Trees-Struct. Funct. *15*, 385–392.

Makinen, H., Ojansuu, R., Sairanen, P., and Yli-Kojola, H. (2003). Predicting branch characteristics of Norway spruce (Picea abies (L.) Karst.) from simple stand and tree measurements. Forestry *76*, 525–546.

Manter, D.K., Kelsey, R.G., and Karchesy, J.J. (2007). Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward Phytophthora ramorum. J. Chem. Ecol. *33*, 2133–2147.

Marchal, A., Cretin, B.N., Sindt, L., Waffo-Teguo, P., and Dubourdieu, D. (2015). Contribution of oak lignans to wine taste: chemical identification, sensory characterization and quantification. Tetrahedron *71*, 3148–3156.

Marouf, A., and Reynaud, J. (2007). La botanique de A à Z. 1662 Définitions.

Martone, P., Estevez, J., Lu, F., Ruel, K., Denny, M., Somerville, C., and Ralph, J. (2009). Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. Curr. Biol. *19*, 169–175.

Mayr, S., and Cochard, H. (2003). A new method for vulnerability analysis of small xylem areas reveals that compression wood of Norway spruce has lower hydraulic safety than opposite wood. Plant Cell Environ. *26*, 1365–1371.

Mayr, S., Bertel, C., Dämon, B., and Beikircher, B. (2014). Static and dynamic bending has minor effects on xylem hydraulics of conifer branches (Picea abies, Pinus sylvestris). Plant Cell Environ. 37, 2151-2157.

McCulloh, K., Sperry, J.S., Lachenbruch, B., Meinzer, F.C., Reich, P.B., and Voelker, S. (2010). Moving water well: comparing hydraulic efficiency in twigs and trunks of coniferous, ring-porous, and diffuse-porous saplings from temperate and tropical forests. New Phytol. *186*, 439–450.

McNulty, J., Nair, J.J., Bollareddy, E., Keskar, K., Thorat, A., Crankshaw, D.J., Holloway, A.C., Khan, G., Wright, G.D., and Ejim, L. (2009). Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of Prunus avium and some preliminary biological investigations. Phytochemistry *70*, 2040–2046.

Meredieu, C., and Caraglio, Y. (2002). External indicators of living branches with missing rings within a tree crown of Corsican pine. Forestry *75*, 569–578.

Meydani, M., and Hasan, S.T. (2010). Dietary polyphenols and obesity. Nutrients *2*, 737–751.

Monties, B. (2005). Biological variability of lignin. Cellul. Chem. Technol. *39*, 341–367.

Moreira, X., Zas, R., and Sampedro, L. (2012). Quantitative comparison of chemical, biological and mechanical induction of secondary compounds in Pinus pinaster seedlings. Trees *26*, 677–683.

Morgan, J.W.W., and Orsler, R.J. (1969a). The Interaction of Wood with Organic Solvents. II. Its Significance for Extractive Location. Holzforschung *23*, 48–51.

Morgan, J.W.W., and Orsler, R.J. (1969b). The Interaction of Wood with Organic Solvents. I. The Swelling Behaviour of Beech and Podo with Some Common Solvents. Holzforschung *23*, 1–5.

Morikawa, T., Ashitani, T., Sekine, N., Kusumoto, N., and Takahashi, K. (2012). Bioactivities of extracts from Chamaecyparis obtusa branch heartwood. J. Wood Sci. *58*, 544–549.

Morikawa, T., Ashitani, T., Kofujita, H., and Takahashi, K. (2014). Antitermitic activity of extracts from Chamaecyparis obtusa branch heartwood. Eur. J. Wood Wood Prod. *72*, 651–657.

Mosedale, J.R., Feuillat, F., Baumes, R., Dupouey, J.L., and Puech, J.L. (1998). Variability of wood extractives among Quercus robur and Quercus petraea trees from mixed stands and their relation to wood anatomy and leaf morphology. Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For. *28*, 994–1006.

Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. Anim. Feed Sci. Technol. *91*, 3–20.

Muller, U., Gindl, W., and Jeronimidis, G. (2006). Biomechanics of a branch-stem junction in softwood. Trees-Struct. Funct. *20*, 643–648.

Nagy, N.E., Franceschi, V.R., Solheim, H., Krekling, T., and Christiansen, E. (2000). Wound-induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (Pinaceae): Anatomy and cytochemical traits. Am. J. Bot. *87*, 302–313.

Nagy, N.E., Fossdal, C.G., Krokene, P., Krekling, T., Lonneborg, A., and Solheim, H. (2004). Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. Tree Physiol. *24*, 505–515.

Nagy, N.E., Krokene, P., and Solheim, H. (2006). Anatomical-based defense responses of Scots pine (Pinus sylvestris) stems to two fungal pathogens. Tree Physiol. *26*, 159–167.

Nakaba, S., Yamagishi, Y., Sano, Y., and Funada, R. (2012). Temporally and spatially controlled death of parenchyma cells is involved in heartwood formation in pith regions of branches of Robinia pseudoacacia var. inermis. J. Wood Sci. *58*, 69–76.

Nakada, R., and Fukatsu, E. (2012). Seasonal variation of heartwood formation in Larix kaempferi. Tree Physiol. *32*, 1497–1508.

Narasimhachari, N., and Rudloff, E.V. (1962). The Chemical Composition of the Wood Extractives of Sorbus Decora (sarg.) Schneid. Can. J. Chem. *40*, 1118–1122.

Nault, J. (1988). Radial-Distribution of Thujaplicins in Old Growth and 2nd Growth Western Red Cedar (thuja-Plicata Donn). Wood Sci. Technol. *22*, 73–80.

Navarrete, P., Kebbi, Z., Michenot, F., Lemonon, J., Rogaume, C., Masson, E., Rogaume, Y., and Pizzi, A. (2013). Formaldehyde and VOCs emissions from bio-particleboards. J. Adhes. Sci. Technol. 27, 748-762.

Neacsu, M., Micol, V., Perez-Fons, L., Willfor, S., Holmbom, B., and Mallavia, R. (2007a). A novel antioxidant phenyl disaccharide from Populus tremula knotwood. Molecules *12*, 205–217.

Neacsu, M., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Pietarinen, S.P., Ahotupa, M.O., Holmbom, B.R., and Willför, S.M. (2007b). Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. Eur. J. Wood Wood Prod. *65*, 1–6.

Neely, D. (1991). WATER TRANSPORT AT STEM-BRANCH JUNCTURES IN WOODY ANGIOSPERMS. *17*, 285–290.

Nelson, N.D. (1978). Xylem ethylene, phenol-oxidizing enzymes, and nitrogen and heartwood formation in walnut and cherry. Can. J. Bot. *56*, 626–634.

Nelson, N.D. and Hillis, W.E. (1978). Ethylene and tension wood formation in Eucalyptus gomphocephala. Wood Sci. Technol. 12, 309-315

Newton, M., Lachenbruch, Barbara, Robbins, J., and Cole, E. (2012). Branch diameter and longevity linked to plantation spacing and rectangularity in young Douglas-fir. For. Ecol. Manag. *266*, 75–82.

Niamke, F.B., Amusant, N., Charpentier, J.-P., Chaix, G., Baissac, Y., Boutahar, N., Adima, A.A., Kati-Coulibaly, S., and Jay-Allemand, C. (2011). Relationships between biochemical attributes (non-structural carbohydrates and phenolics) and natural durability against fungi in dry teak wood (Tectona grandis L. f.). Ann. For. Sci. *68*, 201–211.

Nimz, H., Robert, D., Faix, O., and Nemr, M. (1981). C-13 Nmr-Spectra of Lignins .8. Structural Differences Between Lignins. Holzforschung *35*, 16–26.

Obst, J.R. (1998). Special (secondary) metabolites from wood. For. Prod. Biotechnol. 151–165.

Ockels, F.S., Eyles, A., McPherson, B.A., Wood, D.L., and Bonello, P. (2007). Phenolic Chemistry of Coast Live Oak Response to Phytophthora ramorum Infection. J. Chem. Ecol. *33*, 1721–1732.

O'Hara, K.L. (2007). Pruning wounds and occlusion: A long-standing conundrum in forestry. J. For. *105*, 131–138.

Ohashi, H., And Imai, T. (1990). Characterization of physiological Functions of sapwood-synthesis and accumulation of heartwood extractives in the withering process of immature Japanese Cedar trunk. Holzforschung 44, 429-437.

Ohashi, H., Kawai, S., Sakurai, Y., and Yasue, M. (1992). Norlignan from the Knot Resin of Araucaria Angustifolia. Phytochemistry *31*, 1371–1373.

Oven, P., and Torelli, N. (1994). Wound Response of the Bark in Healthy and Declining Silver Firs (Abies Alba). IAWA J. *15*, 407–415.

Pâques, L.E., García-Casas, M. del C., and Charpentier, J.-P. (2012). Distribution of heartwood extractives in hybrid larches and in their related European and Japanese larch parents: relationship with wood colour parameters. Eur. J. For. Res. *132*, 61–69.

Pasch, H., and Pizzi, A. (2002). Considerations on the macromolecular structure of chestnut ellagitannins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. J. Appl. Polym. Sci. *85*, 429–437.

Pearce, R.B. (1996). Antimicrobial defences in the wood of living trees. New Phytol. *132*, 203–233.

Peng, S., Scalbert, A., and Monties, B. (1991). Insoluble Ellagitannins in Castanea-Sativa and Quercus-Petraea Woods. Phytochemistry *30*, 775–778.

Perez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T.A., Linares-Palomino, P.J., Altarejos, J., Nogueras, M., and Sanchez, A. (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (Olea europaea) wood. J. Chromatogr. A *1112*, 311–318.

Pérez-Jiménez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., and Scalbert, A. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. Am. J. Clin. Nutr. *93*, 1220–1228.

Peuhu, E., Paul, P., Remes, M., Holmbom, T., Eklund, P., Sjoholm, R., and Eriksson, J.E. (2013). The antitumor lignan Nortrachelogenin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced cell death by inhibition of the Akt pathway and growth factor signaling. Biochem. Pharmacol. *86*, 571–583.

Phelan, M., Aherne, S.A., Wong, A., and O'Brien, N.M. (2009). Bioactive Properties of Wood Knot Extracts on Cultured Human Cells. J. Med. Food *12*, 1245–1251.

Pietarinen, P., Willför, S.M., Sjöholm, R.E., and Holmbom, B.R. (2005). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 3 : Knots and stemwood of Acacia crassicarpa and A. mangium. Holzforschung *59*, 94–101.

Pietarinen, S.P., Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., and Holmbom, B.R. (2006a). Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. J. Wood Sci. *52*, 436–444.

Pietarinen, S.P., Willför, S.M., Vikström, F.A., and Holmbom, B.R. (2006b). Aspen knots, a rich source of flavonoids. J. Wood Chem. Technol. *26*, 245–258.

Piispanen, R., Willför, S., Saranpää, P., and Holmbom, B. (2008). Variation of lignans in Norway spruce (Picea abies [L.] Karst.) knotwood: within-stem variation and the effect of fertilisation at two experimental sites in Finland. Trees-Struct. Funct. *22*, 317–328.

Pilate, G., Chabbert, B., Cathala, B., Yoshinaga, A., Leple, J.C., Laurans, F., Lapierre, C., and Ruel, K. (2004). Lignification and tension wood. C. R. Biol. *327*, 889–901.

Pinheiro, J., and Bates, D. (2000). Mixed-Effects Models in S ans S-Plus (Springer)

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., and R Core Team (2015). Linear and Nonlinear mixed effects models_R package version 3.1-120 (http://CRAN.R-project.org/package=nlme).

Pizzi, A. (2015). Wood products and green chemistry. Ann. For. Sci. 1-19.

Pohjamo, S.P., Hemming, J.E., Willför, S.M., Reunanen, M.H.T., and Holmbom, B.R. (2003). Phenolic extractives in salix caprea wood and knots. Phytochemistry *63*, 165–169.

Prida, A., and Puech, J.L. (2006). Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European oak woods. J. Agric. Food Chem. *54*, 8115–8126.

Rahman, N., (1968). A course in theoretical statistics (Charles Griffin and Company).

Ralph, S., Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zeznik, J., Nelson, C., and Butterfield, Y.S. (2006). Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (Picea sitchensis) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (Choristoneura

occidentalis) or white pine weevils (Pissodes strobi) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *29*, 1545–1570.

Ralph, S.G., Chun, H., Kolosova, N., Cooper, D., Oddy, C., Ritland, C.E., Kirkpatrick, R., Moore, R., Barber, S., Holt, R.A., et al. (2008). A conifer genomics resource of 200,000 spruce (Picea spp.) ESTs and 6,464 high-quality, sequence-finished full-length cDNAs for Sitka spruce (Picea sitchensis). BMC Genomics *9*, 484.

Ramakrishna, A., and Ravishankar, G.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signal. Behav. *6*, 1720–1731.

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., and Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int. J. Food Microbiol. *56*, 3–12.

Ravber, M., Knez, Ž., and Škerget, M. (2015). Isolation of phenolic compounds from larch wood waste using pressurized hot water: extraction, analysis and economic evaluation. Cellulose 1–17.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing (Vienna).

Reinisalo, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K., and Karjalainen, R.O. (2015). Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. Oxid. Med. Cell. Longev. *2015*, e340520.

Ringman, R., Pilgard, A., Brischke, C., and Richter, K. (2014). Mode of action of brown rot decay resistance in modified wood: a review. Holzforschung *68*, 239–246.

Rosemann, D., Heller, W., and Sandermann, H. (1991). Biochemical plant responses to ozone II. Induction of stilbene biosynthesis in Scots pine (Pinus sylvestris L.) seedlings. Plant Physiol. *97*, 1280–1286.

Ruelle, J. (2014). Morphology, Anatomy and Ultrastructure of reaction wood. In The Biology of Reaction Wood, (Springer), pp. 13–35.

Salmen, L., and Burgert, I. (2009). Cell wall features with regard to mechanical performance. A review COST Action E35 2004-2008: Wood machining - micromechanics and fracture. Holzforschung *63*, 121–129.

Schofield, P., Mbugua, D.M., and Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. Anim. Feed Sci. Technol. *91*, 21–40.

Schultz, T.P., and Nicholas, D.D. (2000). Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. Phytochemistry *54*, 47–52.

Schultz, T.P., and Nicholas, D.D. (2002). Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. Phytochemistry *61*, 555–560.

Schultz, T.P., Nicholas, D.D., and Preston, A.F. (2007). Perspective - A brief review of the past, present and future of wood preservation. Pest Manag. Sci. *63*, 784–788.

Schwarze, F.W.M.R., Lonsdale, D., and Fink, S. (1997). An Overview of Wood Degradation Patterns and Their Implications for Tree Hazard Assessment. Arboric. J. *21*, 1–32.

Schweingruber, F. (1978). Anatomie microscopique du bois : identification de matériel récent et subfossile d' essences de l' Europe centrale en tenant compte de la variabilité de structure du bois de tronc et de branche - [par] Fritz H. Schweingruber ; trad.: Oscar Lenz [et] Roger Amiet (Eidgenössische Anstalt für das forstliche Versuchswesen).

Seikel, M., Hostettler, F., and Johnson, D.. (1968). Lignans of Ulmus Thomasii heartwood-I Thomasic acid. Tetrahedron *24*, 1475–1488.

Sekine, N., Shibutani, S., and Yatagai, M. (2013). Chemical composition of the terpenoids in wood and knots of Abies species. Eur. J. Wood Wood Prod. *71*, 679–682.

Sellier, D., and Fourcaud, T. (2009). Crown structure and wood properties: Influence on tree sway and response to high winds. Am. J. Bot. 96, 885-896.

Sellin, A., Rohejaerv, A., and Rahi, M. (2008). Distribution of vessel size, vessel density and xylem conducting efficiency within a crown of silver birch (Betula pendula). Trees-Struct. Funct. *22*, 205–216.

Sergent, T., Kohnen, S., Jourez, B., Beauve, C., Schneider, Y.-J., and Vincke, C. (2014). Characterization of black locust (Robinia pseudoacacia L.) heartwood extractives: identification of resveratrol and piceatannol. Wood Sci. Technol. *48*, 1005–1017.

Shain, L., and Hillis, W. (1971). Phenolic axtractives in Norway spruce and their effects on Fomes annosus. Phytopathology *61*, 841–845.

Shain, L., and Hillis, W.E. (1973a). Ethylene production in xylem of Pinus radiata in relation to heartwood formation. Can. J. Bot. *51*, 1331–1335.

Shain, L., and Hillis, W.E. (1973b). Physiological and anatomical responses in xylem of Pinus radiata to Sirex-Amylostereum attack. Abstr. Pap. 2nd Int. Congr. Plant Pathol. Minneap. 0696–0696.

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., and Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. J. Bot. J. Bot. *2012, 2012*, e217037.

Shigo, A. (1985). Les défenses de l'arbre. Pour Sci. 69–78.

Shigo, A. (1990). Tree Branch Attachment to Trunks and Branch Pruning. Hortscience *25*, 54–59.

Si, C.-L., Jiang, J.-Z., Liu, S.-C., Hu, H.-Y., Ren, X.-D., Yu, G.-J., and Xu, G.-H. (2013). A new lignan glycoside and phenolics from the branch wood of Pinus banksiana Lambert. Holzforschung *67*, 357–363.

Sicilia, T., Niemeyer, H.B., Honig, D.M., and Metzler, M. (2003). Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. J. Agric. Food Chem. *51*, 1181–1188.

da Silva, A.A., do Nascimento, E.S.P., Cardoso, D.R., and Franco, D.W. (2009). Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit. J. Sep. Sci. *32*, 3681–3691.

Singh, T., and Singh, A.P. (2012). A review on natural products as wood protectant. Wood Sci. Technol. *46*, 851–870.

Smeds, A.I., Eklund, P.C., Sjoholm, R.E., Willfor, S.M., Nishibe, S., Deyama, T., and Holmbom, B.R. (2007). Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. J. Agric. Food Chem. *55*, 1337–1346.

Smeds, A.I., Ceskova, I., Eklund, P.C., and Willför, S.M. (2012a). Identification of new lignans in Norway spruce knotwood extracts. Holzforschung *66*, 553–567.

Smeds, A.I., Eklund, P.C., and Willför, S.M. (2012b). Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. Food Chem. *134*, 1991–1998.

Song, K., Yin, Y., Salmen, L., Xiao, F., and Jiang, X. (2014). Changes in the properties of wood cell walls during the transformation from sapwood to heartwood. J. Mater. Sci. *49*, 1734–1742.

Spathelf, P. (2003). Reconstruction of crown length of Norway spruce (Picea abies (L.) Karst.) and Silver fir (Abies alba Mill.) - technique, establishment of sample methods and application in forest growth analysis. Ann. For. Sci. *60*, 833–842.

Spicer, R., and Gartner, B.L. (1998a). How does a gymnosperm branch (Pseudotsuga menziesii) assume the hydraulic status of a main stem when it takes over as leader? Plant Cell Environ. *21*, 1063–1070.

Spicer, R., and Gartner, B.L. (1998b). Hydraulic properties of Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) branches and branch halves with reference to compression wood. Tree Physiol. *18*, 777–784.

Spicer, R., and Holbrook, N.M. (2007). Parenchyma cell respiration and survival in secondary xylem: does metabolic activity decline with cell age? Plant Cell Environ. *30*, 934–943.

Spilioti, E., Holmbom, B., Papavassiliou, A.G., and Moutsatsou, P. (2014). Lignans 7-hydroxymatairesinol and 7-hydroxymatairesinol 2 exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. Mol. Nutr. Food Res. *58*, 749–759.

Srinivasan, U., Ung, T., Taylor, A.M., and Cooper, P.. (1999). Natural durability and waterborne preservative treatability of tamarack. For. Prod. J. *49*, 82–87.

Stevanovic, T., and Perrin, D. (2009). Chimie du bois.

Stockigt, J., and Klischies, M. (1977). Biosynthesis of Lignans .1. Biosynthesis of Arctiin(3) and Phillyrin(5). Holzforschung *31*, 41–44.

Stokes, A., and Berthier, S. (2000). Irregular heartwood formation in Pinus pinaster Ait. is related to eccentric, radial, stem growth. For. Ecol. Manag. 135, 115-121

Suty, L. (2015). Les végétaux. Les relations avec leur environnement.

Suzuki, S., and Umezawa, T. (2007). Biosynthesis of lignans and norlignans. J. Wood Sci. *53*, 273–284.

Taylor, A.M., Gartner, B.L., and Morrell, J.J. (2002). Heartwood formation and natural durability – a review. Wood Fiber Sci. *34*, 587–611.

Taylor, A.M., Gartner, B.L., and Moreell, J.J. (2003). Co-incident variations in growth rate and heartwood extractive concentrations in Douglas -fir .For. Ecol. Manag. 186, 257-260.

Taylor, A.M., Gartner, B.L., and Moreell, J.J. (2006). Western redcedar extractives: Is there a role for the silviculturist? For. Prod. J. 56, 58-63.

Telewski, F. (1990). Growth wood density, and Ethylene production in response to mechanical perturbation in Pinus Taeda. Can. J. For. Res. -Rev. Can. Rech. For. 20, 1277-1282.

Telewski, F., anf Jaffe, M. (1986). Thigmomorphogenesis - the Role of Ethylene in the response of Pinus Taeda and Abies Fraseri to mechanical perturbation. Physiol. Plan. 66, 227-233.

Tian, L.-W., Xu, M., Li, Y., Li, X.-Y., Wang, D., Zhu, H.-T., Yang, C.-R., and Zhang, Y.-J. (2012). Phenolic Compounds from the Branches of Eucalyptus maideni. Chem. Biodivers. *9*, 123–130.

Timell, T.E. (1982). Recent progress in the chemistry and topochemistry of compression wood. Wood Sci. Technol. 16, 83-122.

Tocquard, K., Lopez, D., Decourteix, M., Thibaut, B., Julien, J.-L., Label, P., Leblanc-Fournier, N., and Roeckel-Drevet, P. (2014). The molecular mechanisms of reaction wood induction. In the Biology of reaction wood, (Springer), pp. 107-138.

Tomppo, L., Tiitta, M., Laakso, T., Harju, A., Venalainen, M., and Lappalainen, R. (2009). Dielectric spectroscopy of Scots pine. Wood Sci. Technol. *43*, 653–667.

Torelli, N., Trajkovic, J., and Sertic, V. (2006). Influence of phenolic compounds in heartwood of silver fir (Abies alba Mill.) on the equilibrium moisture content. Holz Als Roh- Werkst. *64*, 341–342.

Trendelenburg, R. (1936). Aufbau und Eigenschaften des Fichtenholzes und anderer Zellstoffhölzer. Pap.-Fabr. *34*, 1–28.

Tsai, C.-C., Hung, L.-F., Chien, C.-T., Chen, S.-J., Huang, Y.-S., and Kuo-Huang, L.-L. (2012). Biomechanical features of eccentric cambial growth and reaction wood formation in broadleaf tree branches. Trees-Struct. Funct. *26*, 1585–1595.

Turan, B., Tuncay, E., and Vassort, G. (2012). Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies. J. Bioenerg. Biomembr. *44*, 286–296.

Turley, D.B., Chaudhry, Q., Watkins, R.W., Clark, J.H., and Deswarte, F.E.I. (2006). Chemical products from temperate forest tree species—Developing strategies for exploitation. Ind. Crops Prod. *24*, 238–243.

Tyree, M., and Ewers, F. (1991). The Hydraulic Architecture of Trees and Other Woody-Plants. New Phytol. *119*, 345–360.

Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. Phytochem. Rev. *2*, 371–390.

Välimaa, A.L., Honkalampi-Hämäläinen, U., Pietarinen, S., Willför, S., Holmbom, B., and von Wright, A. (2007). Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. Int. J. Food Microbiol. *115*, 235–243.

Vander Mijnsbrugge, K., Beeckman, H., De Rycke, R., Van Montagu, M., Engler, G., and Boerjan, W. (2000). Phenylcoumaran benzylic ether reductase, a prominent poplar xylem protein, is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells. Planta *211*, 502–509.

V. Dellus, A. Scalbert, and G Janin (1997). Polyphenols and Colour of Douglas Fir Heartwood. Holzforschung *51*, 291–295.

Vek, V., Oven, P., and Humar, M. (2013). Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect. Int. Biodeterior. Biodegrad. *77*, 91–97.

Villalobos, D.P., Diaz-Moreno, S.M., Said, E.-S.S., Canas, R.A., Osuna, D., Van Kerckhoven, S.H.E., Bautista, R., Gonzalo Claros, M., Canovas, F.M., and Canton, F.R. (2012). Reprogramming of gene expression during compression wood formation in pine: Coordinated modulation of S-adenosylmethionine, lignin and lignan related genes. Bmc Plant Biol. *12, 100*.

Vinciguerra, V., Luna, M., Bistoni, A., and Zollo, F. (2003). Variation in the composition of the heartwood flavonoids of Prunus avium by on-column capillary gas chromatography. Phytochem. Anal. *14*, 371–377.

Wang, Y., Gril, J., and Sugiyama, J. (2009). Variation in xylem formation of Viburnum odoratissimum var. awabuki: growth strain and related anatomical features of branches exhibiting unusual eccentric growth. Tree Physiol. *29*, 707–713.

Watanabe, N., Sasaya, T., and Ozawa, S. (1992). Extractives of the Genus Corylus I. Lignans from the wood of Corylus sieboldiana blume. Mokuzai Gakkaishi *38*, 796–802.

Watt, M.S., Moore, J.R., and McKinlay, B. (2005). The influence of wind on branch characteristics of Pinus radiata. Trees-Struct. Funct. *19*, 58–65.

Watt, M.S., Downes, G.M., Jones, T., Ottenschlaeger, M., Leckie, A.C., Smaill, S.J., Kimberley, M.O., and Brownlie, R. (2009). Effect of stem guying on the incidence of resin pockets. For. Ecol. Manag. *258*, 1913–1917.

Weiskittel, A.R., Maguire, D.A., and Monserud, R.A. (2007). Modeling crown structural responses to competing vegetation control, thinning, fertilization and swiss needle cast in coastal Douglas-fir of the Pacific Northwest, USA. For. Ecol. Manag. 245, 96-109.

Westing, A.H. (1965). Compression Wood in the Regulation of Branch Angle in Gymnosperms. Bull. Torrey Bot. Club *92*, 62–66.

Wijayanto, A., Dumarçay, S., Gérardin-Charbonnier, C., Sari, R.K., Syafii, W., and Gérardin, P. (2015). Phenolic and lipophilic extractives in Pinus merkusii Jungh. et de Vries knots and stemwood. Ind. Crops Prod. *69*, 466–471.

Willför, S., Hemming, J., Reunanen, M., and Holmbom, B. (2003a). Phenolic and lipophilic extractives in scots pine knots and stemwood. Holzforschung *57*, 359–372.

Willför, S., Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C., and Holmbom, B. (2003b). Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. Holzforschung *57*, 27–36.

Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M., and Holmbom, B. (2004a). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1 : Knots and stemwood of different spruce species. Holzforschung *58*, 335–344.

Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M., and Holmbom, B. (2004b). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2 : Knots and stemwood of fir species. Holzforschung *58*, 650–659.

Willför, S., Reunanen, M., Eklund, P., Sjöholm, R., Kronberg, L., Fardim, P., Pietarinen, S., and Holmbom, B. (2004c). Oligolignans in norway spruce and scots pine knots and norway spruce stemwood. Holzforschung *58*, 345–354.

Willför, S., Eklund, P., Sjöholm, R., Reunanen, M., Sillanpää, R., Von Schoultz, S., Hemming, J., Nisula, L., and Holmbom, B. (2005a). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 4 : Identification of two new 7-hydroxy divanillyl butyrolactol lignans in some spruce, fir, and pine species. Holzforschung *59*, 413–417.

Willför, S., Hafizo˜glu, H., Tümen, I., Yazici, H., Arfan, M., Ali, M., and Holmbom, B. (2007). Extractives of Turkish and Pakistani Tree Species. Holz Als Roh- Werkst. *65*, 215–221.

Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Reunanen, M.H.T., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Eckerman, C.S.E., Pohjamo, S.P., and Holmbom, B.R. (2003c). Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. J. Agric. Food Chem. *51*, 7600–7606.

Willför, S.M., Sundberg, A.C., Rehn, P.W., Holmbom, B.R., and Saranpää, P.T. (2005b). Distribution of lignans in knots and adjacent stemwood of Picea abies. Holz Als Roh- Werkst. *63*, 353–357.

Willför, S.M., Smeds, A.I., and Holmbom, B.R. (2006). Chromatographic analysis of lignans. J. Chromatogr. A *1112*, 64–77.

Witzell, J., and Martin, J.A. (2008). Phenolic metabolites in the resistance of northern forest trees to pathogens - pas experiences and future prospects. Can. J. For. Res. *38*, 2711–2727.

Yang, J., Kamdem, D.P., Keathley, D.E., and Han, K.-H. (2004). Seasonal changes in gene expression at the sapwood—heartwood transition zone of black locust (Robinia pseudoacacia) revealed by cDNA microarray analysis. Tree Physiol. *24*, 461–474.

Yang, X.-W., Li, S.-M., Shen, Y.-H., and Zhang, W.-D. (2008). Phytochemical and biological studies of Abies species. Chem. Biodiv. 5, 56-81.

Yano, H. (1994). The Changes in the Acoustic Properties of Western Red Cedar Due to Methanol Extraction. Holzforschung *48*, 491–495.

Yashunsky, D.V., Men´shov, V.M., Tsvetkov, D.E., Tsvetkov, Y.E., Bel´ko, A.A., Vasiyarov, G.G., Titova, E.V., Pimenov, A.V., Onuchin, A.A., Dokichev, V.A., et al. (2014). Analysis of content of (–)-secoisolariciresinol and related polyphenols in different morphological parts and anatomical structures of larch wood from Siberia. Russ. Chem. Bull. *63*, 2571–2576.

Yatkin, E., Polari, L., Laajala, T.D., Smeds, A., Eckerman, C., Holmbom, B., Saarinen, N.M., Aittokallio, T., and Mäkelä, S.I. (2014). Novel Lignan and Stilbenoid Mixture Shows Anticarcinogenic Efficacy in Preclinical PC-3M-luc2 Prostate Cancer Model. PLoS ONE *9*, e93764.

Yazaki, Y., and Hillis, W.E. (1977). Polyphenolic Extractives of Pinus radiata Bark. Holzforschung *31*, 20–25.

Zhang, B., Cai, J., Duan, C.-Q., Reeves, M.J., and He, F. (2015). A Review of Polyphenolics in Oak Woods. Int. J. Mol. Sci. *16*, 6978–7014.

Zheng, P., Aoki, D., Yoshida, M., Matsushita, Y., Imai, T., and Fukushima, K. (2014a). Lignification of ray parenchyma cells in the xylem of Pinus densiflora. Part I: Microscopic investigation by POM, UV microscopy, and TOF-SIMS. Holzforschung *68*, 897–905.

Zheng, P., Aoki, D., Matsushita, Y., Yagami, S., and Fukushima, K. (2014b). Lignification of ray parenchyma cells in the xylem of Pinus densiflora. Part II: Microchemical analysis by laser microdissection and thioacidolysis. Holzforschung *68*, 907–913.

Zimmermann, M.H. (1978). Hydraulic architecture of some diffuse-porous trees. Can. J. Bot. *56*, 2286–2295.

Zimmermann, M.H. (1983). The hydraulic architecture of plants. In Xylem Structure and the Ascent of Sap, (Springer), pp. 66–82.

Résumé

Le bois est un matériau renouvelable utilisé par l'Homme pour la construction, l'ameublement, la fabrication du papier, l'énergie, etc. Le bois contient des extractibles d'un grand intérêt économique appartenant à diverses familles chimiques telles que les terpènes, les flavonoïdes, les tanins, etc. Les nœuds (base de la branche englobée dans le tronc) de certaines essences sont extrêmement riches en extractibles.

Ce travail a pour objectif l'analyse des variabilités interspécifiques, intraspécifiques et intra-arbre des extractibles nodaux, afin de cibler les essences, les stations et les parties de l'arbre les plus riches. Pour cela, les nœuds de vingt-trois essences, puis ceux de quinze sapins ayant poussé dans des conditions différentes ont été extraits par différents solvants et analysés. Les résultats confirment la richesse des nœuds par rapport au duramen et à l'aubier pour toutes les essences. Globalement, les nœuds des résineux contiennent plus d'extractibles que les feuillus. Les principaux composés identifiés chez les résineux sont des lignanes, des stilbènes, des flavonoïdes et des terpènes. L'acide gallique et des flavonoïdes sont présents chez les feuillus. L'étude du profil vertical montre que les concentrations diminuent de la base du houppier vers la cime de l'arbre. De plus, les résultats mettent en évidence l'influence des conditions de croissance puisque les arbres dominants, et/ou ayant poussé selon des sylvicultures dynamiques sont particulièrement riches en extractibles nodaux. Ces résultats permettent d'envisager la valorisation des coproduits des industries du bois en tant que ressource de molécules bioactives pour diverses applications.

Mots clés : nœud, extractible, lignane, flavonoïde, stilbène, terpène.

Abstract

Wood is a renewable material used by man for construction, furniture, paper making, energy, etc. Wood contains extractives of great economic value which belong to various chemical families such as terpenes, flavonoids, tannins, etc. The knots (base of the branch embedded in the trunk) of some tree species are extremely rich in extractives.

This study aims at analysing the inter-specific, intra-specific and within-tree variabilities of knotwood extractives to target the richest species, stations and tree parts. For that purpose, the knots of twenty-three species and those of fifteen firs grown under different conditions were extracted using several solvents and analysed. The results confirm the richness of knots compared to heartwood and sapwood for all species. Overall softwood knots contain mainly more extractives than hardwoods. The main compounds identified in softwoods are lignans, stilbenes, flavonoids and terpenes Gallic acid and flavonoids are present in hardwoods. The study of the vertical profile shows that concentrations decrease from the base of the crown to the tree tip. In addition, the results highlight the influence of growth conditions since dominant trees and/or those grown according to dynamic silvicultures are particularly rich in knot extractives. These results allow considering the valorisation of wood industries by-products as bioactive molecules resource for various applications.

Keywords: knot, extractive, lignane, flavonoid, stilbene, terpene.