



HAL
open science

Valorisations potentielles des substances extractibles et étude de la composition chimique en relation avec la durabilité naturelle du noisetier du Gabon, *Coula edulis* Baill.

Christ Stone Arnaud Bopenga Bopenga

► **To cite this version:**

Christ Stone Arnaud Bopenga Bopenga. Valorisations potentielles des substances extractibles et étude de la composition chimique en relation avec la durabilité naturelle du noisetier du Gabon, *Coula edulis* Baill.. Chimie. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0075 . tel-02960875

HAL Id: tel-02960875

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02960875v1>

Submitted on 8 Oct 2020

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



THÈSE

En codirection présentée et soutenu publiquement pour l'obtention du grade de

DOCTEUR/PhD DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE (FRANCE)

Ecole doctorale Sciences et Ingénierie des Molécules, des Produits, des Procédés, et de
l'Énergie (SIMPPÉ)

Spécialité : Science du Bois et des Fibres

par

BOPENGA BOPENGA CHRIST STONE ARNAUD

**VALORISATIONS POTENTIELLES DES SUBSTANCES
EXTRACTIBLES ET ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE
EN RELATION AVEC LA DURABILITE NATURELLE DU
NOISETIER DU GABON : *COULA EDULIS BAILL.***

Soutenu publiquement le, **Lundi, 06 Juillet 2020**

Devant la commission d'examen formée de :

Rapporteurs :

Marie-France **THEVENON**

Docteur HDR, CIRAD, Montpellier

Joris **VAN ACKER**

Professeur, Université de Gand

Présidente du Jury et Examinatrice :

Christine **GERARDIN**

Professeur, Université de Lorraine

Examineurs :

Céline **TARNUS**

Professeur, Université de Haute Alsace

Bertrand **CHARRIER**

Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Prosper **EDOU ENGONGA**

Maître de conférences CAMES, ENS Libreville, Co-Directeur de thèse

Stéphane **DUMARÇAY**

Professeur, Université de Lorraine, Co-Directeur de thèse

Philippe **GERARDIN**

Professeur, Université de Lorraine, Directeur de thèse

Invité :

Serge **EKOMY ANGO**

Docteur, Institut de Recherches Technologiques, IRT Libreville

**LERMAB, EA 4370, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies,
Vandœuvre-lès-Nancy, France**

Je dédie cette thèse,

Aux êtres qui me sont les plus chers au monde.

*A ma mère **Moussavou Bernadette** et mon père **Bopenga Ndo Enock** qui ont fait des sacrifices immenses pour moi et mes frères sans rien attendre en retour. Je ne serai sans doute celui que je suis aujourd'hui sans vous. Maman et Papa, je vous aime et je vous dois tout. J'aurai aimé que vous soyez là.*

*A mes frères **Moundounga Gilles Christopher**, **Bopenga Bopenga Eunice Théola**, **Bopenga Bopenga Freid Wilfer**, et **Bopenga Bopenga Jade Esmer** que j'aime profondément.*

*A ma fiancée **Dindzona Audrey Poupina** qui, malgré la distance, est là et m'encourage toujours. Je ne te remercierai jamais assez pour ta grande patience **chérie**.*

*A toute ma **Famille** au Gabon que j'aime énormément.*

*A mes ami(e)s, de **l'USTM** et **l'ENEF** qui sont pour moi des frères, pour les bons moments passés ensemble, je vous remercie énormément et je vous aime tous.*

Vous aurez été fiers de moi.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements et ma reconnaissance aux personnes qui ont rendu possible la réalisation de cette thèse. Cette longue relation entre ma thèse et moi a connu des hauts et des bas, mais j'y ai pris un plaisir énorme.

Je voudrais remercier chaleureusement chacun des membres du jury qui me font le grand honneur d'y participer malgré la distance et leurs nombreuses occupations. Je leur suis très reconnaissant du temps qu'ils y ont consacré.

Merci au Professeur **Joris VAN ACKER**, de l'Université de Gand, rapporteur et au Docteur HDR **Marie-France THEVENON**, CIRAD Montpellier, rapporteur pour l'honneur qu'ils m'ont fait de rapporter et juger mon travail. Merci pour leurs remarques, questions, conseils et apports scientifiques. Ils nous ont permis d'améliorer mon travail.

Merci également au Professeur **Christine GERARDIN**, de l'université de Lorraine, d'avoir accepté d'examiner mon travail et de présider ce jury. Merci également pour ses remarques, questions, conseils et apports scientifiques.

Je tiens également à remercier le Professeur **Céline TARNUS**, de l'université de Haute Alsace et le Professeur **Bertrand CHARRIER** de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour d'avoir accepté d'examiner mon travail. Merci également pour leurs remarques, questions, conseils et apports scientifiques. Ils nous ont permis d'ouvrir de nouvelles perspectives.

Mes remerciements et ma profonde gratitude tout d'abord au Professeur **Philippe GERARDIN**, mon directeur de thèse, d'avoir assuré la direction de ce travail. J'ai apprécié l'autonomie avec laquelle il m'a laissé évoluer, et son ouverture d'esprit vis-à-vis des idées et des directions parfois très hétéroclites. Je lui suis vivement reconnaissant de m'avoir permis d'intégrer et de travailler avec l'équipe du **LERMAB**.

Merci à mes Co-encadrants, d'abord au Professeur **Stéphane DUMARÇAY** de l'équipe du **LERMAB**, Université de Lorraine, pour sa présence inconditionnelle et le temps passé à répondre aux petites questions et grandes interrogations. Sans doute mes connaissances d'analyse chromatographique couplée à la spectrométrie de masse doivent beaucoup à son aide et ses encouragements. Ensuite, à Monsieur **Prosper EDOU ENGONGA**, Maître de Conférences de l'**Ecole Normale Supérieure de Libreville, ENS**, pour avoir bien voulu me suivre dans la réalisation de ce travail. Je tiens à lui exprimer également toute ma profonde

gratitude pour sa disponibilité et ses précieux conseils depuis le début de l'élaboration de mon projet de thèse jusqu'à sa matérialisation pour les différentes corrections apportées.

Merci à Monsieur **Serge EKOMY ANGO**, Docteur et Directeur Général de l'**Institut de Recherches Technologiques de Libreville, IRT au CENAREST**, de m'honorer de sa présence aujourd'hui. Je tiens également à lui exprimer ma gratitude pour sa gentillesse pour m'avoir permis d'utiliser le wifi de la structure dont il a la charge pour mes recherches pour la rédaction de cette thèse durant mon séjour à Libreville.

Je remercie le Docteur **Samuel IKOGOU**, ancien responsable du Master Sciences du Bois de l'**Ecole Nationale des Eaux et Forêts** pour son aide, ses conseils et les échanges fructueux dont j'ai pu bénéficier à ses côtés.

Je remercie également tous les **personnels techniques et scientifiques** du **LERMAB** d'avoir répondu présent à chacune de mes sollicitations. Pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur grande réactivité. J'aurai été bien embêtée sans vous : une mention spéciale à **Manu** qui m'a aidé et dépanné à de nombreuses reprises, mais aussi à **Firmin, Corinne, Laetitia** et **Nicolas**.

Je tiens également à remercier **Kévin Candelier**, toute leur équipe de l'**Unité BioWood** au **CIRAD** à Montpellier à l'origine de tous mes essais termites. J'ai beaucoup appris en votre présence à tous.

Je voudrais également remercier toute ma famille particulièrement mon petits frères **BOPENGA BOPENGA freid-wilfer** présent aujourd'hui pour son soutien inconditionnel surtout durant la période de rédaction du manuscrit.

Merci à mes collègues et amis doctorants ou docteurs. **Jean-léon, Sébastien, Errol, Mahdi, Mirabelle, Clémentine** et **Sarah** pour leur gentillesse, pour les nombreuses conversations enrichissantes que nous avons eues et particulièrement mes collègues de bureau **Walter** et **Henri** qui m'ont souvent dépanné en me trouvant les informations pratiques dont j'avais besoin, à la minute où j'en avais besoin. Merci pour votre gentillesse. D'autres ont également joué un rôle primordial durant ces trois années de thèse, notamment les anciens comme **Joël hamada, Solafa salman** et **Firmin Obounou**. Merci de vos conseils avisés. Les petits «nouveaux» : **Clément, David** à qui je souhaite toute la réussite possible.

Merci à mes proches, mes amis, à ceux qui ont eu la gentillesse d'être présents ce jour pour assister à ma soutenance !

Merci également et pardon à tous ceux que j'oublie...

LISTE DES ABREVIATIONS

AA: Activité Antioxydante des extractibles

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

ABTS: 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

AIBN: azobisisobutyronitrile

ATR: réflectance totale atténué

AU: Aubier

BHT: 2,6-di-tert.butyl-4-methyl-phénol

BSTFA/TMCS: N,O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide/triméthylchlorosilane

CE₅₀: Concentration efficace pour consommer 50% du radical

CIRAD: Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

Comifac: Commission des Forêts d'Afrique Centrale

CP: *Coniophora Puteana*

CTFT: Centre Technique Forestier Tropical

DE: Duramen externe

DI: Duramen interne

DM: Duramen médian

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FTIR: Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier

g/L: gramme par litre

GC/MS: chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GT: *Gloeophyllum trabeum*

H: Teneur en humidité

LERMAB: Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois

M: Molarité

M: Moelle

m_b : Masse du ballon vide

m_{b+e} : Masse du ballon avec les extractibles

mg Ecat g⁻¹ d'extrait sec : milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait sec

mg EGA g⁻¹ d'extrait sec: milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extractible sec

m_s : masse de sciure sèche extraite.

PM: Perte de masse

PM_{ter} : Pertes de masse dues aux attaques des termites

ppm: partie par million

PS: *Pycnoporus Sanguineus*

RP: *Rhodonina Placenta*

TV: *Trametes Versicolor*

ZT: *Zone de transition*

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES ABREVIATIONS	v
SOMMAIRE	vii
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
INTRODUCTION	2
CHAPITRE I	6
REVUE BIBLIOGRAPHIE	6
I.1. Rappels sur le matériau bois : Structure et Anatomie	6
I.2. Composition chimique du bois.....	8
I.2.1. La cellulose	8
I.2.2. Les hémicelluloses	10
I.2.3. La lignine	12
I.2.4. Les extractibles dans le bois	13
I.2.4.1. Les composés terpéniques	14
I.2.4.2. Les composés phénoliques	16
I.2.4.2.1. Les phénols simples.....	16
I.2.4.2.2. Les flavonoïdes.....	17
I.2.4.2.3. Les stilbènes	20
I.2.4.2.4. Les quinones	21
I.2.4.2.4. Les lignanes	22
I.2.4.2.4. Les tannins.....	23
I.2.4.2.5. Les substances minérales.....	25
I.3. Durabilité naturelle.....	25
I.3.1. Notion de la durabilité naturelle	25
I.3.2. Evaluation de la durabilité naturelle vis-à-vis des champignons lignivores.....	26

I.3.3. Evaluation de la durabilité naturelle vis-à-vis des termites.	27
I.3.4. Origine de la durabilité naturelle	28
I.3.4.1. Facteurs chimiques	28
I.4. Agents biologiques de détérioration du bois	30
I.4.1. Les champignons de dégradation du bois	30
I.4.1.1. Les champignons de décoloration	30
I.4.1.2. Les champignons lignivores de pourritures.....	31
I.4.1.2.1. Les pourritures blanches	32
I.4.1.2.2. Les pourritures brunes.....	32
I.4.1.2.3. Les pourritures molles.....	33
I.4.2. Les insectes xylophages.....	34
I.4.2.1. Les insectes de bois frais	34
I.4.2.2. Les insectes de bois secs.....	34
I.4.2.3. Les termites	34
I.5. Valorisation des extractibles de bois	36
I.5.1. Valorisations industrielles des extractibles de bois.....	36
I.5.2. Activités antioxydante et antiradicalaire des extractibles	37
I.5.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante et anti-radicalaire	40
I.5.4. Description de l'essence étudiée	44
CHAPITRE II.....	48
MATERIELS ET METHODES	48
II.1. Matériels.....	48
II.1.1. Produits chimiques	48
II.1.2. Champignons	48
II.1.3. Termites	49
II.1.4. Matériel végétal	49
II.2. Méthodes	50

II.2.1 Composition chimique.....	50
II.2.1.1. Teneur en cellulose	51
II.2.1.2. Teneur en holocellulose	51
II.2.1.3. Teneur en lignine.....	52
II.2.2. Extraction des sciures	52
II.2.2.1. Extraction au Soxhlet	52
II.2.2.2. Extraction au Dionex ASE 350	52
II.2.3. Analyses chimiques	54
II.2.3.1. Analyse FTIR	54
II.2.3.2. Criblage phytochimique	55
II.2.3.3. Dosage des composés phénoliques	56
II.2.4. Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).....	59
II.2.5. Essais de durabilité naturelle	60
II.2.5.1. Préparation des éprouvettes de bois	60
II.2.5.2. Confrontation des éprouvettes aux champignons basidiomycètes.....	61
II.2.5.3. Confrontation des éprouvettes aux termites <i>Reticulitermes flavipes</i>	63
II.2.6. Essais de durabilité conféré par extrait de <i>C.edulis</i>	64
II.2.6.1. Imprégnation des éprouvettes	64
II.2.6.2. Imprégnation des éprouvettes	64
II.2.6.3. Confrontation des éprouvettes vis-à-vis des champignons basidiomycètes et des termites <i>Reticulitermes flavipes</i>	65
II.2.7. Activité antifongique : effet des extractibles sur la croissance des champignons..	66
II.2.7.1. Préparation des milieux gélosés	66
II.2.7.2. Préparation des différentes concentrations d'extractibles et mélanges aux milieux gélosés	66
II.2.7.3. Inoculation de la souche fongique.....	67
II.2.8. Activité anti-termite des extractibles	67

II.2.9. Activité antioxydante des extractibles	68
II.2.9.1. Méthode avec le radical libre DPPH.....	68
II.2.9.2. Méthode avec le radical cationique libre ABTS ⁺	69
CHAPITRE III	71
VARIABILITE INTRA-ARBRE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE,	
QUANTIFICATION ET CARACTERISATION DES SUBSTANCES EXTRACTIBLES	
.....	71
III.1. Variabilité intra-arbre de la composition chimique	71
III.2. Quantification et caractérisation des substances extractibles	73
III.2.1. Teneur en extractibles	73
III.2.2. Analyses infrarouges FTIR des extractibles.....	75
III.2.3. Criblage phytochimique	79
III.2.4. Dosage des phénols totaux	81
III.2.5. Dosage des proanthocyanidines et des flavonoïdes	82
III.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ..	83
III.3.1. Extractibles identifiés au niveau de l'écorce.....	83
III.3.2. Extractibles identifiés au niveau de l'aubier de <i>C.edulis</i>	86
III.3.2. Extractibles identifiés au niveau du bois de cœur de <i>C.edulis</i>	87
CHAPITRE IV	91
DURABILITE NATURELLE ET DURABILITE CONFEREES PAR LES SUBSTANCES	
EXTRACTIBLES.....	91
IV.1. Durabilité naturelle du bois de cœur de <i>C.edulis</i> vis-à-vis des champignons	91
IV.2. Durabilité conférée par les extraits de duramen de <i>C.edulis</i> à des essences peu durables	
.....	95
IV.3. Durabilité naturelle du bois de cœur de <i>C.edulis</i> et durabilité conférée par les extraits	
de <i>C.edulis</i> à des essences peu durables vis-à-vis des termites.	98
CHAPITRE V	102

ACTIVITE ANTIFONGIQUE, ANTI-TERMITE ET ANTIOXYDANTES DES SUBSTANCES EXTRACTIBLES	102
V.1. Activité antifongique : effet des extractibles sur la croissance des champignons basidiomycètes.....	102
V.2. Effet des extractibles sur les termites <i>Reticulitermes flavipes</i>	113
V.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extractibles de <i>C.edulis</i>	117
CONCLUSION.....	120
PERSPECTIVES.....	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	126
RESUME.....	147
ABSTRACT	147
ANNEXES.....	148

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Teneur en cellulose des parois de différents végétaux (Sjöström, 1993 ; Roggenstein, 2011).....	10
Tableau 2: Classes de durabilité naturelle du bois vis-à-vis des champignons lignivores en fonction des pertes de masse moyenne et relative (norme EN 350-1,1994).	26
Tableau 3: Taux d'extraits (moyenne de trois essais \pm écart-type) obtenu au Soxhlet.....	73
Tableau 4: Taux d'extraits (moyenne de trois essais \pm écart-type) obtenu au Dionex	73
Tableau 5: Criblage phytochimique des extraits obtenus par extractions successives.	80
Tableau 6: Teneur en phénols totaux des différents extraits obtenus au Soxhlet (moyenne de trois essais \pm écart-type)	81
Tableau 7: Teneur en phénols totaux des différents extraits obtenu au Dionex (moyenne de trois essais \pm écart-type)	81
Tableau 8: Teneur en tannins condensés et en flavonoïdes (moyenne de trois essais \pm écart-type).....	82
Tableau 9: Composés identifiés dans les extraits de l'écorce de <i>C.edulis</i>	85
Tableau 10: Composés identifiés dans les extraits de l'aubier de <i>C.edulis</i>	87
Tableau 11: Composés identifiés dans les extraits de l'aubier de <i>C.edulis</i>	89
Tableau 12: Pertes de perte de masse corrigées après 16 semaines d'exposition à différents agents de pourriture (moyenne de 12 essais \pm écart type).....	91
Tableau 13: Classification de la durabilité basée sur la norme EN 350-1, 1994	93
Tableau 14: Teneur en humidité après 16 semaines d'exposition à différents agents de pourriture(moyenne de 12 essais \pm écart type).....	95
Tableau 15: Résultats des essais de durabilité des différents blocs de bois <i>C.edulis</i> extraits ou non extraits et hêtre ou pin imprégnés ou non imprégnés d'extraits de <i>C.edulis</i> à 5 ou 10% vis à vis des termites (moyenne de 6 essais \pm écart type)	99
Tableau 16: Activité anti-termite des différentes fractions d'extraits de <i>C.edulis</i> vis-à-vis de <i>Reticulitermes flavipes</i> (moyenne de 3 essais \pm écart type).	114
Tableau 17: Activités antioxydantes par dosage du radical DPPH.....	117
Tableau 18: Activités antioxydantes par dosage du radical ABTS+	117

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma de coupe transversale d'un tronc d'arbre. Copyright University of Cambridge, DoITPoMS 2019.	7
Figure 2: Structure chimique de la cellulose (a) et configuration hypothétique des régions cristallines et amorphes dans les nanofibrilles de cellulose (b). (Tayeb et al, 2018, corrigé et modifié).	8
Figure 3: Structure cristalline de la cellulose I avec projection axiale.....	9
Figure 4: Structure cristalline de la cellulose I avec les liaisons hydrogène entre les chaînes de cellulose en projection plane.	9
Figure 5: Unités structurelles des hémicelluloses (Pereira, 2007).	11
Figure 6: Structure partielle des xylanes du bois des feuillus (a) et des mannanes du bois des résineux (b).....	11
Figure 7: Monomères intervenant dans la structure de la lignine.	12
Figure 8: Structure chimique représentative de la lignine (Adler, 1977).....	13
Figure 9: Biosynthèse de l'unité en C ₅ des composés terpéniques.	14
Figure 10: Terpènes et terpénoïdes isolés des bois de résineux et de feuillus.	15
Figure 11: Composés phénoliques simples isolés des bois des résineux et des feuillus.	17
Figure 12: Différentes familles de flavonoïdes rencontrées dans le bois.....	18
Figure 13: Structure, Dihydromorine, Aromadendrine, (-)-Mesquitol.	18
Figure 14: Structure de la 3,4,7,8-tetrahydroxyflavanone, 4,7,8-trihydroxyflavanone, naringénine.	19
Figure 15: Structures des santalines A, B, Y et AC.	20
Figure 16: Isomères du 1,2-diphényléthène.	20
Figure 17: Structures de stilbènes ayant des propriétés intéressantes.	21
Figure 18: Structures des quinones rencontrées dans le bois de Teck.	22
Figure 19: Structure de composés quinoliques isolés, et responsables de la durabilité naturelle de certains bois	22
Figure 20: Structures de lignanes extraits du bois de résineux et de feuillus.....	23
Figure 21: Structures de quelques tannins hydrolysables.	24
Figure 22: Structures de tannins condensés.	25
Figure 23: Attaque du bois par les échauffures.....	31
Figure 24: Bleuissement primaire sur du bois fraîchement scié.	31
Figure 25: Aspect du bois attaqué par de la pourriture brune.	33

Figure 26: Bois envahi par le mycélium de pourriture blanche.	33
Figure 27: Vue au microscope de l'impact de la pourriture molle.	33
Figure 28: Photographies de termites ; de gauche à droite : Ouvrier, Soldat, Nymphe et Adulte ailé.....	35
Figure 29: Cycle de développement des termites souterrains.....	35
Figure 30: Structure des antioxydants de synthèse autorisés dans l'industrie agroalimentaire.	39
Figure 31: Structures de quelques antioxydants naturels.....	40
Figure 32: Mécanisme réactionnel de réduction du radical DPPH.....	41
Figure 33: Mécanisme réactionnel d'oxydation de l'ABTS.	42
Figure 34: Carte de distribution de <i>Coula edulis</i> . Source : www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details	46
Figure 35 : Bois sur pieds de <i>Coula edulis</i>	46
Figure 36: Protocole d'échantillonnage des rondins.....	49
Figure 37: Dimensionnement des différents rondins.....	50
Figure 38: Schéma du processus d'extraction ASE.....	54
Figure 39: (a) Spectrophotomètre infrarouge Nicolet 6700 FT-IR Thermo-Scientific ; (b) Ordinateur de pilotage.....	55
Figure 40: Courbe d'étalonnage : absorbance à 760 nm avec comme standard l'acide gallique.	57
Figure 41: Courbe d'étalonnage : absorbance à 500 nm avec comme standard la catéchine .	58
Figure 42: Courbe d'étalonnage : absorbance à 415 nm avec comme standard la catéchine .	59
Figure 43: Appareil GC/MS.....	60
Figure 44: (a) Eprouvettes poncées 30×10×5 mm ³ ; (b) Extraction des éprouvettes au Soxhlet	61
Figure 45: (a) Inoculation du champignon ; (b) colonisation de la boîte par le mycélium.....	61
Figure 46: Confrontation des éprouvettes de bois aux différents champignons	62
Figure 47: Schéma du procédé d'imprégnation	64
Figure 48: Confrontation des éprouvettes (a) aux termites ; (b) aux différents champignons	65
Figure 49: Milieux gélosés : (a) avant stérilisation ; (b) après stérilisation à l'autoclave.....	66
Figure 50: Essais termites sur papier Whatman.....	68
Figure 51: Variabilité intra-arbre de la composition chimique (moyenne trois essais ± écart-type) des différents compartiments en bois sur la section transversale à partir des rondins : M, DI, DM, DE, TZ, AU	71

Figure 52: Analyses infrarouges des fractions d'extractibles de l'écorce de <i>C.edulis</i>	76
Figure 53: Analyses infrarouges des fractions d'extractibles du duramen de <i>C.edulis</i>	77
Figure 54: Analyses infrarouges des fractions d'extractibles de l'aubier de <i>C.edulis</i>	78
Figure 55: Analyse GC/MS des extraits de l'écorce de <i>C.edulis</i> : (a) extraits dichlorométhane ; (b) extraits acétone ; (c) extraits toluène/éthanol	84
Figure 56: Analyse GC/MS des extraits de l'aubier <i>C.edulis</i> : (a) extraits dichlorométhane ; (b) extraits acétone ; (c) extraits toluène/éthanol	86
Figure 57: Analyse GC/MS des extraits du duramen de <i>C.edulis</i> : (a) extraits dichlorométhane ; (b) extrait acétone ; (c) extrait toluène/éthanol	88
Figure 58: (a) blocs extraits et non extraits exposés à <i>PS</i> ; (b) blocs extraits et non extraits exposés à <i>TV</i> ; (c) blocs extraits et non extraits exposés à <i>RP</i> ; (d) blocs extraits et non exposés à <i>CP</i>	94
Figure 59: Pertes de masses des éprouvettes de pin ou de hêtre imprégnées ou non avec des extraits de <i>C.edulis</i> après exposition aux différents agents de pourriture brune. (a) <i>Rhodonia</i> <i>placenta</i> ; (b) <i>Coniophora puteana</i> ; (c) <i>Gloephyllum trabeum</i>	96
Figure 60: Pertes de masses des éprouvettes de pin ou de hêtre imprégnées ou non avec des extraits de <i>C.edulis</i> après exposition aux différents agents de pourriture blanches. (a) <i>Trametes</i> <i>versicolor</i> ; (b) <i>Pycnoporus sanguineus</i>	97
Figure 61: Effet des extractibles sur la croissance de <i>Rhodonia placenta</i>	103
Figure 62: Effet des extractibles sur la croissance de <i>Coniophora puteana</i>	104
Figure 63: Effet des extractibles sur la croissance de <i>Gloephyllum trabeum</i>	105
Figure 64: Effet des extractibles sur la croissance de <i>Trametes versicolor</i>	107
Figure 65: Effet des extractibles sur la croissance de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	108
Figure 66: Quelques aspects des observations visuelles effectuées lors des différents essais sur les champignons testés	111
Figure 67: Effet des standards d'acides gallique et ellagique sur la croissance des différents champignons (a) : <i>R. placenta</i> , (b) <i>C. puteana</i> , (c) <i>T.versicolor</i> et (d) <i>P.sanguineus</i>	112
Figure 68: Aspect des papiers Whatman imprégnés d'extraits d'écorce après exposition aux termites. (a) extrait aqueux ; (b) extrait acétone ; (c) extrait toluène/éthanol ; (d) extrait dichlorométhane.....	116

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

La forêt et sa diversité chimique gigantesque constituent un réservoir immense de molécules bioactives au potentiel thérapeutique vaste. Depuis les années 1940 à nos jours, la plupart des médicaments sont issus des dérivés ou inspirés de substances naturelles. Selon [Newman et Cragg, 2007](#), si l'on considère uniquement les petites molécules (sont exclus les vaccins et les composés biologiques), près de 52% de médicaments actuels sont constitués ou dérivés de produits naturels. Aujourd'hui, grâce aux avancées scientifiques dans le domaine de la valorisation des substances naturelles issues des plantes (feuilles, écorces, sciures de bois), il est aisément possible d'envisager à terme que des produits de la chimie verte, substituables et compétitifs, remplacent ceux issus des matières fossiles, dans les domaines des énergies, des matériaux et de la chimie fine. Ces matières fossiles étant en voie d'épuisement, les chercheurs se tournent ainsi vers des sources facilement renouvelables comme le bois pour le développement des produits respectueux de l'Homme et de l'environnement. La forêt gabonaise qui fait partir des forêts du bassin du Congo est l'une des plus grandes forêts d'Afrique après celle de la République Démocratique du Congo et du Cameroun. Le bassin du Congo, avec 227 millions d'hectares de forêts, abrite la deuxième plus grande forêt tropicale du monde après le bassin de l'Amazonie. Il est très riche en biodiversité avec plus de 10 000 espèces de plantes ([Comifac, 2010](#)). D'après l'Agence gabonaise d'études et d'observations spatiales ([Ageos, 2016](#)), la forêt gabonaise représente près de 80% du territoire national du pays avec près de 400 essences de bois potentiellement valorisables dans le domaine de la chimie du bois mais dont une petite minorité seulement (environ une dizaine) a fait l'objet d'une étude approfondie dans ce domaine. Pourtant plusieurs essences sont considérées, à tort ou à raison d'essences secondaires ; c'est le cas du noisetier du Gabon (*Coula edulis*) qui restent méconnues des industriels et des chercheurs en sciences du bois au Gabon. Les bois tropicaux sont considérés comme des essences nobles pour plusieurs raisons : d'abord pour leurs propriétés supérieures aux bois des essences de climat tempéré permettant de les utiliser dans la construction pour les emplois soumis à de fortes sollicitations ([Fouquet, 2009](#)). Ensuite, pour leur durabilité naturelle, leur forte densité, leur dureté et surtout leur richesse en extractibles qui leur confère la forte couleur qui les caractérisent.

Pour les populations locales au Gabon, le noisetier est une essence à usages multiples. Très durable et résistant aux attaques des champignons, des insectes et plus particulièrement à celles des termites, le bois de *C.edulis* est apprécié des populations pour sa longévité ([Tchatat, 1999](#)). C'est surtout dans la pharmacopée traditionnelle que les populations lui réservent un domaine

de prédilection, il intervient *via* son écorce (utilisée en décoction) comme plante médicinale pour le traitement de nombreuses maladies (Walker et al, 1995). En côte d'ivoire, l'écorce de *C.edulis* est utilisée en décoction pour la purgation ou comme lavement et contre les douleurs lombaires ou maux de reins (Téké et al, 2005). Avec toutes ces qualités, le bois de *C.edulis* présente un réel potentiel de valorisation aussi bien dans le domaine des matériaux que pour la valorisation chimique des molécules présentes dans ses extractibles.

Si les connaissances qui entourent la chimie du bois sont peu ou pas connues au Gabon, cette dernière est en plein essor en Europe et au Canada notamment pour ce qui concerne la valorisation des substances extractibles. On désigne par le terme « extractibles » la large gamme de molécules que l'on peut extraire du bois à l'aide de solvants organiques ou même à l'eau. Plusieurs études ont montré que ces derniers pouvaient être valorisés dans des secteurs très divers comme la pharmacie, la cosmétique, l'agroalimentaire, la préservation du bois, les adhésifs et les résines (colles, vernis, peintures etc...). Un exemple est celui des tannins hydrolysables de chêne très connus pour leur activité antioxydante, antiseptique, anticancéreux et de prévention contre les maladies cardio-vasculaires. L'hydroxymatairésinol, extrait des nœuds de l'épicéa est un excellent additif alimentaire qui permet de lutter contre le cancer de la prostate et le cancer du sein (Stevanovic et al, 2009 ; Amarowicz et al, 2008). L'aspirine, qui est un dérivé de l'acide salicylique initialement extraite de l'écorce du *Salix sp*, est utilisée comme antipyrétique, anti-inflammatoire, analgésique et anticoagulant en pharmacie et en nutraceutique.

Selon (Mburu et al, 2007 ; Nzokou et al, 2005 ; Saha Tchinda et al, 2018 et Steve Mounquengui et al, 2016), de nombreux bois tropicaux renferment des taux élevés en extractibles, ce qui renforce particulièrement leur intérêt dans l'optique de leur valorisation. Les différentes molécules extraites pourraient en fonction de leurs propriétés être valorisées soit comme agents antioxydants en cosmétique, soit comme agents antifongiques ou anti-termites pour la protection du bois, soit comme principes actifs dans le domaine de la médecine ou de la pharmacie, soit comme colorants naturels ou comme substances antiseptiques. D'un autre point de vue, une meilleure connaissance de la durabilité naturelle des bois tropicaux en général et ceux du Gabon en particulier, permettrait une utilisation optimale de ces essences.

Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant d'étudier plus en détail le bois du noisetier du Gabon *C. edulis* qui est une essence secondaire largement répandue au Gabon et utilisée par les populations locales du fait de la durabilité et la qualité de son bois et de l'apport nutritionnel lié à la consommation de ses fruits. Ce travail a pour objectif général de comprendre le rôle des

substances extractibles de *C. edulis* sur sa durabilité naturelle tout en étant à la recherche de potentiel composés biocides dans l'optique de leurs valorisations en préservation du bois, en pharmacologie, en cosmétique, en agro-alimentaire, etc... et avec pour objectifs spécifiques de :

- Etudier la variabilité intra-arbre de sa composition chimique ;
- Quantifier et caractériser la nature des différentes substances extractibles présentes dans les différentes parties du bois de *C.edulis* ;
- Déterminer les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes, et tannins présents dans les différentes substances extractibles;
- Etudier la durabilité naturelle du bois de cœur de *C.edulis* vis-à-vis des champignons basidiomycètes et des termites. Ainsi que la durabilité conférée suite à l'imprégnation des extraits de *C.edulis* à des éprouvettes de hêtre et d'aubier de pin sylvestre;
- Etudier les effets antifongiques, anti-termites et antioxydants des substances extractibles afin de mieux comprendre la durabilité naturelle de cette essence d'une part et d'autre part, les valoriser.

Ce manuscrit de thèse est subdivisé en cinq chapitres :

- ❖ **Le premier chapitre** est essentiellement bibliographique , passant par un bref rappel sur le matériau bois, aux différents agents de détérioration du bois, la valorisation des extractibles jusqu'à la description de l'essence étudiée.
- ❖ **Le deuxième chapitre** est entièrement consacré à la partie expérimentale avec la description des différentes méthodes et matériels utilisés nécessaires à la réalisation de ces travaux.
- ❖ **Le troisième chapitre** présente les résultats sur la variabilité intra-arbre de la composition chimique du bois de *C.edulis*, la quantification et la caractérisation des différentes substances extractibles, les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes, et tannins présents dans les différentes substances extractibles.
- ❖ **Le quatrième chapitre** présente les résultats de la durabilité naturelle du bois de cœur de *C.edulis* vis-à-vis des champignons basidiomycètes et des termites ainsi que la durabilité conférée à des éprouvettes de hêtre et d'aubier de pin sylvestre.
- ❖ **Le cinquième chapitre** présente les résultats des propriétés antifongiques, anti-termites et antioxydantes des extractibles en vue de leurs valorisations potentielles.

Une conclusion générale ainsi qu'une ouverture sur les perspectives potentielles sont proposées à la fin de cette thèse et termine le document.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I REVUE BIBLIOGRAPHIE

I.1. Rappels sur le matériau bois : Structure et Anatomie

Produit par l'arbre, le bois est un matériau naturel différemment défini selon l'utilisateur et l'intérêt porté. Pour le biologiste, le bois est le xylème secondaire qui assure la conduction de la sève brute chez les plantes ligneuses Gymnospermes (conifères) et Angiospermes (feuillus) Dicotylédones. Chez les plantes pérennes (arbres, arbustes et buissons), le xylème secondaire ou bois se développe chaque année et forme un tissu résistant qui assure à la fois la conduction de la sève et la résistance mécanique de la plante. L'anatomiste le distingue en bois homoxylé (caractéristique des Gymnospermes) et bois hétéroxylé (caractéristique des Angiospermes dicotylédones). Le bois des Gymnospermes est dit homoxylé parce qu'il ne contient que des trachéides qui assurent à la fois le soutien mécanique et la conduction de la sève. Le bois des Angiospermes lui, est dit hétéroxylé et contient plusieurs éléments verticaux : les fibres (et/ou fibres-trachéides, trachéide) pour le soutien et, les vaisseaux et parenchyme qui assurent la conduction. Mais pour les spécialistes du "matériau bois", les bois se distinguent selon leurs propriétés physiques, mécaniques et chimiques mais aussi par bon nombre de propriétés particulières (durabilité naturelle, veinage, couleur, etc.) qui amènent le spécialiste à choisir les bois en fonction de leur utilisation. C'est un matériau qui présente des caractéristiques assez singulières. Il est anisotrope, à la fois hétérogène, en raison d'une part des cellules qui le composent qui sont de nature et de formes différentes et d'autre part de ses propriétés physiques, mécaniques et chimiques qui varient horizontalement et verticalement pour une essence donnée voire pour un arbre. Il est hygroscopique, susceptible de perdre ou de prendre de l'humidité en fonction de du milieu. Sa composition chimique, ses propriétés physiques et mécaniques varient avec l'espèce, à l'intérieur d'une même espèce, en fonction de l'origine géographique et de la position dans l'arbre (Mounguengui, 2008). C'est un matériau biodégradable constitué de carbone, hydrogène, oxygène et azote (Nguila et al, 2006). On divise le bois en deux grandes catégories : celui des gymnospermes, communément appelés conifères et les angiospermes correspondant aux feuillus. Ces deux grandes familles renferment chacune des milliers d'espèces différentes. Le bois est majoritairement constitué de trois polymères : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Il renferme également des substances organiques de faible poids moléculaire appelées substances extractibles ou métabolites secondaires et aussi des substances inorganiques correspondant aux cendres obtenus après combustion du bois (Mounguengui, 2008). La proportion relative de ces constituants varie d'une essence à une autre, mais aussi à l'intérieur d'une même essence. Ils ne sont pas répartis uniformément dans le bois et leurs taux

varient en fonction de la partie de l'arbre étudiée. Les essences tropicales contiennent sensiblement 85 à 90% des trois polymères à cause de la présence de taux élevés des substances extractibles alors que les essences tempérées contiennent environs 90 à 97% de ces polymères (Mounguengui, 2008). En général le taux de cellulose varie de 40 à 45% chez les feuillus et résineux ; celui des hémicelluloses de 25 à 30% chez les résineux et de 30 à 35% chez les feuillus ; le taux de lignine varie de 25 à 30% chez les résineux et de 15 à 25% chez les feuillus. Les substances extractibles représentent environ 2 à 5% de la composition des bois de résineux, 3 à 8% des bois des feuillus de zones tempérées et jusqu'à 18 à 22% des bois tropicaux (Huang et al, 2009). Ces substances extractibles sont constituées de cires, de graisses, de terpènes et terpénoïdes, d'acides gras, de monosaccharides et de composés phénoliques se divisant en plusieurs catégories : les phénols simples, les lignanes, les flavonoïdes et les tanins. La matière minérale, quant à elle, dépasse rarement 1% chez les essences de zones tempérées et peut atteindre des taux allant jusqu'à 2% chez les bois tropicaux (Fengel et Wegener, 1984 cités par Mounguengui, 2008). La structure anatomique du bois peut être plus ou moins complexe selon son origine (zone tempérée ou tropicale) et sa nature (feuillus ou résineux). Il peut être identifié et classé selon ses critères anatomiques. Le bois des résineux présente une structure anatomique moins complexe que celle des feuillus. L'examen de la coupe d'un tronc d'arbre montre le bois sous différentes section transversale, longitudinale et radiale. La section transversale montre de l'intérieur vers l'extérieur la moelle (Pith), le bois de cœur ou duramen (Heartwood), l'aubier (Sapwood), le cambium vasculaire (Vascular cambium) et l'écorce (Bark) (Figure 1). La section radiale fournit des informations sur les modifications longitudinales de la tige de la moelle à l'écorce le long du système radiale. Tandis que la section tangentielle fournit des informations sur la dimension tangentielle des entités (Rowell R, 2012). Chez certaines espèces, l'aubier et le duramen qui constituent le bois sont difficilement différenciables. C'est également le cas de certains bois tropicaux.

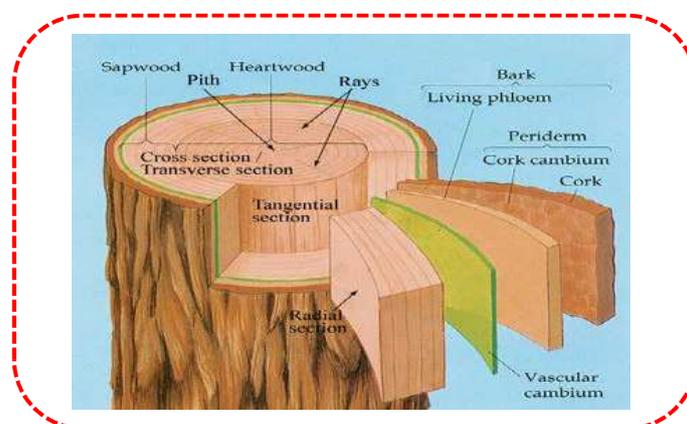


Figure 1: Schéma de coupe transversale d'un tronc d'arbre. Copyright University of Cambridge, DoITPoMS 2019.

I.2. Composition chimique du bois

La composition chimique du bois est complexe et présente une grande hétérogénéité. Le bois est essentiellement constitué de matériaux moléculaire et macromoléculaire : cellulose, hémicelluloses et lignine.

I.2.1. La cellulose

La cellulose est un homopolymère constitué d'unités D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons β -(1 \rightarrow 4)-glycosidiques de masse moléculaire élevée à chaîne linéaire. L'unité cellobiose est l'unité répétitive de la cellulose (Figure 2a). La taille de la chaîne est généralement caractérisée par le degré de polymérisation (DP), qui correspond au poids moléculaire de la chaîne de cellulose divisé par le poids moléculaire d'une unité de glucose. La cellulose dans le bois possède un degré de polymérisation moyen DP d'environ 10 000 unités (Hill C, 2006).

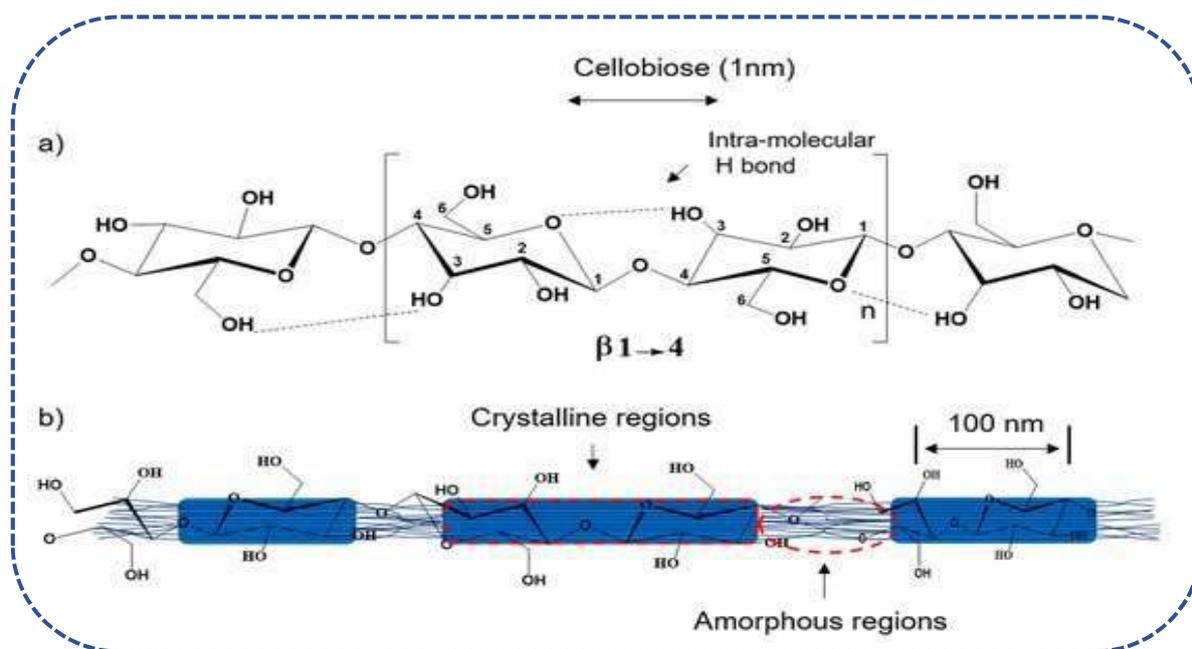


Figure 2: Structure chimique de la cellulose (a) et configuration hypothétique des régions cristallines et amorphes dans les nanofibrilles de cellulose (b). (Tayeb et al, 2018, corrigé et modifié).

Outre leurs molécules orientées de manière aléatoire, les molécules de cellulose ont tendance à former des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires et à s'agréger en microfibrilles. Ces microfibrilles contiennent une région cristalline hautement ordonnée (Figure 2b), qui peut atteindre 65% de la teneur de la cellulose. La partie restante de la cellulose, correspond à la cellulose amorphe.

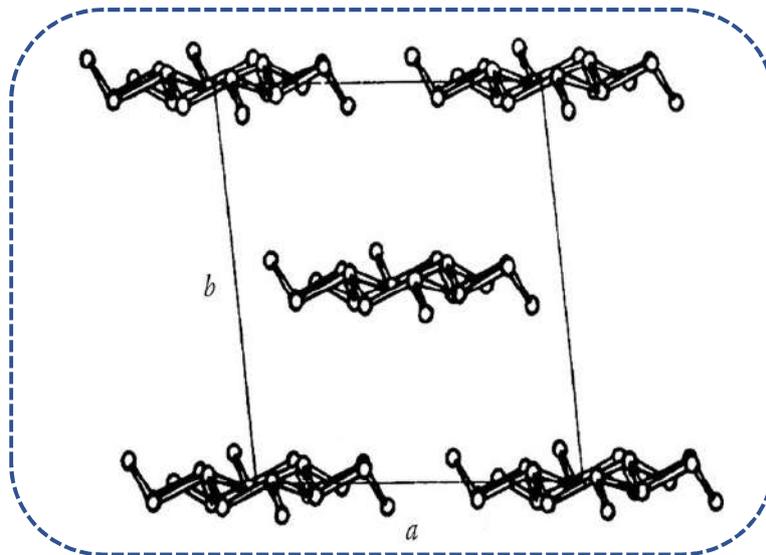


Figure 3: Structure cristalline de la cellulose I avec projection axiale.

Selon le test de diffraction des rayons X, la cellulose cristalline présente une symétrie de groupe d'espace où $a = 16,34 \text{ \AA}$ et $b = 15,72 \text{ \AA}$ (Figure 3). Une unité répétitive (c'est-à-dire une unité de cellobiose) à une distance de $c = 10,38 \text{ \AA}$ (Figure 4). La cellule unitaire est constituée de huit fractions de cellobiose. Une faible force de Van der Waals est en interaction entre les couches de chaînes moléculaires. Les chaînes parallèles d'unités d'anhydroglucopyranose des couches sont maintenues ensemble par des liaisons hydrogène intermoléculaires. Des liaisons hydrogène assurent la linéarité du système intramoléculaire entre les atomes de résidus de glucose adjacents qui sont également liés (Figure 4) (Rowell R, 2012).

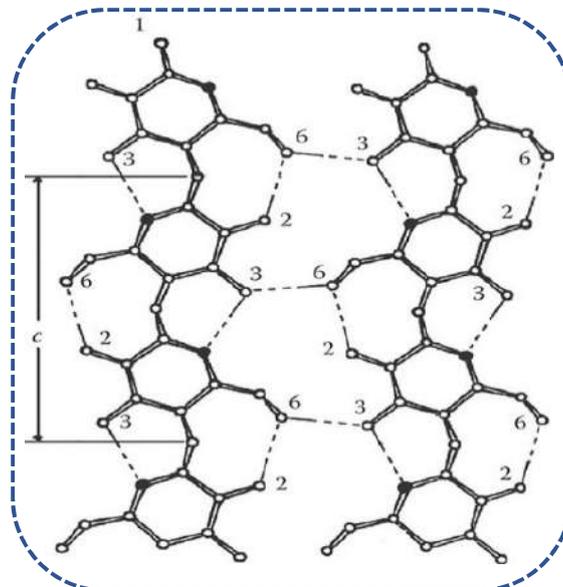


Figure 4: Structure cristalline de la cellulose I avec les liaisons hydrogène entre les chaînes de cellulose en projection plane.

Du fait de sa nature cristalline ou amorphe, la cellulose du bois présente des différences d'accessibilité à l'eau, aux microorganismes, etc. Les surfaces de la cellulose cristalline sont

accessibles, tandis que le reste de la cellulose cristalline n'est pas accessible. La lignine et les hémicelluloses incrustées autour de la cellulose diminuent son accessibilité. La cellulose est le polymère le plus abondant sur terre. C'est le principal composé de la plupart des plantes lignocellulosiques. Elle constitue la paroi cellulaire de nombreux végétaux avec une teneur pouvant varier de 17 à 99%. Le tableau 1 rapporte le taux de cellulose des parois de différents végétaux.

Tableau 1: Teneur en cellulose des parois de différents végétaux (Sjöström, 1993 ; Roggenstein, 2011)

Végétal	Taux de cellulose (%)
Bois	40 - 45
Coton	95 - 99
Lin	70 - 75
Bambou	46 - 58
Maïs	17 - 20

I.2.2. Les hémicelluloses

En général après la cellulose, les hémicelluloses constituent la seconde source la plus abondante de polysaccharides sur terre. Par rapport à la cellulose, ce sont des hétéropolysaccharides de faible masse molaire. Le degré de polymérisation moyen des hémicelluloses est compris entre 100 et 200 (Hill C, 2006). Elles présentent une grande variété de structure et certaines peuvent occasionnellement présenter des unités cristallines. Contrairement à la cellulose, certains groupements hydroxyles des hémicelluloses sont naturellement acétylés et des groupements carboxyles sont aussi associés à cette structure. La chaîne principale des hémicelluloses présente de courtes ramifications d'unités glycosidiques. Les hémicelluloses sont constituées de pentoses (β -D-xylose, α -L-arabinose) d'hexoses (β -D-mannose, β -D-glucose, α -D-galactose), et d'acides uroniques (acide β -D-glucuronique, acide α -D-4-O-méthylglucuronique et acide α -D-galacturonique) (Figure 5). Des sucres comme l' α -L-rhamnose et l' α -L-fucose peuvent également être présents dans les hémicelluloses (Pereira, 2007).

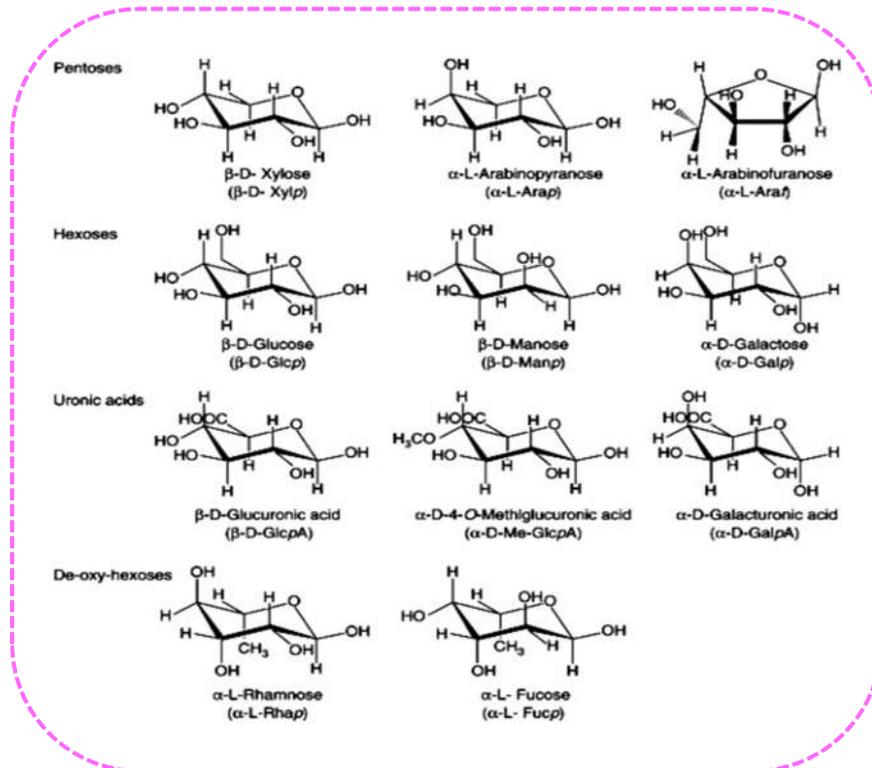


Figure 5: Unités structurales des hémicelluloses (Pereira, 2007).

Les hémicelluloses sont des agents de couplage entre la cellulose polaire et la lignine beaucoup moins polaire (Koshijima et al, 1984 ; Hill C, 2006). Il faut noter que les hémicelluloses des feuillus sont différentes de celles des résineux. Dans le bois des feuillus, on retrouve principalement deux types d'hémicelluloses les xylanes et les mannanes, avec une proportion de xylanes (15 à 30%) et cinq à dix fois plus importante que celle des mannanes (2 à 5%) (Figure 6a).

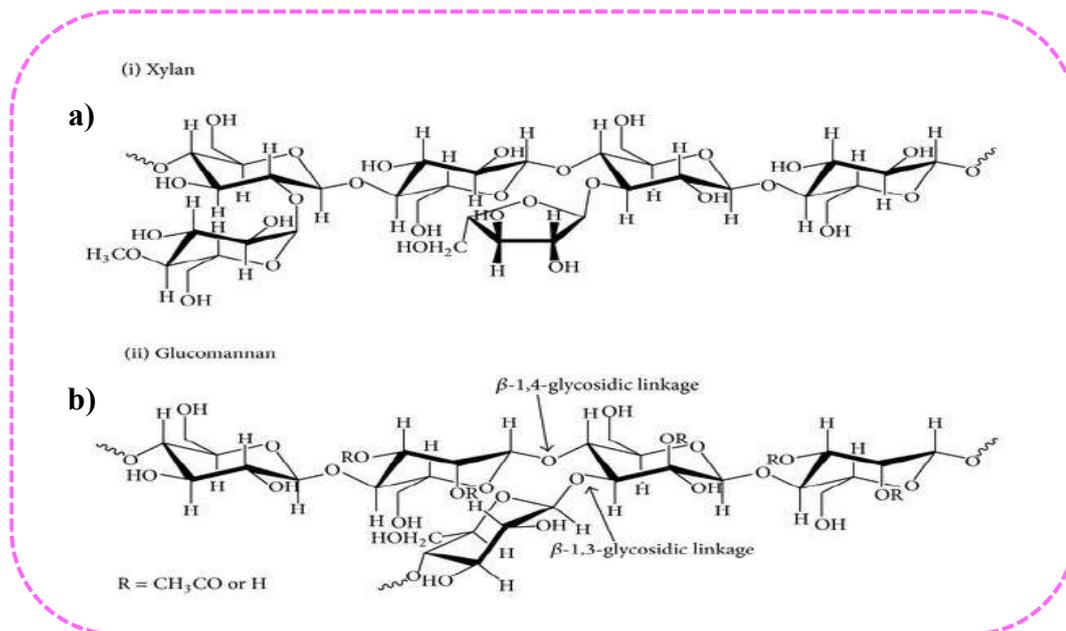


Figure 6: Structure partielle des xylanes du bois des feuillus (a) et des mannanes du bois des résineux (b).

Pour le bois des résineux, on retrouve également les xylanes et les mannanes, mais leurs proportions sont différentes par rapport aux bois de feuillus. Ce sont les mannanes (20 à 25%) qui dominent les xylanes (5 à 10%) dans le bois des résineux (Figure 6b). Il faut noter que nous utilisons le pluriel à propos des hémicelluloses du bois parce que les proportions des sucres qui les constituent varient d'une essence à l'autre.

I.2.3. La lignine

La lignine est un polymère amorphe et complexe de poids moléculaire élevé constitué d'unités phénylpropane. C'est le polymère phénolique le plus important dans le bois après la cellulose. C'est un polymère tridimensionnel formé à partir d'un mécanisme de polymérisation radicalaire (Hill C, 2006). Elle est synthétisée au niveau de la paroi cellulaire par polymérisation oxydative de trois unités monomériques *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique (Figure 7). Dans le bois, elle joue un rôle déterminant sur les propriétés mécaniques et sur sa résistance face aux champignons (Adler, 1977). Chez les résineux, la lignine est riche en alcool coniférylique (80%) (a : 14% et c : 6%) alors que dans les feuillus, elle comporte autant d'unité alcool coniférylique (47%) que d'unités alcool sinapylique (47%) et une proportion négligeable d'alcool coumarylique (6%). Les unités résultant des alcools coniférylique sont appelées guaiacyle (G) et celles issus des alcools sinapylique sont appelées syringyl (S). La lignine des résineux est de type S, celles des feuillus est de type S/G.

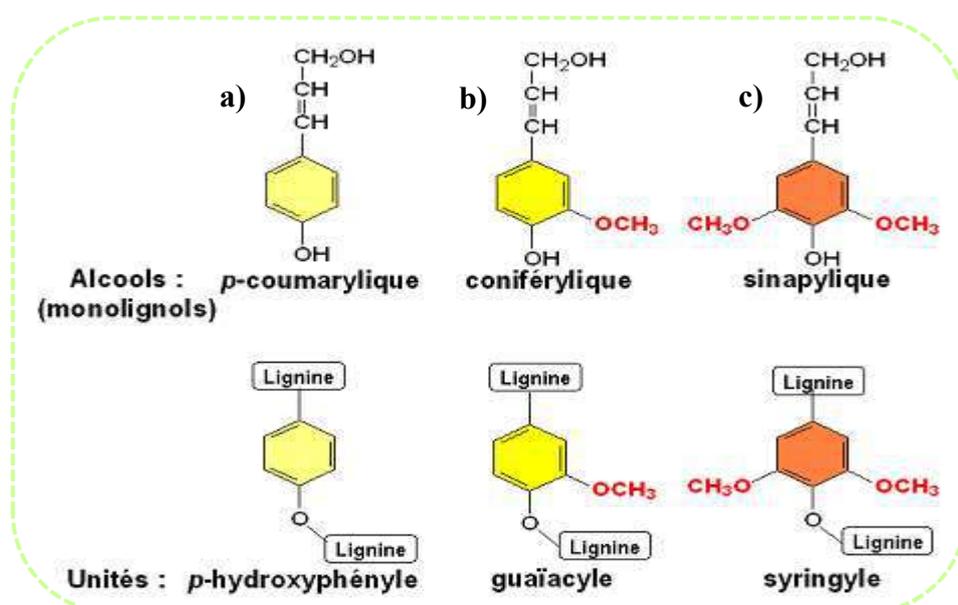


Figure 7: Monomères intervenant dans la structure de la lignine.

La lignine possède une structure macromoléculaire complexe, hétérogène et sans réels motifs répétitifs (Figure 8). Elle est insoluble dans les solvants usuels et très faiblement dans certains solvants tels que le n-butanol, l'éthanol, le dioxane et les solutions alcalines.

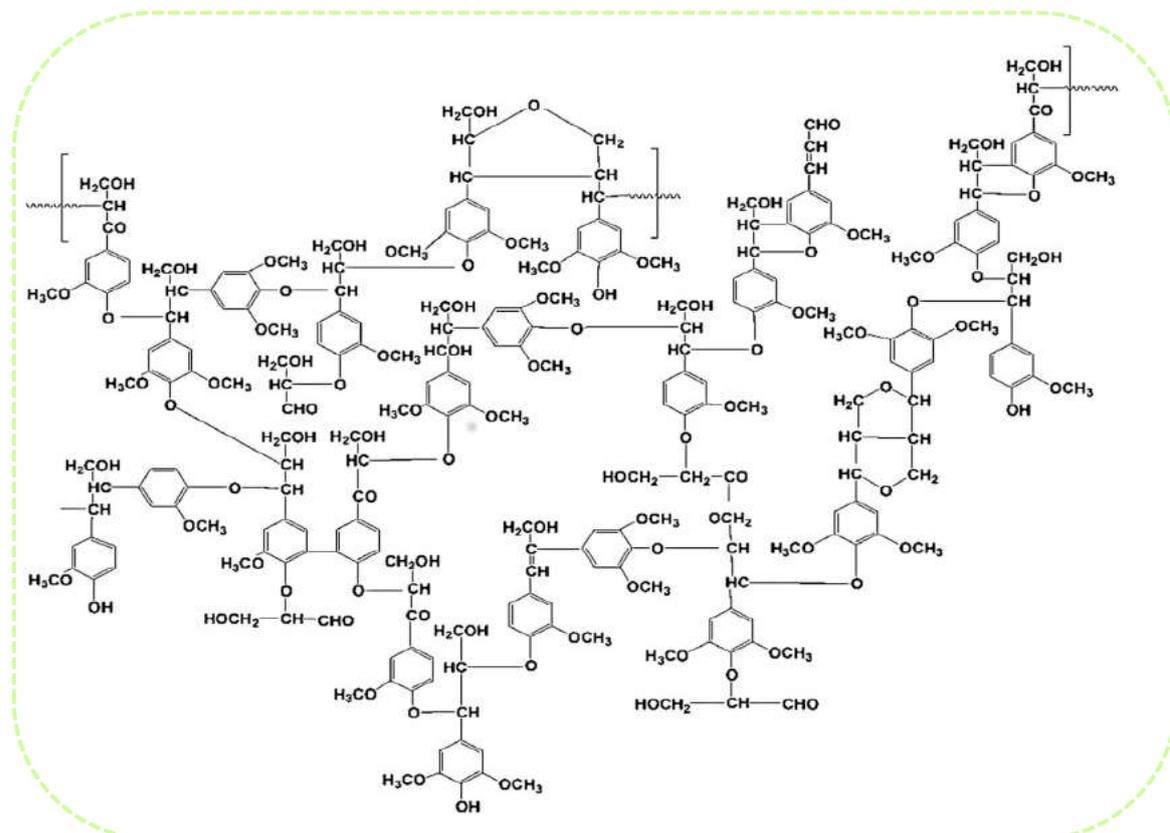


Figure 8: Structure chimique représentative de la lignine (Adler, 1977).

I.2.4. Les extractibles dans le bois

Les composés de faible poids moléculaire que l'on trouve dans la structure poreuse du bois sont nommés extractibles. Ce nom "extractibles" leur a été attribué parce qu'ils sont solubles dans les solvants organiques usuels (hexane, dichlorométhane, acétone, toluène/éthanol, méthanol...) ou dans l'eau et peuvent par conséquent être extraits du bois. Ce sont des substances non structurales du bois. Les extractibles sont en majorité formés de métabolites secondaires, c'est-à-dire des composés non indispensables à la croissance de l'arbre. Leur composition et leur quantité varient en fonction de l'essence, de la partie de l'arbre étudiée, de l'âge, et du site géographique, de la saison de récolte et du temps d'entreposage. Ils peuvent être lipophiles ou hydrophiles. Dans le bois, ils sont responsables de plusieurs propriétés comme l'odeur, la couleur, les propriétés acoustiques, la durabilité naturelle qui est la résistance aux attaques des agents de dégradation biologique (Haluk et al, 1994; Fengel et Wagner, 1984). Ils influencent certains procédés de transformation comme le collage, finition et la mise en pâte (Gierlinger et al, 2004 ; Krutul, 1992 ; Aloui et al, 2004). D'après Fengel et Wagner, 1984, en zone tempérée la teneur en extractibles du bois des feuillus est très souvent inférieure à celui des résineux. Les bois tropicaux quant à eux sont beaucoup plus riches en extractibles que les bois des zones tempérées. C'est le cas du Teck (*Tectona grandis*) où la teneur totale en

extractibles représente environ 13% de la masse sèche de bois (Bhat et al, 2005 ; Thulasidas et Bhat 2007). Pour extraire ces substances, il existe plusieurs méthodes comme la macération, la distillation à la vapeur, l'extraction à chaud avec un Soxhlet ou à l'aide d'un Dionex qui est un système d'extraction accéléré par solvant sous pression. Les extractibles correspondent à des milliers de composés appartenant à des familles chimiques très diverses. On peut les diviser en trois grandes catégories en fonctions de leur structure chimique. Les cires et graisses, les composés terpénoïdes et les composés phénoliques. Mais ici nous étudierons plus en détail les deux dernières catégories d'extractibles cité pour deux raisons : d'abord parce qu'ils sont les plus abondants rencontré dans la plupart des essences étudiées dans la littérature mais surtout parce que certains extractibles de ces deux catégories peuvent faire l'objet de valorisation intéressante dans les domaines de l'industrie pharmaceutique et nutraceutique.

I.2.4.1. Les composés terpéniques

Les terpènes et les terpénoïdes sont largement présents chez toutes les plantes. Les sources les plus abondantes de composés terpéniques dans la nature sont les conifères. C'est le groupe le plus vaste avec plus de 22000 composés identifiés (Raven et al, 2000). Leur rôle dans la défense contre les microorganismes et les herbivores et leur importance pour la résistance générale aux maladies sont bien connus. Leur mobilisation à la suite d'une attaque de prédateurs ou parasites est à la base des interactions écologiques des arbres. On considère les terpènes comme les produits résultant de la condensation d'unités en C₅ d'isoprène (Figure 9). Ce sont donc des oligomères de l'isoprène, alors que les terpénoïdes sont des oligomères fonctionnalisés.

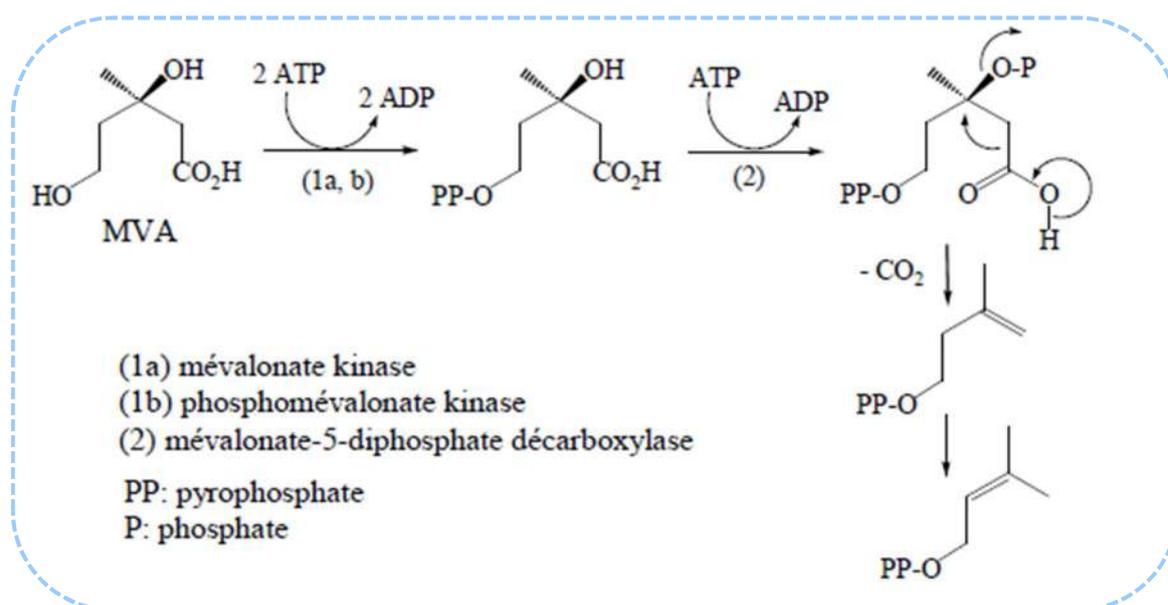


Figure 9: Biosynthèse de l'unité en C₅ des composés terpéniques.

En fonction du nombre d'unités isoprènes, on classe les terpènes en mono, sesqui, di ou triterpènes constitués respectivement de deux, trois, quatre ou six unités isoprènes. Il existe également des polyterpènes qui se présentent soit sous forme de longues chaînes acycliques de type polyisoprène de masse molaire élevée (caoutchouc, gutta-percha ou chicle). Les terpénoïdes diffèrent des terpènes au niveau des groupements fonctionnels oxygénés tels que alcool, éther ou acide carboxylique qu'ils possèdent. On rencontre beaucoup plus les monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et les acides terpéniques chez les résineux (Kleinhentz et al, 1999 ; Claassen et al, 2000 ; Arrabal et al, 2002) contrairement aux triterpènes que l'on rencontre plutôt chez les feuillus (Raven et al, 2000 ; Fernandez et al, 2002 ; Krasutsky, 2006) (Figure 10).

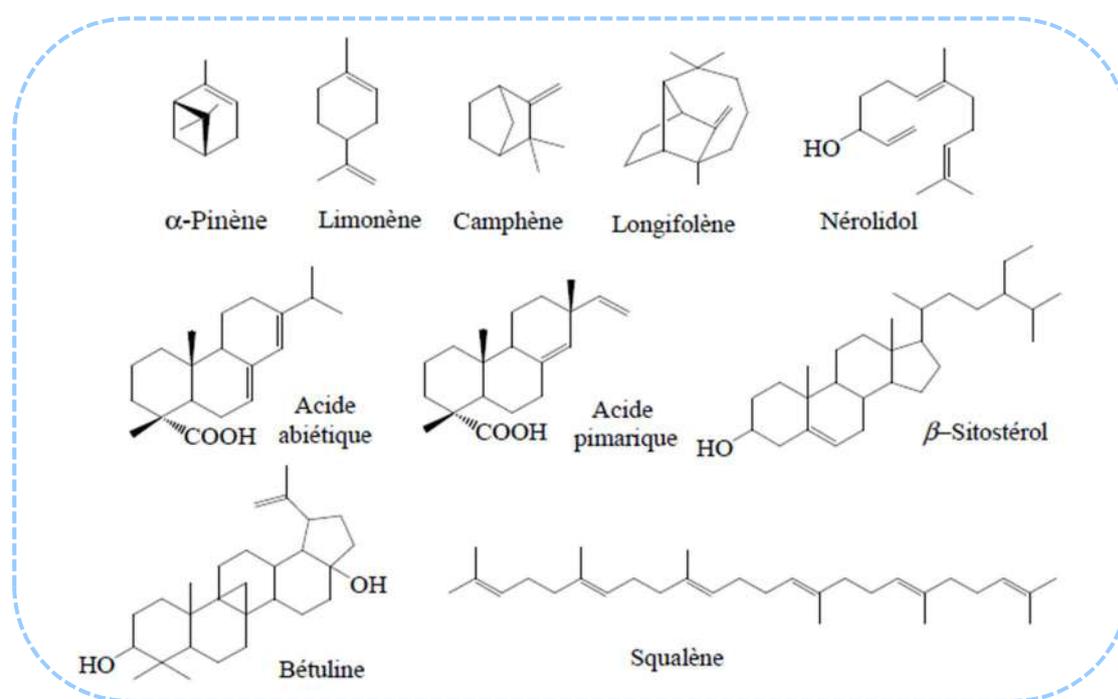


Figure 10: Terpènes et terpénoïdes isolés des bois de résineux et de feuillus.

Bon nombre de terpènes ont été identifiés pour posséder des propriétés bénéfiques pour l'Homme. C'est notamment le cas de certains constituants lipophiles du bois de bouleau jaune et blanc (Lavoie et Stevanovic, 2006) comme l'acide bétulonique et squalène dotés de propriétés anticancéreuses intéressantes. Ces composés possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antitumorales, anti-HIV rendant leur extraction intéressante (Krasutsky, 2006). Le *pactitaxel*, plus connu sous le nom commercial Taxol, a été isolé pour la première fois de l'écorce de l'If du Pacifique (*Taxus brevifolia*) et son efficacité dans le traitement du cancer du sein, des ovaires et celui de la prostate n'est plus à démontrer (Hezari et al, 1995). L'essence de térébenthine et à la colophane obtenues à partir de la distillation de la résine du

pin maritime principalement constitués de monoterpènes et d'acides terpéniques (Kleinhentz et al, 1999 ; Arrabal et al, 2002) trouvent de nombreuses applications dans différents domaines. La colophane est utilisée en cosmétique ou dans les mélanges adhésifs et l'essence de térébenthine possède des propriétés antiseptiques et peut être utilisée comme solvant ou décapant. Plusieurs travaux sur *Prunus africana* ont montré que ce dernier possède des composés terpéniques tels que l'acide ursolique, l'acide oléanique, la β -sitosténone et le β -sitostérol qui inhibent l'activité de la glucosyl-transférase impliquée dans le processus d'inflammation lors du cancer de la prostate. (Catalano et al, 1984 ; Breza et al, 1998 ; Stewart et al, 2003 ; Mburu et al, 2007). Les triterpènes identifiés et isolés de diverses plantes ont montré que ces derniers possèdent des propriétés très variées comme les propriétés antiseptiques, analgésiques, anticancéreuses, antivirales et anti-inflammatoires (Liu, 2005). Ces composés n'ont malheureusement pas que des effets bénéfiques pour l'homme, certains d'entre eux étant toxiques. C'est le cas de certains diterpénoïdes isolés de *Tetraclinis articulata* qui modifient le fonctionnement des leucocytes humains à partir d'une certaine concentration. C'est également le cas des huiles essentielles de *Melaleuca alternifolia* qui sont à l'origine d'une importante toxicité, d'allergies et irritations.

I.2.4.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques du bois sont très variés (Haslam, 1998a ; Macheix et al, 2005). Ils contiennent des phénols de structure simple, de squelette C₆, C₆-C₁ et C₆-C₂ ou C₆-C₃ (c'est-à-dire noyau benzénique et une chaîne de deux ou trois carbones). Ces composés phénoliques ayant un squelette phénylpropane sont intimement liés à la biosynthèse des lignines. Les composés phénoliques font partie des composés les plus étudiés parmi les métabolites secondaires, mais beaucoup d'entre eux ont des propriétés encore mal connues (Raven et al, 2000). Selon leur squelette de base, on distingue plusieurs familles de composés phénoliques naturels : les phénols simples, les flavonoïdes, les quinones, les stilbènes, les lignanes, les tanins....

I.2.4.2.1. Les phénols simples

Chez les plantes supérieures, les composés phénoliques simples ont un squelette C₆, C₆-C₁, C₆-C₂ ou C₆-C₃. Ils dérivent tous de la voie biosynthétique des unités phénylpropanes à l'origine des différents précurseurs de la lignine et sont obtenus par dégradation du squelette C₆-C₃ initialement formé. Les phénols simples les plus connus sont l'acide gallique que l'on retrouve chez toutes les plantes ligneuses, soit sous forme d'ester de l'acide quinique ou sous forme de tannins hydrolysable. L'acide salicylique (acide 2-hydroxybenzoïque) a été pour ce qui le

concerne isolé du saule. Ces composés phénoliques peuvent exister à l'état libre ou rattachés à des sucres (Figure 11).

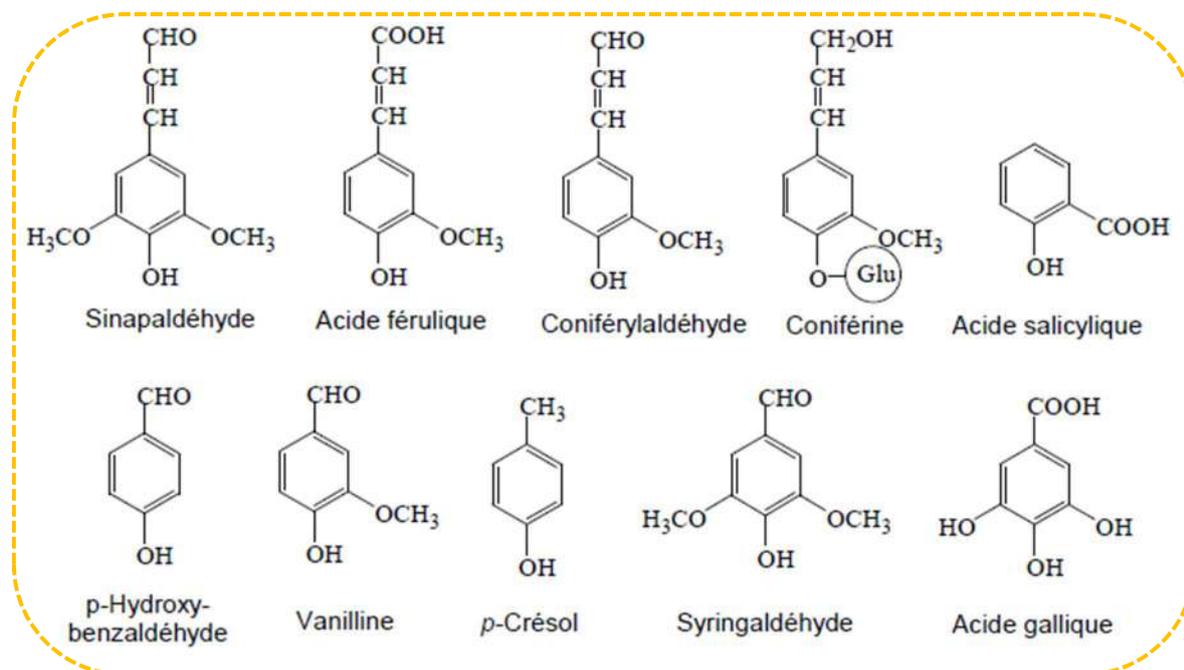


Figure 11: Composés phénoliques simples isolés des bois des résineux et des feuillus.

Ces composés sont incolores et très sensibles à l'oxydation. Cette oxydation est facilitée en milieu alcalin. Exposés à l'air, ces derniers deviennent brun foncé. La plupart des glycosides de phénols simples sont solubles dans l'eau contrairement à leurs aglycones. En tant que composés aromatiques, ces derniers absorbent fortement en UV. De plus leurs noyaux benzéniques réagissent avec de nombreux réactifs chromogènes, ce qui permet leur visualisation en microscopie.

I.2.4.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des antioxydants puissants. Ces derniers font partie des composés les plus étudiés des métabolites secondaires. C'est le groupe le plus important des composés phénoliques présents chez les végétaux (Raven et al, 2000). Ils ont pour structure général C₆-C₃-C₆, et se divisent en plusieurs familles avec chacune un squelette de base bien particulier. Dans chaque famille, il existe des variations de structure portant principalement sur le degré d'hydroxylation, de glycosylation de chaque cycle et méthylation. Ces variations de structure sont à l'origine des propriétés physico-chimiques, des propriétés biologiques, attribuées à ces composés (Ohmura et al, 2000 ; Macheix et al, 2005 ; Hooper et Cassidy, 2006). Ces composés agissent par différents mécanismes de capture des radicaux libres et par chélation des ions métalliques. Par exemple, l'inhibition par la quercétine de l'action catalytique du cuivre dans

l'oxydation du lard est attribuée, au moins partiellement, à ses propriétés complexantes. La quercétine a montré le plus grand pouvoir de complexation de tous les flavonoïdes étudiés dans les années 1970 (Thompson et al, 1976 ; Takamura et Ito, 1977). Les différentes familles de flavonoïdes sont les flavanes, les flavanones, les flavones, les isoflavones, les chalcones, et les aurones (Figure 12).

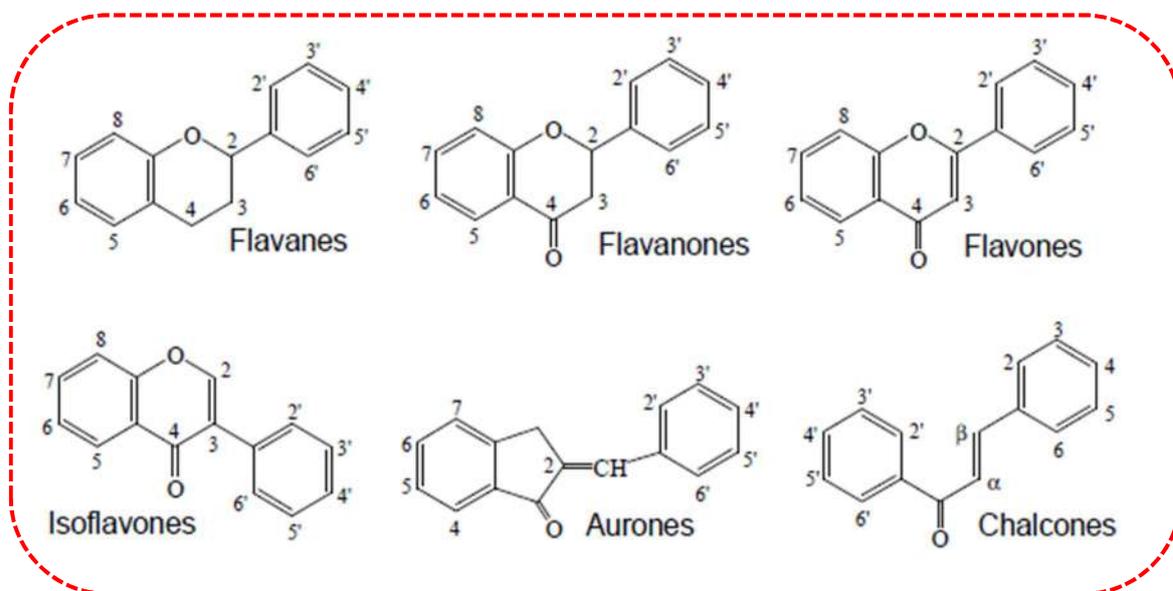


Figure 12: Différentes familles de flavonoïdes rencontrées dans le bois.

Plusieurs chercheurs ont montré que ces derniers étaient à l'origine de la durabilité naturelle de certains bois. C'est par exemple le cas de la dihydromorine et de l'aromadendrine présents dans les extractibles de l'Acacia (Schultz et al, 1995). Dans les travaux de (Sirmah et al, 2009), la durabilité naturelle du *Prosopis juliflora* est due à la présence du (-) mesquitol. Ces différents composés sont présentés dans la figure 13.

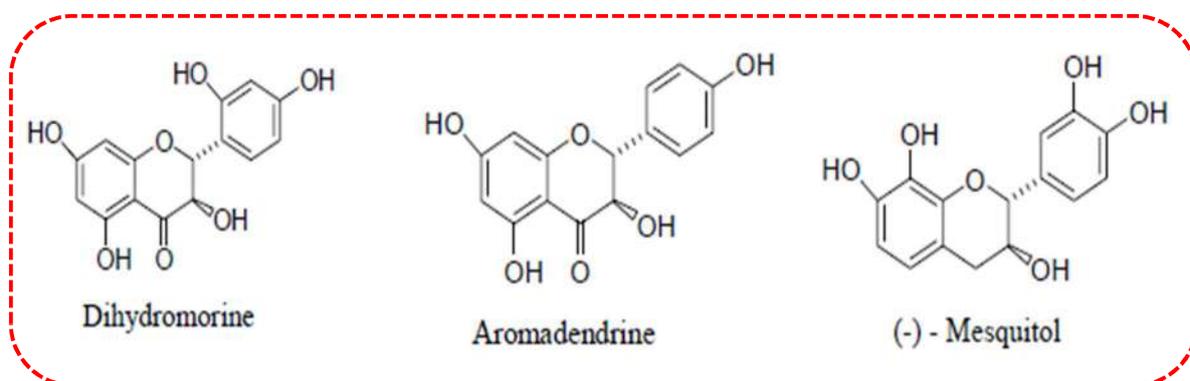


Figure 13: Structure, Dihydromorine, Aromadendrine, (-)-Mesquitol.

Les flavonoïdes comme le 3,4,7,8-tetrahydroxyflavanone et le 4,7,8-trihydroxyflavanone présentent des propriétés antifongiques, antibactériennes et anti-termite. Les Pterocarpanes sont des flavonoïdes présentant une bonne activité anti-appétante. C'est le cas de la naringénine

qui est réputée dans la littérature pour ses activités antivirales, antitumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, antibactériennes, anticancérigènes et vasculo-protectrices (Arima et al, 2002). Ces différents composés sont présentés dans la figure 14.

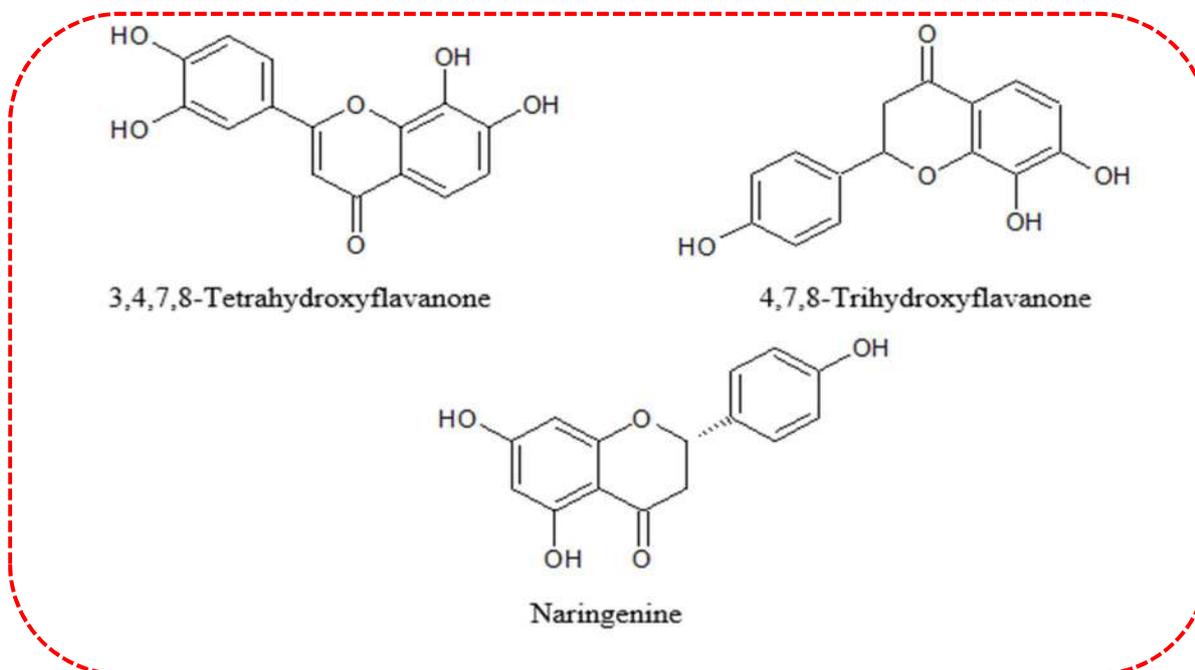


Figure 14: Structure de la 3,4,7,8-tetrahydroxyflavanone, 4,7,8-trihydroxyflavanone, naringenine.

En dehors d'être à l'origine de la durabilité naturelle chez certaines essences et d'être responsables des nombreuses activités citées plus haut, les flavonoïdes sont également responsables de la coloration des bois. C'est le cas chez *Pterocarpus santalin*, *Pterocarpus indicus*, ou *Pterocarpus soyauxii*. La couleur rouge ou jaune de ces bois est due à la présence des flavonoïdes appartenant à la famille des santalines (kinjo et al, 1995 ; Surowiec et al, 2004). Les santalines A et B sont à l'origine de la couleur rouge alors que les santalines Y et AC sont responsables de la couleur jaune (Kinjo et al, 1995 ; Dweck 2002) (Figure 15). Ces différents composés sont habituellement très utilisés comme colorant dans l'industrie textile. Ils sont également utilisés en cosmétique où ils empêchent l'oxydation des cellules et la libération des radicaux libres responsables de l'altération des cellules causant ainsi le vieillissement de ces dernières.

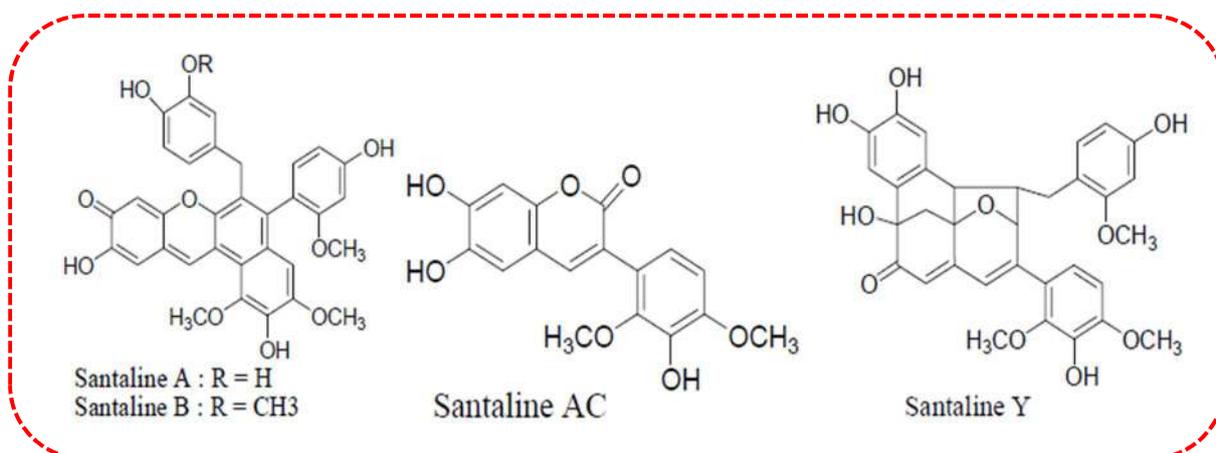


Figure 15: Structures des santalines A, B, Y et AC.

I.2.4.2.3. Les stilbènes

Les stilbènes sont synthétisés par l'addition d'une à trois molécules de malonyl-CoA aux acides cinnamiques qui dérivent de la voie de biosynthèse des phénylpropanes. Ils possèdent une structure 1,2-diphényléthène et sont constitués d'un squelette C₆-C₂-C₆. Les stilbènes possèdent deux cycles benzéniques reliés par deux carbones eux même unis par une double liaison. Pour le 1,2-diphényléthène, il existe deux isomères : le cis-stilbène et le trans-stilbène (Figure 16).

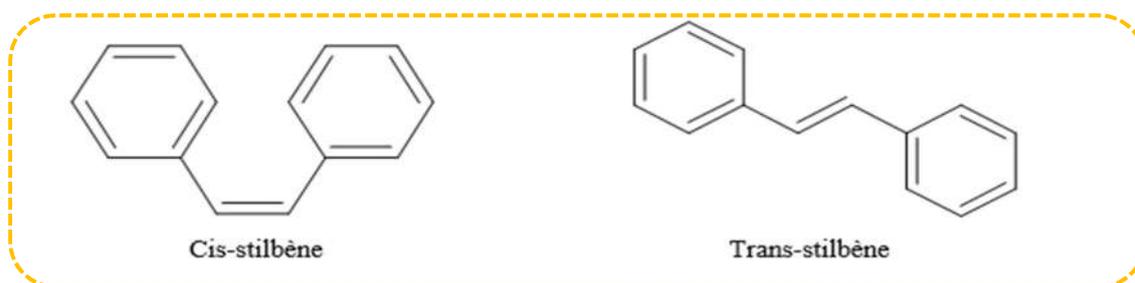


Figure 16: Isomères du 1,2-diphényléthène.

Dans l'arbre, la proportion des stilbènes varie en fonction de la partie étudiée et la toxicité en fonction de leurs structures, et des souches bactériennes ou fongiques étudiées (Venalainen et al, 2004 ; Lee et al, 2005). Le 2,4,3',5'-tétrahydroxystilbène et le 2,4,5,3',5'-pentahydroxystilbène sont responsables de la durabilité des bois contre les champignons lignivores (Schultz et al, 1995). La pinosylvine, le resvératrol et bien d'autres stilbènes présentent différentes fonctions : ils jouent le rôle de piègeurs de radicaux libres, de biocides et chélateurs de métaux (Sirmah, 2009).

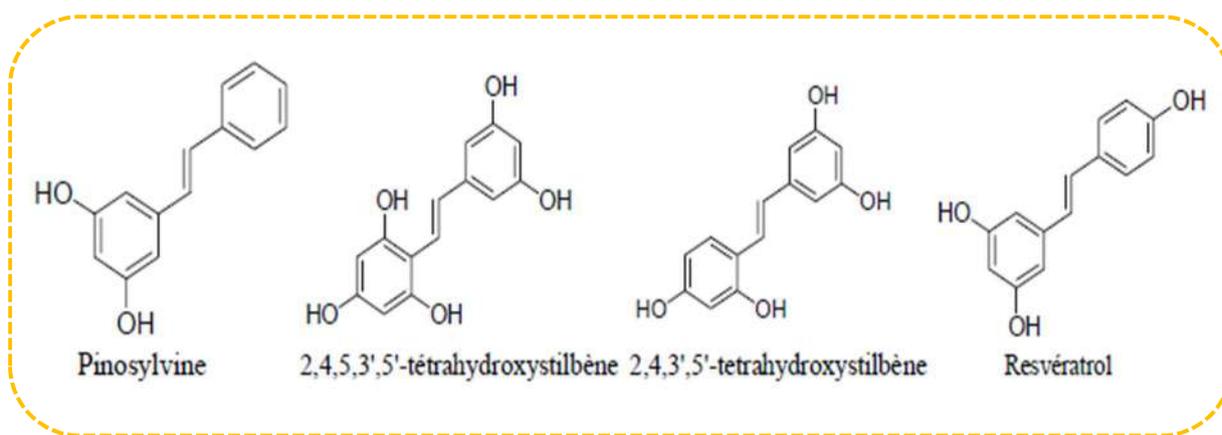


Figure 17: Structures de stilbènes ayant des propriétés intéressantes.

Ils ont un rôle de fongicide et de protection contre les insectes. Différentes espèces de *Combretum*, riches en stilbènes, sont résistantes aux termites. Les stilbènes sont importants pour la résistance aux champignons de pourriture de bois et des recherches portant sur l'induction de la biosynthèse des stilbènes par irradiation de jeunes plants ont été réalisées pour conférer au bois une meilleure résistance à la biodégradation (Norin, 1981). Ils influencent fortement les propriétés technologiques du bois. Les stilbènes comme la pinosylvine et ses formes mono ou diméthylées, isolés à partir de *Picea glauca*, *Pinus resinosa* ou *Pinus banksianat* inhibent fortement la croissance des pourritures blanches telles que *Phanerochaete chrysosporium*, et *Trametes versicolor*, avec un effet d'inhibition moins important sur les champignons de pourritures brunes comme *Poria placenta*, *Gloeophyllum trabeum* et *Neolentinus lepideus* (Célimène et al, 1999). Les stilbènes sont également très utilisés en pharmacologie à l'image du resvératrol qui possède des propriétés cardioprotectrices et anticancéreuses importantes (Han et Li, 2004 ; Wang et al, 2006).

I.2.4.2.4. Les quinones

Les quinones sont présentes chez de nombreux végétaux. Il existe plusieurs types de quinones (benzoquinones, naphthoquinones et anthraquinones). Le bois de Teck (*Tectona grandis*) contient environ 0,3% de 2-méthylantraquinone (tectonique) qui est un répulsif vis-à-vis des termites et contribue ainsi à la durabilité naturelle du bois de Teck ainsi que plusieurs autres quinones telle que la naphthoquinone (Leyva et al, 1998 ; Thévenon et al, 2001). La figure 18 ci-dessous présente la structure des différents types de quinones rencontrées dans le bois du teck.

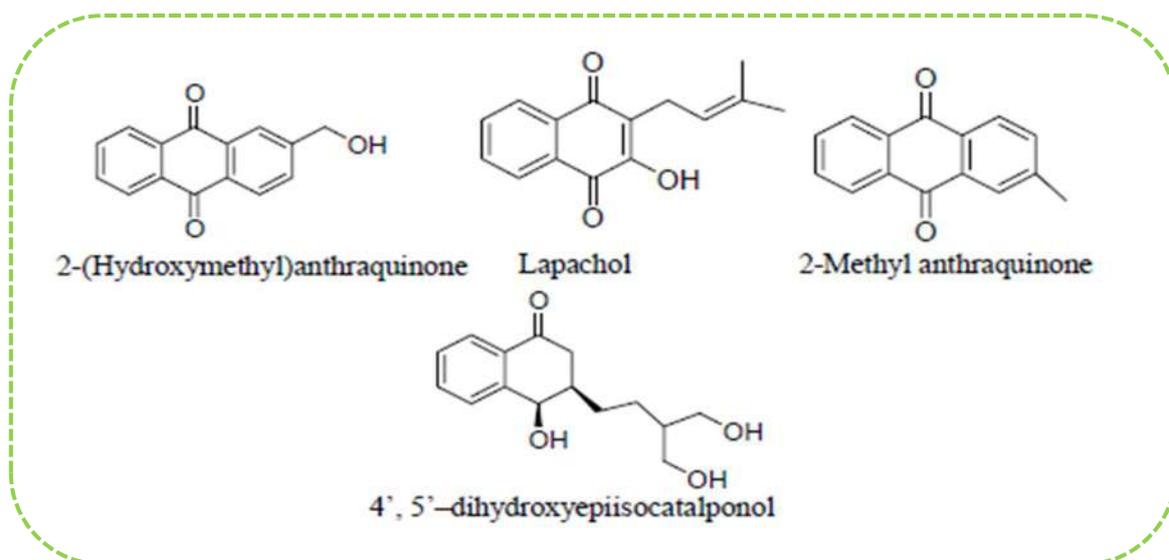


Figure 18: Structures des quinones rencontrées dans le bois de Teck.

Le 2-méthylantraquinone isolé du duramen du bois du Teck, le catalponol et la catalponone isolés du duramen de *Catalpa bignonioides* possèdent des activités anti-termite ([Kokutse et al, 2006](#) ; [Castillo and Rossini, 2010](#)). Dans la durabilité naturelle du bois du Teck, la 4', 5'-dihydroxyepiisocatalponol joue un rôle important contre l'attaque des champignons. [Niamké et al, 2012](#) ont montré que ce composé était un fongicide capable d'inhiber la croissance de *Trametes versicolor*. La 7-méthyljuglone et ses dérivés isolés du duramen de *Diospyros virginiana L.* possèdent également des activités anti-termite. La figure 19 ci-dessous présente la structure de quelques composés quinoliques à l'origine de la durabilité naturelle de certains bois .

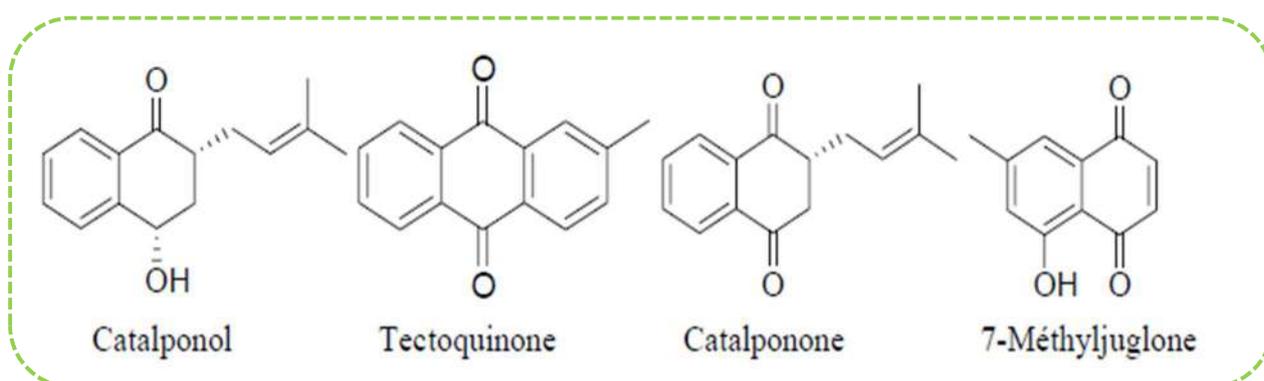


Figure 19: Structure de composés quinoliques isolés, et responsables de la durabilité naturelle de certains bois

I.2.4.2.4. Les lignanes

Les lignanes sont des dimères d'unités phénylpropane, dont la biosynthèse est contrôlée enzymatiquement conduisant à des liaisons β - β entre les carbones des chaînes propane. Si les

unités phénylpropane sont liées autrement que par des liaisons β - β , il s'agit de néolignanes (Massanet et al, 1989). Les lignanes sont également considéré comme des intermédiaires dans la biosynthèse de la lignine. La polymérisation se fait alors de manière aléatoire par voie radicalaire. On extrait facilement les lignanes du bois avec du méthanol. Les lignanes suscitent beaucoup d'intérêt en tant que molécules bioactives ayant des propriétés antioxydantes et antitumorales (Ward, 1997 ; Umezawa, 2001). Différentes structures de lignanes extraits des résineux et feuillus sont présentées dans la figure 20.

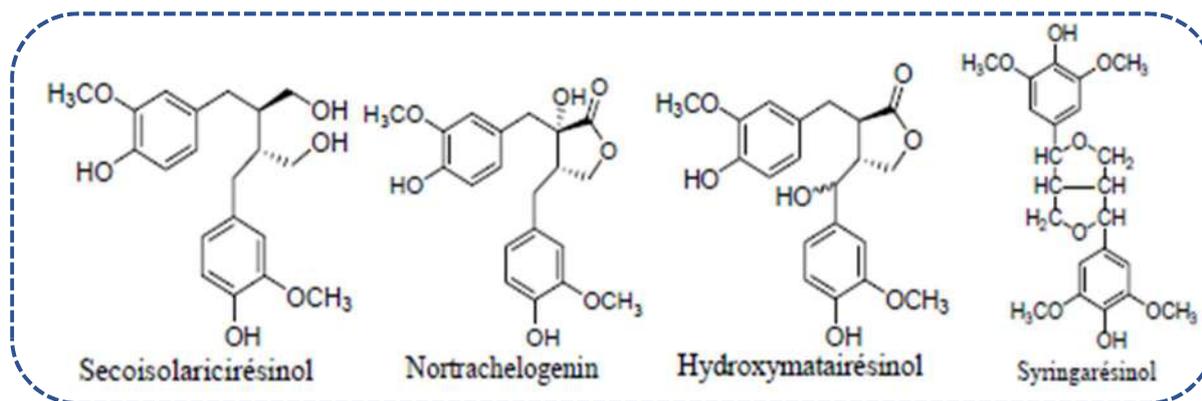


Figure 20: Structures de lignanes extraits du bois de résineux et de feuillus.

Les lignanes sont abondants au niveau des nœuds et ont été très étudiés. Ils possèdent des propriétés phytoestrogènes conduisant à des applications dans les domaines de la pharmacie et agroalimentaire (Murkies 1998 ; Hooper et cassidy 2006). Comme la plupart des composés phénoliques, les lignanes possèdent des propriétés antioxydantes (Lee et al, 2005) et même antifongiques (Kawamura et al, 2004).

I.2.4.2.4. Les tannins

Les tannins (ou tanins) sont définis comme des composés phénoliques solubles dans l'eau, dont la masse molaire se situe entre 500 et 3000 Daltons. Ils possèdent les propriétés générales des phénols, et sont capables de précipiter la gélatine et les autres protéines. En présence du chlorure de Fer, les tannins précipitent et donnent une coloration verte ou bleue. La plupart des végétaux contiennent des tannins. Dans le bois, on distingue en général deux types de tannins : les tannins hydrolysables, qui sont des esters d'acides galliques, ellagiques ou de leurs dérivés et de sucres, et les tannins condensés ou proanthocyanidines qui sont des oligomères de flavonoïdes.

- ❖ **Les tannins hydrolysables:** ce sont des esters d'acide gallique et de ses dimères (acides ellagique et digallique) et de sucres principalement le glucose. On classe les tannins hydrolysables en deux catégories : les gallotannins et les ellagitannins qui s'hydrolysent facilement. Les gallotannins par hydrolyse libèrent l'acide gallique et ses dérivés

galloylés et les ellagitannins qui libèrent par hydrolyse de l'acide gallique et ellagique. Les tannins hydrolysables sont très abondants chez certaines essences comme le chêne, le châtaignier etc . La figure 21 présente quelques structures de tannins hydrolysables.

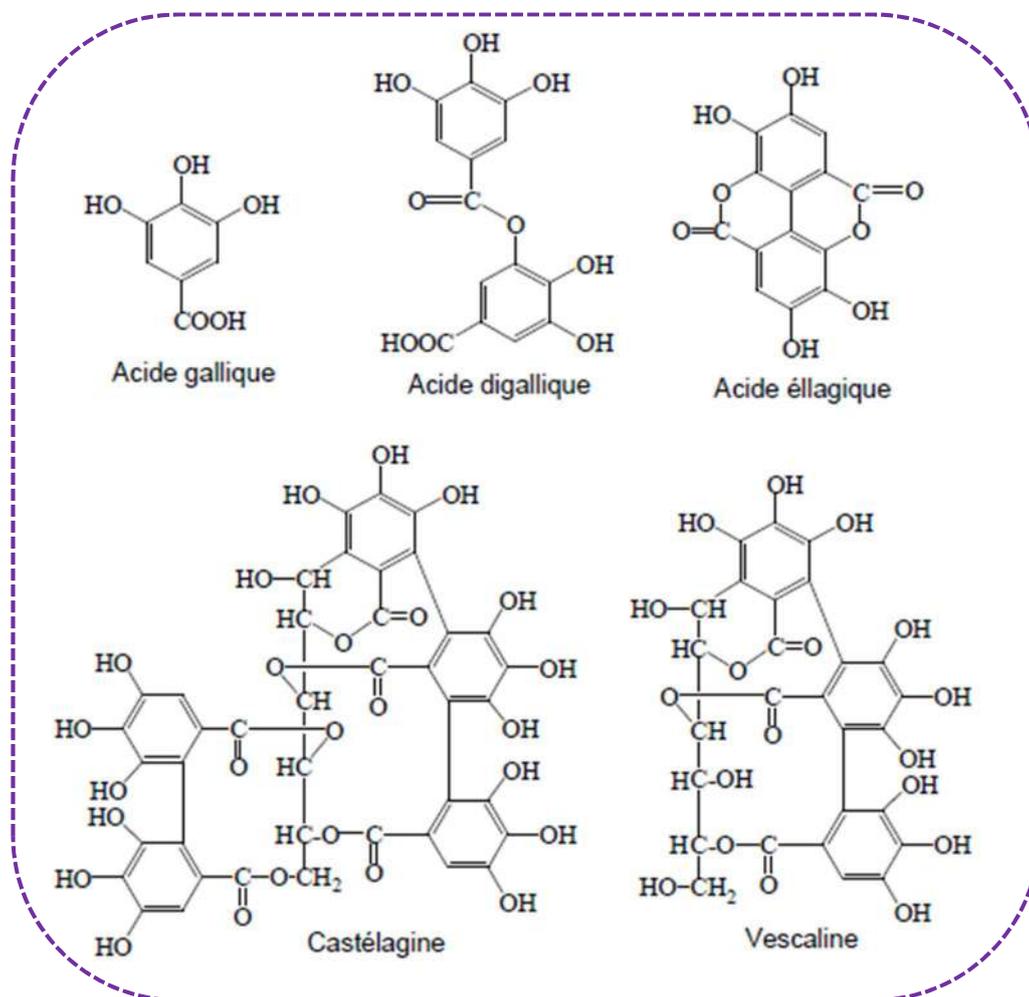


Figure 21: Structures de quelques tannins hydrolysables.

- ❖ **Les tannins condensés:** ce sont des oligomères hétérogènes de flavonoïdes (flavan-3-ols et flavan-3,4-diols) également appelés proanthocyanidines. Ils sont résistants à l'hydrolyse contrairement aux tannins hydrolysables. Ils possèdent avec les tannins hydrolysables des propriétés communes comme la précipitation des protéines en solution aqueuse et une astringence caractéristique. Les tannins condensés sont abondants dans l'écorce et le duramen. Les tannins condensés peuvent être utilisés pour la production d'adhésifs biosourcés pour les contreplaqués et les panneaux de particules. [Thévenon et al, 2001](#) ont proposé des formulations à base de tannins pour protéger le bois. Avec leur bonne capacité de piéger les radicaux libres, ces composés sont de très bons antioxydants. Dans l'arbre, ils assurent généralement un rôle de protection contre les agents pathogènes du fait de leurs propriétés antifongiques contre les champignons.

La toxicité de ces composés contre les microorganismes est un fait établi, trouvant ainsi plusieurs applications dans les domaines comme la pathologie végétale, les sciences du bois ou la pharmacologie. La figure 22 présente quelques structures de tannins condensés.

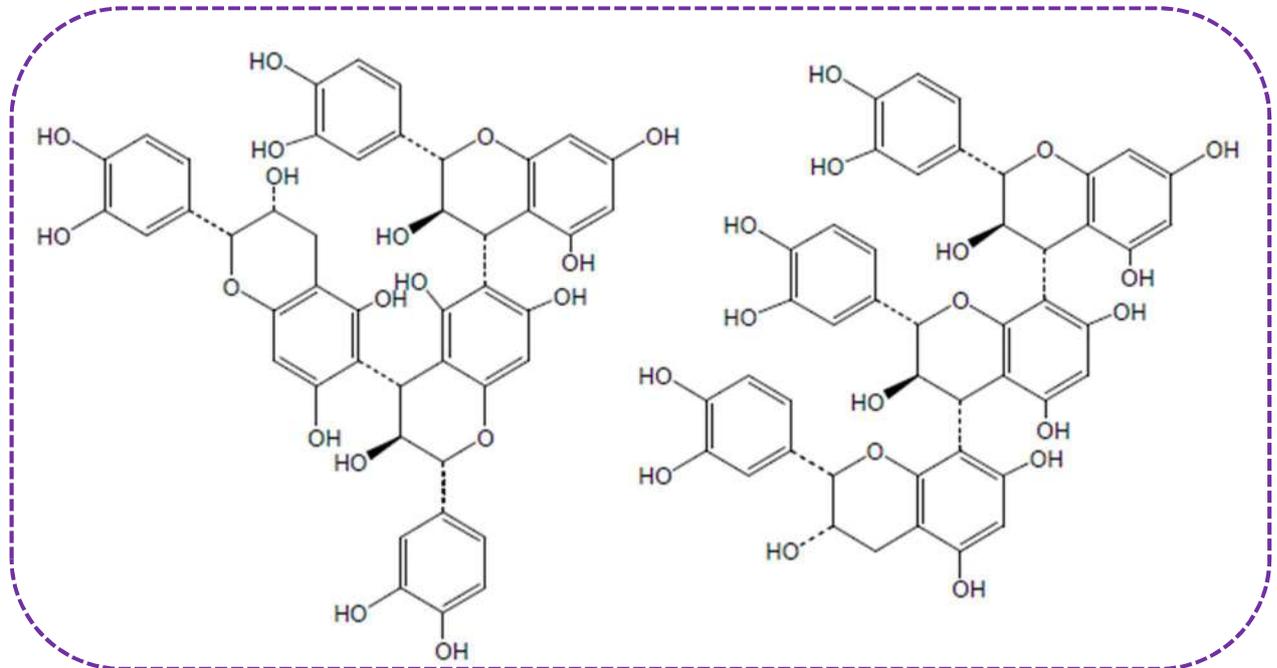


Figure 22: Structures de tannins condensés.

I.2.4.2.5. Les substances minérales

Le bois contient des constituants inorganiques tels que le calcium, le potassium, le magnésium en très faible quantité ainsi que d'autres éléments comme le manganèse, le sodium et le phosphore à l'état de trace. Ces éléments se retrouvent dans les cendres suite à la combustion du bois. Ils sont absorbés par le système racinaire des arbres et transportés dans les tissus de l'arbre. La concentration de ces éléments dans les cendres varie en fonction de l'espèce étudiée et des conditions environnementales, notamment du sol.

I.3. Durabilité naturelle

I.3.1. Notion de la durabilité naturelle

Le bois est susceptible d'être attaqué par différents agents de dégradation. On distingue les attaques dues aux champignons lignivores qui nécessitent un taux d'humidité relativement élevé pour se développer et celles dues aux insectes. Ces agents de dégradation sont à l'origine de problèmes importants pour la construction bois lorsque les essences utilisées ne sont pas suffisamment durables. La durabilité naturelle du bois est définie comme étant la capacité de

ce dernier à résister à l'attaque des agents de dégradation sans aucun traitement de préservation (NF X 40 002, 1983). La préservation du bois est connue depuis de nombreuses années. Dans la Bible, il est rapporté l'usage d'essences naturellement durables. Le livre des Rois indique le choix des essences durables utilisées pour la construction du Temple et du palais royal par le Roi Salomon. Selon [Willetner H et al \(1997\)](#), le cèdre du Liban (*Cedrus libani*) a été utilisé dans les constructions anciennes. L'azobé (*Lophira alata*) a longtemps servi comme traverses pour les rails de chemin de fer. L'utilisation empirique de certaines essences naturellement durables a énormément contribué à l'histoire de l'Homme.

I.3.2. Evaluation de la durabilité naturelle vis-à-vis des champignons lignivores.

Pour évaluer la durabilité naturelle du bois, des essais de champ où le bois est directement au contact du sol peuvent être réalisés. Cette méthode a pour avantage de restituer les actions et interactions dont le bois peut faire l'objet dans son environnement naturel. En revanche avec cette méthode, les essais sont très longs et l'obtention des résultats ne peut intervenir qu'au bout de plusieurs années. ([Dirol et al, 2001](#)). Afin de pallier ces difficultés, des essais adaptés en laboratoire basés sur la quantification de la perte de masse d'éprouvettes exposées à différents champignons lignivores ont été proposés dans la norme européenne EN 113 de 1994. L'obtention des résultats intervient assez rapidement (seize semaines dans les conditions réelles de la norme européenne EN 113 et dix à douze semaines pour des essais screening rapide adaptés de cette norme). Entre ces deux méthodes et l'ensemble des classes de durabilité que propose le comité Européen de Normalisation, il n'existe pas de différence significative ([Van Acker et al, 1999](#)). Le Tableau 2 présente les différentes classes de durabilité naturelle décrite par la norme Européenne EN 350-1, 1994 en fonction des pertes de masse.

Tableau 2: Classes de durabilité naturelle du bois vis-à-vis des champignons lignivores en fonction des pertes de masse moyenne et relative (norme EN 350-1,1994).

Classes de durabilité naturelle	Descriptif	Pertes de Masse (%)	Perte de masse relative (x)
1	Très durable	$PM \leq 5$	$x \leq 0,15$
2	Durable	$5 < PM \leq 10$	$0,15 < x \leq 0,30$
3	Moyennement durable	$10 < PM \leq 15$	$0,30 < x \leq 0,60$
4	Peu durable	$15 < PM \leq 30$	$0,60 < x \leq 0,90$
5	Non durable	$PM > 30$	$x > 0,90$

La durabilité naturelle d'une essence est estimée par la perte de masse des éprouvettes après exposition aux champignons calculée à partir de la formule :

$$\text{Perte de Masse} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

Et m_0 est la masse anhydre de l'échantillon séché à 103°C à l'étuve, et m_1 la masse de l'échantillon séché à 103°C à l'étuve après exposition et attaques des champignons. La classe de durabilité est déterminée en mesurant le rapport (x) correspondant à la moyenne des pertes de masses relative des éprouvettes des différentes essences étudiées sur la moyenne des pertes de masses des éprouvettes de hêtre utilisées comme témoin de virulence pour les feuillues ou sur la moyenne des pertes de masses des éprouvettes d'aubier de pin sylvestre utilisées comme témoin de virulence pour les résineuses. En fonction de la valeur de x , le bois est classé selon différents niveaux de durabilité :

- Très Durable si $x < 0,15$
- Durable si $0,15 < x < 0,30$
- Moyennement Durable si $0,30 < x < 0,60$
- Faiblement Durable si $0,60 < x < 0,90$
- Non Durable si $0,90 < x$

I.3.3. Evaluation de la durabilité naturelle vis-à-vis des termites.

Comme avec les champignons lignivores, des essais de champs peuvent également être réalisés avec des termites pour évaluer la durabilité naturelle du bois. Les avantages et les inconvénients de ces essais ont été énumérés plus haut. Des essais adaptés en laboratoires basés sur la quantification de la perte de masse des éprouvettes exposées aux termites selon un protocole d'essais clairement défini ont été proposés dans la norme européenne EN 117 de 2005 peut être réalisés. L'obtention des résultats intervient encore plus rapidement qu'avec les champignons lignivores (huit semaines dans les conditions réelles de la norme européenne EN 117 et deux à quatre semaines pour des essais screening rapides adaptés de cette norme). A l'issue des essais, une cotation visuelle de l'attaque engendrée par les termites est également effectuée selon les critères définis par la norme EN 117 et expliciter comme suit :

- Cotation 0 Aucune attaque
- Cotation 1 Tentative d'attaque
- Cotation 2 Attaque légère
- Cotation 3 Attaque moyenne
- Cotation 4 Attaque forte à destruction totale

La perte de masse est définie par la même équation (1) que celle utilisée avec les champignons lignivores. La différence ici est que m_1 est la masse de l'échantillon séché à 103°C à l'étuve après exposition et attaques des termites. Le nombre de termites survivants est également déterminé et le taux de survie (%) est calculé selon l'équation 2:

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\text{Nombre de termites vivants restant après le test}}{\text{Nombre de termites utilisés pour le test}} \times 100 \quad (2)$$

I.3.4. Origine de la durabilité naturelle

Les origines de la durabilité naturelle du bois sont diverses car les facteurs qui peuvent expliquer pourquoi le bois oppose une bonne ou une mauvaise résistance contre les organismes lignivores en général (champignons et termites) sont aussi bien spatio-temporels, biologiques que chimiques, etc... Compte tenu du contexte de ce travail, cette étude se limitera aux facteurs chimiques d'autant plus que tous les chercheurs se sont accordés à dire que la singularité revient principalement aux constituants chimiques du bois, surtout aux biocides (Schultz et al, 1995). Ainsi, la durabilité naturelle d'un bois est intimement liée au potentiel génétique de l'essence (Dirol et al, 2001).

I.3.4.1. Facteurs chimiques

Les organismes lignivores (champignons et termites) apprécient le bois en fonction de sa comestibilité. Le patrimoine chimique du bois joue un rôle très important dans sa durabilité naturelle selon que le bois renferme des substances appétantes ou toxiques. La durabilité naturelle est en grande partie attribuée à l'activité des composés extractibles qu'il renferme (Shultz et al, 1995).

- ❖ **Le rôle des substances macromoléculaire :** les parois cellulaires du bois sont essentiellement constituées de polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) et de lignine. Leur proportion varie selon leur appartenance aux Gymnospermes ou aux Angiospermes. Les organismes lignivores (champignons et termites) apprécient fortement ces constituants cellulaires et leur grande proportion à l'état amorphe fragilise le matériau. Néanmoins, la cristallinité de la cellulose réduit la surface moléculaire accessible aux enzymes des champignons empêchant la progression du mycélium dans le bois. La lignification de la paroi cellulaire est un facteur très important dans le système de défense du bois. Les lignines jouent le rôle de barrière physique. Ces polymères présents dans la lamelle mitoyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire

empêchent les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des polysaccharides des champignons d'atteindre un nombre suffisant de liaisons glycosidiques pour permettre une hydrolyse suffisante (Scheffer et Cowling, 1966). La structure de la lignine semble jouer un rôle prépondérant. Il existe des différences structurales entre les lignines de conifères et de feuillus. Celles des conifères sont essentiellement constituées d'unités guaiacyles, alors que celles des feuillus sont constituées de mélange d'unités guaiacyle, syringyle et parahydroxyphényles en plus faible proportion. Cette constitution monomérique est un caractère important pour la durabilité. Syafii et al, 1988 ont démontré que chez des feuillus tropicaux, les espèces les plus durables vis-à-vis de *Coriolus versicolor* sont celles qui possèdent une proportion d'unités guaiacyles élevées.

- ❖ **Le rôle des substances extractibles :** les extractibles sont des produits du métabolisme secondaire de l'arbre que l'on peut extraire à l'eau ou à l'aide de solvants organiques. Ils représentent généralement 1 à 5% de la masse du bois (Zobel et al, 1992). Différents travaux sur les processus de vieillissement de l'arbre suggèrent que les substances responsables de la durabilité du bois se forment lors de la duraminisation. Les cellules de parenchyme semblent être le lieu de synthèse des substances extractibles du duramen (Bamber et Fuzakawa, 1985). Il est évident que ces cellules jouent un rôle important puisqu'elles constituent les seuls éléments vivants du bois avant sa duraminisation. Les extractibles contribuent beaucoup à la protection du bois face aux organismes lignivores. C'est Hawley et al, en 1924 qui ont mis en évidence pour la première fois le lien entre la durabilité naturelle et les extractibles. Puis de nombreux chercheurs comme Taylor et al. (2006) , Santana et al. (2010) ont montré que la durabilité naturelle d'un bois est liée à la nature des composés extractibles qu'il renferme. Les études *in vitro* réalisées par Oliveira et al, en 2010 et Kirker et al, en 2013 ont montré qu'une fois extraits, les blocs de bois étaient plus facilement dégradés par les organismes lignivores (champignons et termites). Plusieurs essences possèdent des extractibles ayant de très bonnes propriétés antibactérienne, antifongique et anti-termite à l'origine de la durabilité du bois vis-à-vis des organismes lignivores (Maranhão et al, 2013). Le bois de cœur est en général plus résistant que l'aubier car il est plus riche en extractibles. La plupart des composés dotés de propriétés antifongique et termicide sont des composés phénoliques comme les flavonoïdes, les stilbènes, les quinones et les tanins. Les composés terpéniques comme les acides résiniques ou les tropolones ont également de très bonnes propriétés biocides (Haluk et al, 1994 et Roussel-Bousta, 2000). La

durabilité naturelle du bois de cœur d'*Acacia auriculiformis* a été attribuée à la présence dihydromorine, d'oxyresveratrol et d'aromadendrine dans les extraits (Schultz et al, 1995). La durabilité naturelle du bois de Teck est en grande partie liée à la forte quantité des extraits quinoliques comme la tectoquinone et la naphthoquinone qu'il contient. Ces extraits quinoliques inhibent fortement la croissance de *Trametes versicolor* (Niamké et al, 2012). Les composés comme Le 2, 4, 3', 5'-tétrahydroxystilbène et le 2, 4, 5, 3', 5'-pentahydroxystilbène sont à l'origine de la durabilité naturelle du pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) face à l'attaque des champignons de pourritures blanches et brunes (Schultz et al, 1995).

I.4. Agents biologiques de détérioration du bois

Constitué de matières organiques telles que la cellulose, les hémicelluloses et la lignine et dans une moindre mesure d'amidon, de pectines et d'extractibles, le bois demeure un matériau potentiellement attaqué par les différents agents biologiques de détérioration du bois. Les agents susceptibles de détériorer le bois sont de trois types (Fougerousse, 1960). Les microorganismes (champignons et bactéries) ; les insectes xylophages (les termites) et les térébrants marins (mollusques et crustacés). Nous nous intéresserons dans la suite de notre étude bibliographique aux champignons et aux termites qui ont été les agents de dégradation étudiés dans notre travail.

I.4.1. Les champignons de dégradation du bois

En dehors des classifications des champignons par les mycologues, les professionnels du bois distinguent les champignons selon les types de dégâts qu'ils occasionnent. On distingue ainsi les champignons de décoloration, et les champignons lignivores ou de pourriture qui peuvent selon les cas être classifiés en pourriture brune, pourriture blanche et pourriture molle.

I.4.1.1. Les champignons de décoloration

Les champignons de décoloration (Figure 23 et 24) appartiennent à la famille des Ascomycètes. Ces derniers sont incapables d'altérer les parois des cellules ligneuses mais ils peuvent provoquer des modifications d'aspect et de volume (Vernay et al, 1997). Ils créent cependant un milieu favorable à d'autres agents de dégradation du bois (Medzegue, 2003). Ils se développent sur le bois fraîchement abattu en attaquant principalement l'aubier. Les dégâts causés par ce genre de champignon sont d'ordre purement esthétique parcequ'ils se nourrissent uniquement à partir des substances de réserves comme l'amidon présent dans l'aubier. Ces

dégâts peuvent être profonds ou simplement superficiels (Fouquet, 2003). On distingue ainsi pour cette catégorie, les champignons de bleuissement et les échauffures. Les champignons de bleuissement n'entraînent pas de changements appréciables de la consistance du bois et de ses propriétés mécaniques. Ils provoquent seulement une coloration spécifique du bois (bleu à noir). En 2002, Colling note cependant qu'ils pénètrent souvent de plusieurs centimètres dans le bois alors que les échauffures, lorsqu'elles sont importantes, sont capables d'entraîner un changement très accentué de la consistance du bois. Elle est causée par une attaque enzymatique du bois semblable à celle de la pourriture fibreuse. C'est d'abord la lignine et ensuite la cellulose qui sont dégradées.



Figure 24: Bleuissement primaire sur du bois fraîchement scié.



Figure 23: Attaque du bois par les échauffures.

I.4.1.2. Les champignons lignivores de pourritures

Leurs hyphes se répandent au travers du bois désintégrant les parois cellulaires, réduisant ainsi la résistance du bois. Ces champignons sécrètent des enzymes qui catalysent des réactions avec pour résultat de transformer les principaux constituants du bois en composés facilement assimilables par ces derniers (Erickson et al, 1990). En occasionnant une modification irréversible du matériau, les champignons de pourriture sont considérés comme ceux qui occasionnent les dégâts les plus graves. Pour cette catégorie de champignon, il existe trois types de pourritures : la pourriture blanche, pourriture brune et la pourriture molle (Silva et al, 2007). Chacun d'eux dégrade de façon préférentielle certains constituants du bois ce qui se traduit par différents effets en termes de modification des propriétés du matériau. Ces champignons ont même la capacité de métaboliser certains biocides utilisés pour la préservation du bois (Shultz and Nicolas, 2000). Les champignons ont besoin pour se développer que les conditions

favorables à leur croissance soient réunies. L'humidité est le facteur le plus important de tous. L'humidité minimale à partir de laquelle les champignons sont capables de se développer est comprise entre 30 et 35% en zone tropicale et de 20 à 22% en zone tempérée, pour une température comprise entre 20 et 35°C. En plus de l'humidité et la température, les éléments minéraux, l'oxygène et un pH compris entre 4,5 et 5,5 sont également importants pour le développement des champignons.

I.4.1.2.1. Les pourritures blanches

Aussi appelée pourriture fibreuse, la pourriture blanche est principalement causée par les champignons appartenant à la famille des basidiomycètes. Ces derniers produisent des enzymes comme les peroxydases et les laccases qui détruisent la structure aromatique de la lignine et des extractibles phénoliques. Ces champignons dégradent préférentiellement la lignine, ils dégradent également, les hémicelluloses et la cellulose pouvant conduire à la minéralisation totale du bois. Les dégâts causés par les champignons de pourriture blanche ne se limitent pas seulement à la couche S2 comme avec les champignons de pourriture molle, mais s'étend aussi au niveau des couches S1 et S3. Ces pourritures se développent préférentiellement sur les feuillus et parfois sur des résineux. Parfois en symbiose avec des bactéries, certaines d'entre elles font des associations mutualistes pour dégrader les extraits hydrophobes du bois. Ce type de champignon dégrade tous les éléments structuraux du bois (cellulose, hémicelluloses et lignine) de façon sélective en fonction du type de pourriture blanche. On distingue ainsi au niveau des pourritures blanches deux sous catégories : la pourriture blanche simultanée capable de dégrader simultanément quasiment dans les mêmes proportions la cellulose, les hémicelluloses et la lignine rendant ainsi le bois fragile au début de l'attaque, ensuite il devient fibreux et rigide (Mbang, 2004) et la pourriture blanche préférentielle qui dégrade d'abord la lignine et les hémicelluloses avant d'attaquer la cellulose en rendant ainsi le bois mou et fibreux dans le sens longitudinal (Figure 25) (Mbang, 2004).

I.4.1.2.2. Les pourritures brunes

Encore appelées pourritures cubiques, les champignons responsables de cette pourriture dégradent préférentiellement les polysaccharides (cellulose et hémicelluloses), laissant ainsi la lignine plus ou moins intacte. Ainsi la lignine brune non dégradée par le champignon confère au bois une coloration brune typique. Le bois dégradé présente de nombreuses fissurations délimitant des zones plus ou moins cubiques conduisant à appeler ces pourritures brunes

pourritures cubiques (Figure 26). La dégradation du bois par ce type de champignon aboutit très souvent à la perte des propriétés mécaniques de ce dernier.

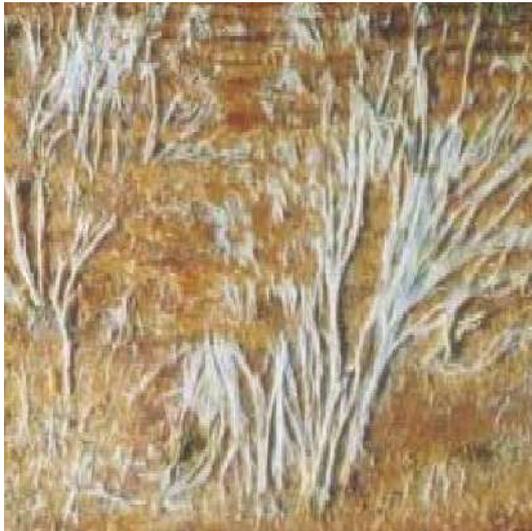


Figure 26: Bois envahi par le mycélium de pourriture blanche.



Figure 25: Aspect du bois attaqué par de la pourriture brune.

I.4.1.2.3. Les pourritures molles

Ces dernières appartiennent à la familles Ascomycètes tels que *Chaetomium globosum* ou *Hypocrea rufa* et à la famille des Deutéromycètes comme *Trichoderma harzianum* ou *Cladosporium cladosporioides*. On les retrouve dans les milieux d'extrême humidité présentant un faible taux d'oxygène. La pourriture molle est provoquée par une attaque conjuguée de plusieurs champignons microscopiques qui érodent les parois cellulaires du bois et détruisent préférentiellement la cellulose dans la paroi secondaire (Mbang, 2004). Ce type de champignon est capable de dégrader le bois dans des conditions extrêmes telles qu'une forte saturation des fibres en eau ou bien une faible teneur en oxygène (Figure 27).



Figure 27: Vue au microscope de l'impact de la pourriture molle

I.4.2. Les insectes xylophages

Les insectes sont des invertébrés qui appartiennent à l'embranchement des arthropodes caractérisés par leur squelette externe. Ils représentent près de 80% des espèces animales. Ces derniers se distinguent des autres classes d'arthropodes par certains caractères morphologiques intrinsèques comme leurs trois paires de pattes articulées, le corps constitué de trois parties bien distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen. Pour assurer leur développement, certains insectes se nourrissent de la matière ligneuse. D'autres insectes s'attaquent au bois sec, ce sont les insectes de bois secs ou préfèrent le bois frais voire déperissant renfermant un taux d'humidité élevée, ce sont les insectes de bois frais (Fouquet, 2003).

I.4.2.1. Les insectes de bois frais

Ces insectes xylophages vivent dans les bois dont le taux d'humidité est élevé. Ils ne peuvent vivre que dans les bois ayant un taux humidité supérieur à 35%, leur action s'arrête lorsque l'humidité devient inférieure à 35%. Ils peuvent également se trouver sur les arbres déperissant ou sur les grumes fraîchement abattues. Parmi ceux-ci, on peut citer les bostryches, les scolytes, les sirex, ainsi que les abeilles et les fourmis charpentières.

I.4.2.2. Les insectes de bois secs

Ces insectes se développent sur des bois secs dont le taux d'humidité est inférieur à 18%. Ils s'en nourrissent et s'y reproduisent. Ils sont très dangereux pour les bois mis en œuvre pour la construction car plusieurs générations d'insectes peuvent poursuivre le travail de destruction sur une même pièce de bois. Parmi toutes les classes d'insectes, trois ordres sont capables de dégrader le bois : les isoptères, les coléoptères et les hyménoptères. Nous ne décrivons que les termites appartenant à l'ordre des isoptères du fait du travail axé sur ces derniers.

I.4.2.3. Les termites

Les termites, dont le nom vient du mot latin «*termes*» qui veut dire vers rongeur sont tout le contraire des autres insectes xylophages, ce sont des insectes sociaux vivant en colonies dans des conditions bien déterminées dont la taille de la colonie varie d'une centaine à quelques millions d'individus. Ils ne peuvent pas vivre isolément. Elles sont également appelées «fourmis blanches». Pour leur développement, il faut des conditions climatiques semblables à celles rencontrées en zone tropicale : une forte pluviométrie, une humidité de l'air importante et une température élevée à partir de 22°C à plus de 30°C. Dans le monde, on dénombre 285 genres et plus de 2700 espèces de termites majoritairement réparties en zone tropicale. Seulement 75

espèces présentent un réel danger pour la construction. Les termites sont regroupés en trois grandes catégories : les termites souterrains (famille des Rhinotermitidae, *Reticulitermes lucifugus*, *Reticulitermes santonensis*, genres Heterotermes et Coptotermes). Les termites de bois secs (famille des Kalotermitidae, *Kalotermes flavicollis* et *Cryptotermes brevis*) et les termites arboricoles (genre Nusutitermes). Ce sont les termites du genre *Reticulitermes* qui causent les plus gros dégâts vis-à-vis du bois. Dans une colonie, on distingue différentes castes : les soldats, les ouvriers, les nymphes, les reproducteurs (sexué imago et sexué de remplacement ou néoténiques) et les larves cohabitent. La morphologie des individus de chaque caste est très importante et adaptée avec leur fonction (figure 28). Le cycle de développement des termites souterrains est représenté dans la figure 29. Les termites avec leur bonne répartition du travail et une minutieuse spécialisation dans les différentes tâches font preuve d'une efficacité collective hors du commun.



Figure 28: Photographies de termites ; de gauche à droite : Ouvrier, Soldat, Nymphe et Adulte ailé

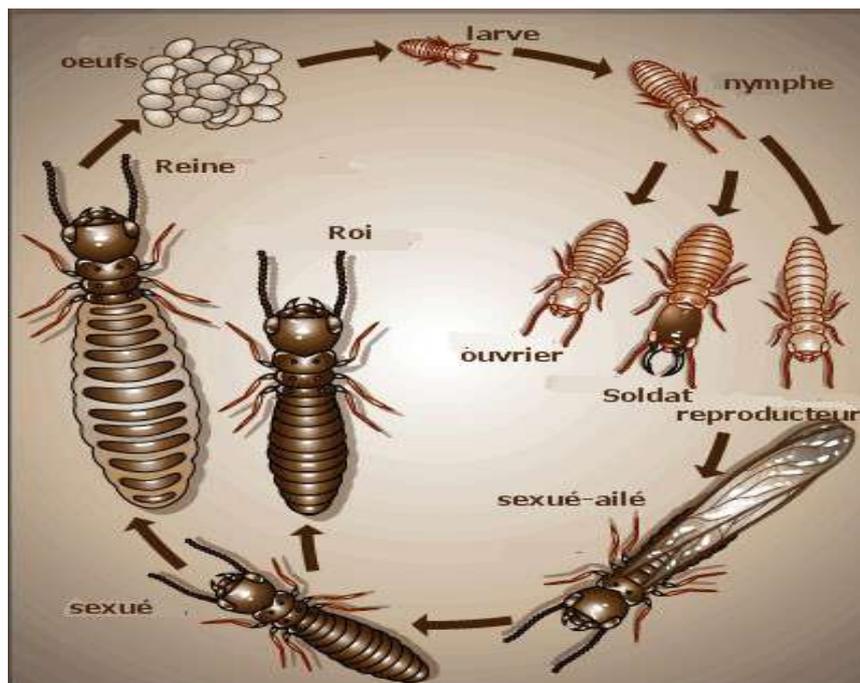


Figure 29: Cycle de développement des termites souterrains

I.5. Valorisation des extractibles de bois

I.5.1. Valorisations industrielles des extractibles de bois

Les possibilités de valorisations des extractibles du bois sont multiples. Ces derniers peuvent trouver des applications en pharmacologie, en parfumerie, en cosmétique, en agroalimentaire, comme colorants ou dans le domaine des résines et polymères. Les extractibles de bois constituent une gamme variée de produits, qui selon leurs propriétés peuvent conduire à des applications comme indiqué juste avant. Au Canada par exemple, dans le but de valoriser la biomasse forestière l'équipe du Professeur Tatjana Stévanovic mène des projets novateurs sur les extractibles. Ainsi, l'évaluation *in vitro* des activités biologiques (antiradicalaire/antioxydante, antimicrobien, processus de vieillissement de la peau, diabète de type 2) d'extraits de bois (écorces, nœuds et bois de cœur) vise à déterminer leurs potentielles d'applications en nutraceutique, cosmétique, agro-alimentaire ou en pharmaceutique. Différents travaux du même type sont également menés en Europe, notamment dans les pays scandinaves, ou au laboratoire dans le cadre des projets LBS (Le Bois Santé) ou ExtraFor-Est. En Afrique et particulièrement au Gabon, ces extractibles ne sont pas valorisés au niveau industriel, seulement en médecine traditionnelle sous forme de décoctions et autres. Parmi tous les extractibles cités plus haut, les plus étudiés et qui trouvent très souvent des applications industrielles sont les polyphénols (Stévanovic et al, 2009). L'hydroxymatairésinol, extrait présent des nœuds de l'épicéa de Norvège, est utilisé en tant que complément alimentaire pour la lutte contre le cancer du sein et dans le traitement de la prostate (Stévanovic et al, 2009). Depuis des années, les tannins sont utilisés pour la fabrication d'adhésifs verts, des mousses ignifuges, des teintures, pour le tannage du cuir. Dans l'hévéa, les extraits (polyterpènes) permettent d'obtenir le latex pour la fabrication du caoutchouc naturel (Stévanovic, 2011). En pharmacie et nutraceutique, l'aspirine qui est un dérivé de l'acide salicylique extrait de l'écorce du Saule (*Salix sp*) est utilisé comme antypyrétique, anti-inflammatoire, analgésique et anticoagulant. Les triterpènes comme la lupéol, la bétuline et l'acide bétulinique extraits de l'écorce du bouleau jaune et blanc sont utilisés pour leurs activités anticancéreuses. L'extrait de Ginko (*Ginkgo biloba*) riche en polyphénols est très efficace contre les troubles de la mémoire, les déficiences vasculaire périphériques, la dégénérescence musculaire, l'acouphène, les vertiges et la rétinopathie diabétique (Qa'dan et al, 2010). De par leurs propriétés colorantes et leur bonne capacité à piéger les radicaux libres, les anthocyanes sont beaucoup utilisés dans l'agroalimentaire et la cosmétique. L'extrait du sapin baumier (*Abies balsamae*) contenant la juvabione est utilisé pour l'inhibition de l'hormone juvénile des coléoptères. L'extrait de

l'écorce du quinquina, la quinine est utilisée en pharmacie comme un antipaludique. Le taxol isolé de l'écorce de l'if du pacifique dans les années 70 est utilisé pour ses propriétés anticancéreuses. Le linalool et le santalol extraits respectivement du bois de rose (*Aniba duckei* : *Lauraceae*) et du bois de santal (*Santalum album* : *Santalaceae*) sont utilisés pour les parfums en cosmétique.

I.5.2. Activités antioxydante et antiradicalaire des extractibles

Les radicaux libres sont définis comme étant des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette configuration électronique rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées conduisent à leur tour à de nouveaux radicaux libres et initient ainsi différentes réactions de dégradation oxydante. Ces phénomènes concernent aussi bien le domaine des matériaux que celui du vivant. Ils sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes, qu'exogènes. Les radicaux libres ont pu être mis en évidence pour la première fois grâce à l'analyse de résonance paramétrique électronique (RPE) des échantillons ayant été exposés à une source lumineuse à différentes intensités et différents temps d'exposition (Hon et Ifju, 1978). A l'état naturel, il n'existe pas de radical libre dans le bois sa présence reflète la dégradation du matériau (Hon et al, 1980). Les principales sources de dégradation du bois induisant les radicaux libres dans leurs processus de dégradation sont la lumière dans la photodégradation du bois et les microorganismes avec leurs processus de dégradation enzymatique. Ces radicaux libres peuvent ensuite migrer en profondeur dans le bois entraînant une dépolymérisation et des dégâts en profondeur (Feist et Hon, 1984). On définit la photodégradation comme étant un phénomène de surface qui dépend entre autres de la densité du bois et du temps d'exposition. Elle a permis de mettre en évidence que l'intensité de formation des radicaux libres était dépendante de la longueur d'onde donc de l'énergie du photon. Elle suit alors la cinétique d'une réaction Norrish de type I par dégradation homolytique des liaisons carbone-carbone adjacentes au carbone alpha du composé carbonyle. C'est la lignine qui est donc impliquée et permet la formation des radicaux libres participant à la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses (Derbyshire et Miller, 1981). Les polysaccharides sont aussi sujets à la photodégradation. Mais la distinction entre hémicelluloses et cellulose est difficilement réalisable à l'aide des techniques analytiques actuelles. Les études ont démontré que la lignine était la plus sensible à ce type de dégradation avec un pic d'absorption à 280 nm jusqu'à 400 nm (Pandey, 2005a) dû à la présence des groupements aromatiques et phénoliques qui absorbent fortement dans les UV (Kalnins, 1984). C'est le cas des chromophores donnant la coloration du matériau.

Sa dégradation tend à rendre la surface du bois plus hydrophile (Williams, 2005). Sur le plan macroscopique, les cibles de la photodégradation sont essentiellement les chromophores de la lignine qui entraînent un changement de la coloration du bois par formation des groupements chromophores secondaires. Cette coloration du bois dépend de la longueur d'onde, de la température et de l'intensité (Pandey, 2005b). Sur le plan microscopique, la caractérisation de la dégradation du matériau confirme que la lignine est la plus altérée par la photodégradation. Elle se retrouve principalement dans la lamelle moyenne à hauteur de 73 % et de 16 % dans les parois secondaires des trachéides. La destruction de la lignine entraîne donc une perte de cohésion entre les fibrilles (Volkmer et al, 2013) et donc entre les cellules, On parle alors de délamination (Singh et Dawson, 2003; Williams, 2005). En fonction de l'environnement, de nombreux microorganismes tels que les champignons de pourritures brunes ou blanches sont capables de coloniser et de dégrader le bois. Ils sont ubiquitaires et ont un impact direct sur la qualité du bois, sur son utilisation ou sa durée de vie. Ce sont des organismes eucaryotes et hétérotrophes qui doivent donc trouver une source externe de matière organique pour pouvoir vivre et se développer. Les composés lignocellulosiques, les saccharides des parenchymes du bois d'aubier et les extractibles présents dans le bois peuvent alors être considérés comme des sources de nutriment. A l'échelle microscopique, ces champignons filamenteux sont constitués de thalles composés d'une multitude de sous-structures appelées hyphes. C'est l'assemblage de nombreux thalles qui permet à l'échelle macroscopique d'avoir le mycélium. L'infection du bois par ces champignons commence par la pénétration des hyphes dans la paroi cellulaire. Cela permet la sécrétion d'un cocktail enzymatique qui oxyde les chaînes des composés aromatiques et facilite leur métabolisation (Bousslimi et al, 2014). Pour pallier ce problème, l'on apporte en aide à ce système de défense des antioxydants exogènes naturels ou synthétiques. Ces molécules agissent en piégeant les radicaux libres transformant ces derniers en entités stables justifiant l'intérêt croissant sur la recherche de molécules antioxydantes. On peut définir les antioxydants comme étant des substances qui inhibent ou ralentissent l'oxydation d'un substrat. Ces derniers sont présents sous différentes formes et sont susceptibles d'intervenir soit en prévention de la formation des radicaux libres, soit pour participer à leur élimination (antioxydants primaires et secondaires). Les antioxydants sont présents naturellement dans notre alimentation (fruits, légumes, thé, vin rouge, cacao et café). Dans la conservation des aliments, les aliments lipidiques résistent moins à l'oxydation par l'oxygène. Au niveau de l'industrie agroalimentaire, différents antioxydants synthétiques sont officiellement autorisés et utilisés tels que le 2-tert-butyl-4-oxy anisole ou hydroxyanisole butylé (BHA), le 2,6-ditert-butyl-4-méthyl phénol ou hydroxytoluène

butylé (BHT), le 2-tert-butyl-1,4-benzenediol ou hydroquinone butyle (TBHQ) et le gallate de propyl (PG) dont les différentes structures sont présentées dans la figure 30.

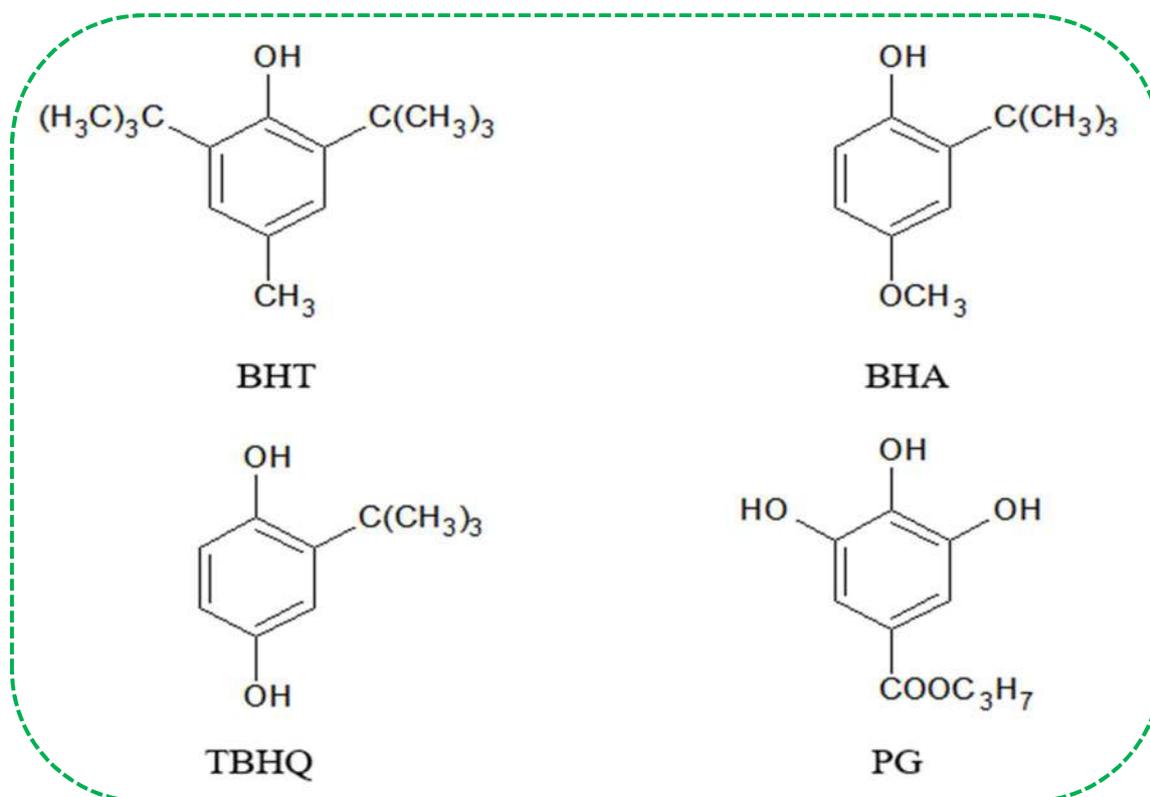


Figure 30: Structure des antioxydants de synthèse autorisés dans l'industrie agroalimentaire.

Les travaux réalisés par [Linderschmidt et al en 1986](#) et [Kalamouni en 2010](#) sur la toxicité de certains de ces antioxydants synthétiques notamment le BHT et le BHA sur des rongeurs ont révélé que ces derniers étaient potentiellement cancérigènes et s'accumulaient dans l'organisme. Conscient de ces problèmes, il semble opportun de se tourner vers des sources d'antioxydants naturels moins toxiques et bénéfiques pour la santé. Les antioxydants naturels sont surtout des composés phénoliques que l'on rencontre dans la quasi-totalité des plantes. Ces derniers sont issus du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont principalement synthétisés par voie métabolique du «shikimate» qui existe uniquement chez les champignons, les bactéries et les plantes. Ces composés polyphénoliques sont capables de piéger des espèces radicalaires, de chélater les métaux comme le Fer et le Cuivre connus comme agents pro-oxydants. Ces composés phénoliques peuvent aussi interagir avec des cibles protéiques leur conférant d'autres propriétés telles que : insecticide, fongicide, fongistatique, termicide, nématicide en plus des activités antioxydantes. Les structures de quelques antioxydants naturels rapportées dans la littérature sont présentées dans la figure 31 ([Pietta, 2000](#) ; [Moure et al, 2001](#)).

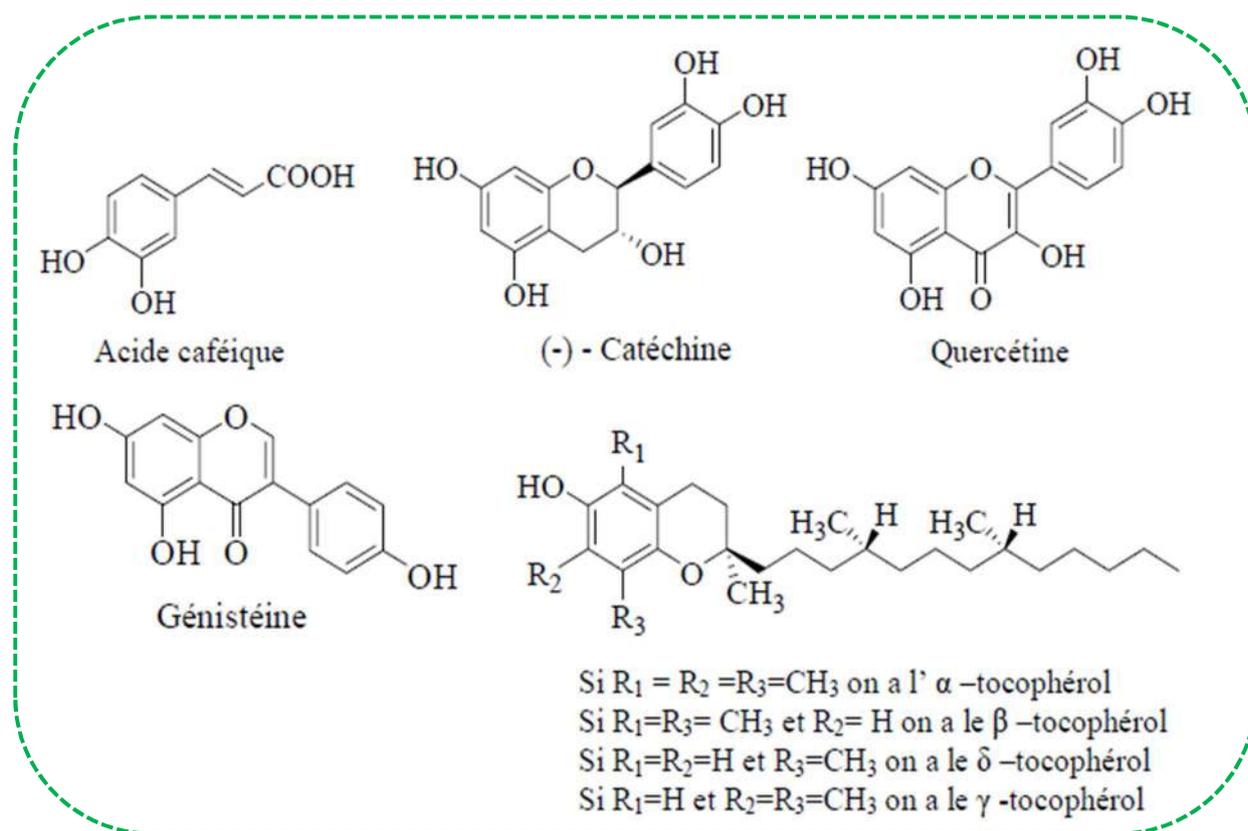


Figure 31: Structures de quelques antioxydants naturels.

Aujourd'hui, les antioxydants naturels sont largement sollicités et utilisés dans plusieurs domaines comme la diététique, l'agroalimentaire, la cosmétologie, le domaine médical et l'industrie moderne. C'est le cas de l'acide ascorbique (vitamine C), du tocophérol (apparenté à la vitamine E) qui sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Kalamouni, 2010 ; Taga et al, 1984 ; Pérez-Bonilla et al, 2006 ; Altarejos, 2005).

I.5.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante et anti-radicalaire

Durant ces dernières décennies, les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ont été largement développées pour mesurer l'efficacité de nouveaux composés. Différentes méthodologies permettant d'évaluer le potentiel antioxydant sous différentes conditions sont disponibles aujourd'hui. La plupart de ces méthodes fait référence à la capacité d'une entité qui peut être un extractible à piéger les radicaux libres à partir des radicaux stables (ABTS, DPPH, AAPH...) afin d'avoir des informations sur la capacité de cette entité à piéger les radicaux libres (Tirzitis and Bartosz, 2010). Parmi toutes ces méthodes, seul les méthodes expérimentales sont les plus répandues, et seront abordées dans la suite de cette étude bibliographique.

❖ **Test au DPPH (radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :**

le DPPH[•] (ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical stable à température ambiante avec une couleur bleu-violet caractéristique. Sa stabilité est liée à la haute délocalisation des électrons π le long de la molécule. C'est l'un des premiers radicaux à avoir été utilisé dans l'étude des relations structure/activité antioxydante des composés phénoliques. Dans sa structure, il possède un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. La spécificité de ce radical provient de la modification de ses propriétés d'absorption UV/ Visible selon son état réduit (c'est-à-dire après ajout d'électron) qui absorbe à 515-518 nm, tandis que sa forme oxydée ne présente aucun pic d'absorption. C'est une méthode spectroscopique, elle a été décrite pour la première fois par [Branwilliam et al, 1995](#). Elle est utilisée dans de nombreux travaux d'abord pour la simplicité de sa mise en œuvre, pour la reproductibilité et son coût. Lorsque le radical DPPH est mis en contact avec une entité capable de transférer un atome d'hydrogène (ArOH) ou même un autre radical (R), ce dernier est réduit sous sa forme non radicalaire qui s'accompagne d'une perte de coloration qui s'observe par le changement de couleur allant du bleu-violet (forme oxydée) au jaune (forme réduite). L'efficacité antioxydante peut ainsi être mesurée. Le mécanisme réactionnel de ce test est décrit dans la figure 32 ci-dessous.

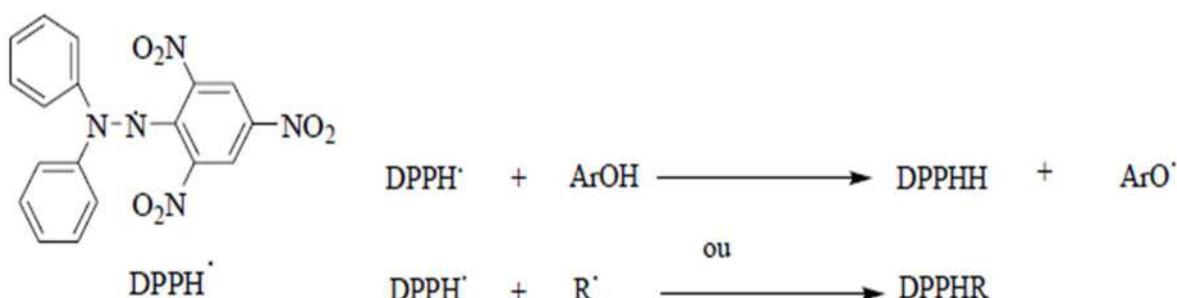


Figure 32: Mécanisme réactionnel de réduction du radical DPPH

❖ **Test ABTS ou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) :**

Le test TEAC est semblable au test avec le DPPH. Dans le cas précis, ce test permet de mesurer la capacité d'une entité à piéger le radical cationique ABTS^{•+} obtenu à partir du sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS). Ce test a été décrit pour la première fois par [Miller et al, 1993](#). C'est un test comme le précédent, facile à mettre en place ne nécessitant que les réactifs et un spectrophotomètre sont nécessaires. De plus, il est rapide et moins coûteux et donne de

bonnes corrélations avec d'autres tests biologiques. Son principal inconvénient réside dans l'instabilité des radicaux $ABTS^{\cdot+}$. Ces derniers doivent être générés à partir de sels d'ABTS et la mesure doit être effectuée très rapidement. C'est également un test colorimétrique où la décoloration de la solution bleu-verte d' $ABTS^{\cdot+}$ sera observée lors de la formation de $ABTSH^+$ de couleur bleue. Cette décoloration pourra être quantifiée par un spectrophotomètre (Absorption UV/Visible) à 743nm. Le mécanisme réactionnel de ce test est indiqué dans la figure 33 ci-dessous. Ce test présente l'avantage spécifique d'être utilisable pour les composés hydrophiles et lipophiles.

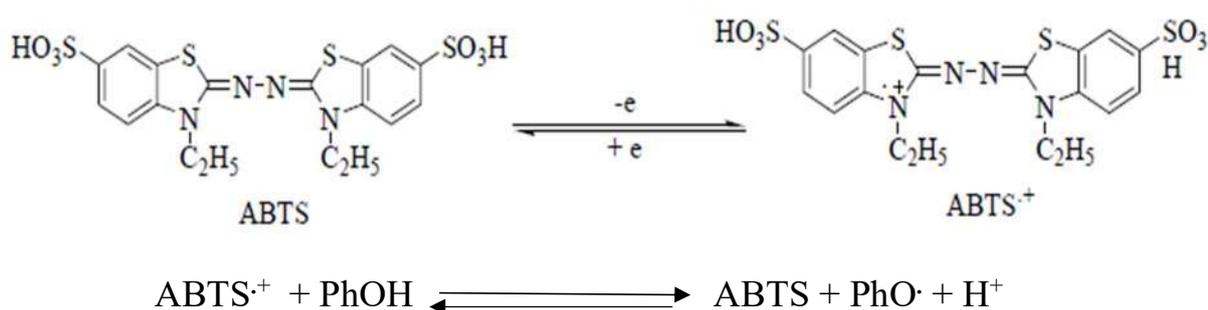
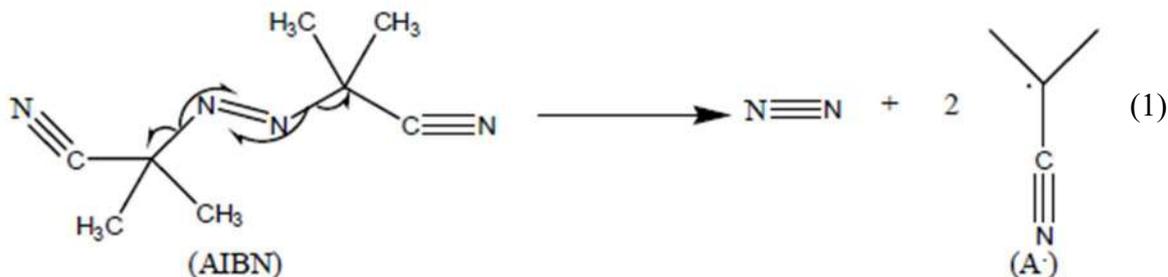


Figure 33: Mécanisme réactionnel d'oxydation de l'ABTS.

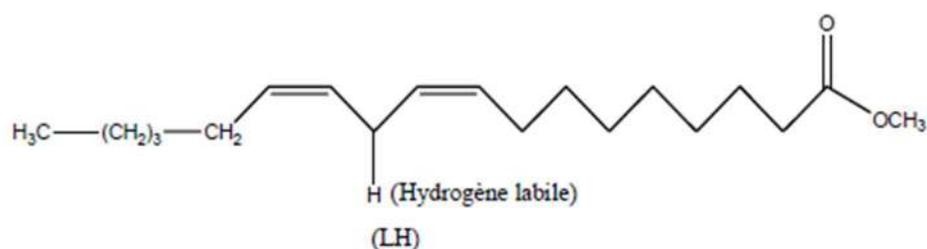
❖ **Test au méthyle linoléate : peroxydation lipidique :**

Pour ce test, on utilise la forte capacité du linoléate de méthyle à s'oxyder (LH) à cause de l'hydrogène labile qu'il possède en position α de sa double liaison. L'oxydation de ce dernier est amorcée par l'azobisisobutyronitrile (AIBN) pour la production des radicaux libres, c'est la phase d'amorçage de la réaction dont le mécanisme est décrit comme suit dans la réaction (1) :

Phase d'amorçage : production des radicaux libres



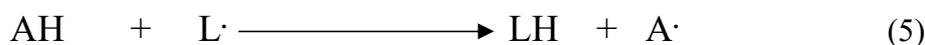
Au cours de la phase d'amorçage, sera produit un radical libre tertiaire stabilisé par le groupement nitrile. Ce radical va alors réagir avec le linoléate de méthyl pour transformer l'espèce radicalaire sur ce dernier (réaction 2).



Après cette phase d'amorçage, la phase de propagation se produit. Cette phase réactionnelle est très rapide à cause de la réactivité des radicaux libres qui est très élevée (réactions 3 et 4).



La terminaison de la réaction n'intervient qu'en présence d'une entité antioxydante possédant un hydrogène labile comme les composés phénoliques (noté ici AH) avec la formation d'un radical libre (A·) plus stable (réaction 5).



Cette méthode est très utilisée pour l'évaluation de l'oxydation des composés polyinsaturés car ces derniers s'oxydent lentement à l'air et à température ambiante.

❖ **Test FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) :**

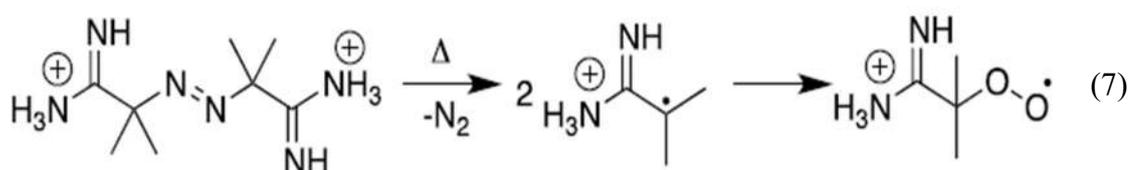
Le test FRAP est basé sur le changement de coloration lors de la réduction du Fer, il a été décrit pour la première fois par [Benzie et Strain en 1999](#). L'antioxydant réduit le complexe [Fe(III)/tripyridyltriazine] en excès en un complexe bleu de fer(II) selon la réaction ci-dessous entraînant ainsi une augmentation de l'absorption mesurée à 593 nm. Bien que le transfert de l'atome d'hydrogène ne soit pas le mécanisme privilégié lors de cette réaction, l'antioxydant doit être capable de donner un électron (réaction 6).



Ce test est peu coûteux, simple à réaliser, reproductible et rapide. L'inconvénient est qu'il n'est pas capable d'évaluer l'activité antioxydante des thiols (SH), incluant donc les polypeptides et les protéines à groupement cystéine.

❖ **Test ORAC (oxygen radical absorbance capacity) :**

Le test ORAC est un test très utilisé en biologie, il permet de mesurer la capacité antioxydante de différents aliments *in situ*. Il a été décrit pour la première fois par l'équipe de Glazer (Cao et al, 1993). Le principe de ce test repose sur la mesure de la dégradation oxydative d'un composé fluorescent après avoir ajouté un initiateur de radicaux libres, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). La dégradation thermique de cette molécule en présence d'oxygène induit la génération des radicaux libres de façon régulière comme on peut le voir dans la réaction ci-dessous qui indique la modification de l'AAPH lors du transfert électronique (réaction 7).



I.5.4. Description de l'essence étudiée

Le noisetier du Gabon, de son nom scientifique *Coula edulis*, est largement réparti dans la zone forestière de l'Afrique de l'Ouest et Centrale depuis la Sierra Léone jusqu'en République Démocratique du Congo (Vivien et al, 1996). Il appartient selon White, 1983 à la phytochorie du domaine guinéo-congolais. Les nombreuses appellations vernaculaires, "Ndoko" (Mendé) en Sierra Léon et au Libéria, "Séatou" (Guéré), "Bogue" (Agni), "Atsan" (Atié), "Akioula" (Ebrié), en côte d'ivoire, "Udo" (Igbo), "Ivianlegde" (Edo) et "Asala" (Yoruba) au Nigéria, "Ewome" (Ntumu), "Ewom" (Okak) au Cameroun, "Oghuda" (Ghêtsôghô), "Ewômoe", "Ewumi" (Fang), "Muguminu" (Bapunu, Eshira et Bavungu) au Gabon, "Nkumunu" (kikongo et kiyombe), "Bosau" (Mongo) en République Démocratique du Congo, (Adriaen, 1951 ; Walker et al, 1995 ; Villiers, 1973 ; Téké et al, 2005 ; Bukola et al, 2008) qui désignent *Coula edulis* en Sierra Léon, au Libéria, Côte d'Ivoire, au Nigéria, au Cameroun, au Gabon au Congo et en République Démocratique du Congo témoignent à la fois l'étendue de son aire de répartition et de son importance pour les populations locales d'Afrique de l'Ouest et Centrale. *C.edulis* appartient à la famille des Olacacées. C'est un arbre moyen de l'étage inférieur de la forêt du sous-bois, pouvant atteindre 30 m de hauteur. Le fût, à empattement ou cannelé à la base, est tortueux, irrégulier; il est souvent ramifié dès 3 à 4 m du sol. Son diamètre peut occasionnellement atteindre 1 m (Louis et al, 1948 ; Adam, 1971 ; Villiers, 1973 ; Vivien et al.,1996). Il est largement réparti dans la zone forestière de l'Afrique Occidentale et Centrale depuis la Sierra Léone jusqu'en République Démocratique du Congo (Vivien et al, 1996).

L'écorce grise, épaisse d'un mètre, est fendillée et s'exfolie en plaques épaisses souvent rectangulaires ; la tranche est fibreuse, cassante, brun-jaune et exsude de très fines gouttelettes blanches, surtout chez les jeunes arbres car l'arbre comporte, dans l'écorce et les feuilles, des lacunes résinifères schizogènes et des canaux laticifères. Le bois de Cœur de couleur brun violacé à brun sombre est bien distinct de l'aubier jaune blanchâtre qui atteint souvent des épaisseurs de 3 à 4 cm. Le bois de *Coula* est très lourd et quasi imputrescible. Il possède une masse volumique de $1,010 \text{ kg/m}^3$ et une dureté de Monnin de $7,5 \text{ N/mm}^2$ à 12% d'humidité. Le retrait au séchage est moyen, de l'état anhydre 5-5,1% dans le sens radial et 9,3-10% dans le sens tangentiel. Il est peu imprégnable, au séchage, le bois présente des déformations et des risques de fentes (CTFT, 1962). A 12% d'humidité, la contrainte de rupture en flexion statique est de 142 N.mm^{-2} et le module d'élasticité longitudinale est de 19490 N.mm^{-2} . Il est durable, étant résistant aux attaques des champignons, des insectes et plus particulièrement à celles des termites et présente une durabilité et une résistance aux tarets supérieures à celles de l'azobé (*Lophira alata* Banks). Le bois de *Coula* peut être utilisé en construction comme poteaux ou linteaux, mais aussi pour la fabrication des placages tranchés, les parquets (lourds ou industriels). Son écorce, utilisée dans la pharmacopée traditionnelle en Côte d'Ivoire est employée en décoction pour la purgation ou comme lavement et contre les douleurs lombaires ou les maux de reins (Téké et al, 2005). Au Gabon, *Coula edulis* est utilisé non seulement pour son bois mais aussi dans la médecine traditionnelle (Walker et al, 1995). Comme plante médicale, il intervient dans le traitement des maladies du sang, des organes génito-urinaires, de l'appareil digestif et contre les lésions traumatiques. Il est aussi employé contre l'anémie, les diarrhées, les ulcères, les blessures et plaies. Les figures 34 et 35 ci-dessous présentent respectivement un exemple de bois de *C.edulis* sur pieds et sa distribution géographique sur tout le continent africain.



Figure 35 : Bois sur pieds de *Coula edulis*

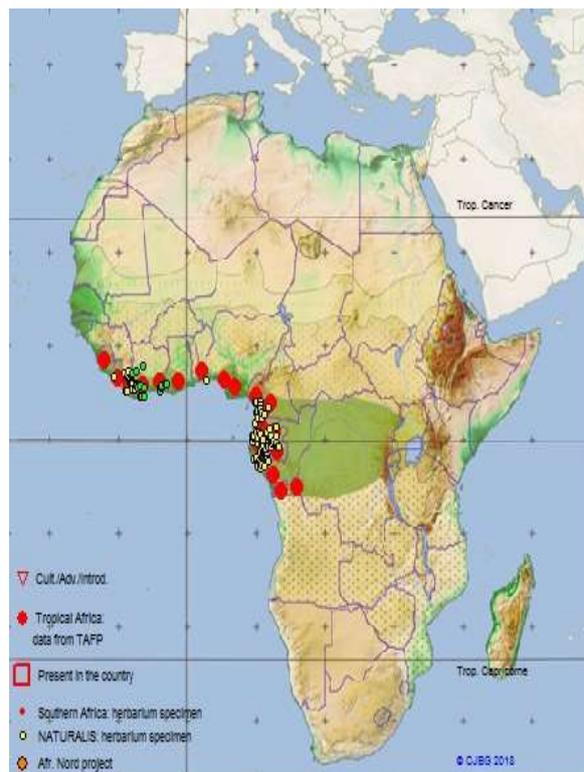


Figure 34: Carte de distribution de *Coula edulis*. Source :www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériels

II.1.1. Produits chimiques

2,6-di-tert.butyl-4-méthyl-phénol (BHT Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH ; Sigma-Aldrich), 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS ; Sigma-Aldrich), réactif de Folin-Ciocalteu pour les phénols (Sigma-Aldrich), acide chlorhydrique (Sigma-Aldrich, $>37\%$), le chlorure d'aluminium, l'acétate de potassium, le persulfate de potassium, l'hydrogénophosphate de sodium, la vaniline, le N,O bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide contenant 1% de triméthylchlorosilane [BSTFA/ 1% TMCS] ont été utilisés sans aucune purification. L'acide sulfurique concentré (95-97%), le dichlorométhane, l'acétone, l'éthanol absolu, le toluène, le méthanol, le perchlorure de fer, les copeaux de magnésium, le chloroforme, l'anhydride acétique ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich, Carlo Erba ou Prolabo et utilisés sans autre purification. De l'eau ultra pure obtenue à partir d'un équipement PURELAB Option Q (Elga) a été utilisée. Le réactif de Mayer (solution d'iodure mercurique de potassium), le réactif Bouchardat (2% d'iode dans une solution à 4% d'iodure de potassium), la solution de perchlorure de fer à 10% dans l'eau ont été préparés en laboratoire à partir de réactifs et de produits chimiques de qualité en utilisant les procédures de la littérature. L'extrait de malt pour la microbiologie et la gélose a été acheté auprès de Sigma-Aldrich.

II.1.2. Champignons

Différents champignons basidiomycètes ont été utilisés pour les tests de durabilité naturelle et d'inhibition de croissance : deux champignons de pourritures blanches (ou fibreuses) *Trametes Versicolor* (TV) ((Linneus) L. Quélet souche CTB 863 A) et *Pycnoporus Sanguineus* (PS) ((L.: Fr.)) et trois champignons de pourritures brunes (ou cubiques) *Rhodonia Placenta* (RP) ((Fries)) Cooke sensu J.Eriksson, souche FPRL 280), *Coniophora Puteana* (CP) ((Schumacher ex Fries) Karsten, souche BAM Ebw.15) et *Gloephyllum trabeum* (GT). Toutes les souches ont été fournies par le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) de Montpellier. Les souches ont été repiquées sur milieu malt-agar dans les boîtes de Pétri et maintenues à 22°C et à 70% d'humidité relative au Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois (LERMAB).

II.1.3. Termites

Pour les essais termites, une seule espèce de termites a été utilisée : *Reticulitermes flavipes* (anciennement appelée *Santonensis* de Feytaud) provenant de Soulac-sur-Mer. Ces termites sont conservés en bacs d'élevage dans une enceinte climatique obscure, bien aérée et réglée à une température de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et humidité relative minimum de 75%. Tous les essais termites ont été réalisés au Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) de Montpellier.

II.1.4. Matériel végétal

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur un arbre de *Coula edulis* provenant d'une forêt primaire gabonaise dans la zone d'Ayémé située dans la province de l'Estuaire, dont l'âge a été estimé entre 50 et 75 ans. Le bois utilisé pour réaliser ce travail a été abattu au mois d'août 2017. Le tronc de cet arbre a été coupé en trois rondins de 15 cm environ pour faciliter le transport du Gabon en France comme le décrit la figure 36 ci-dessous :

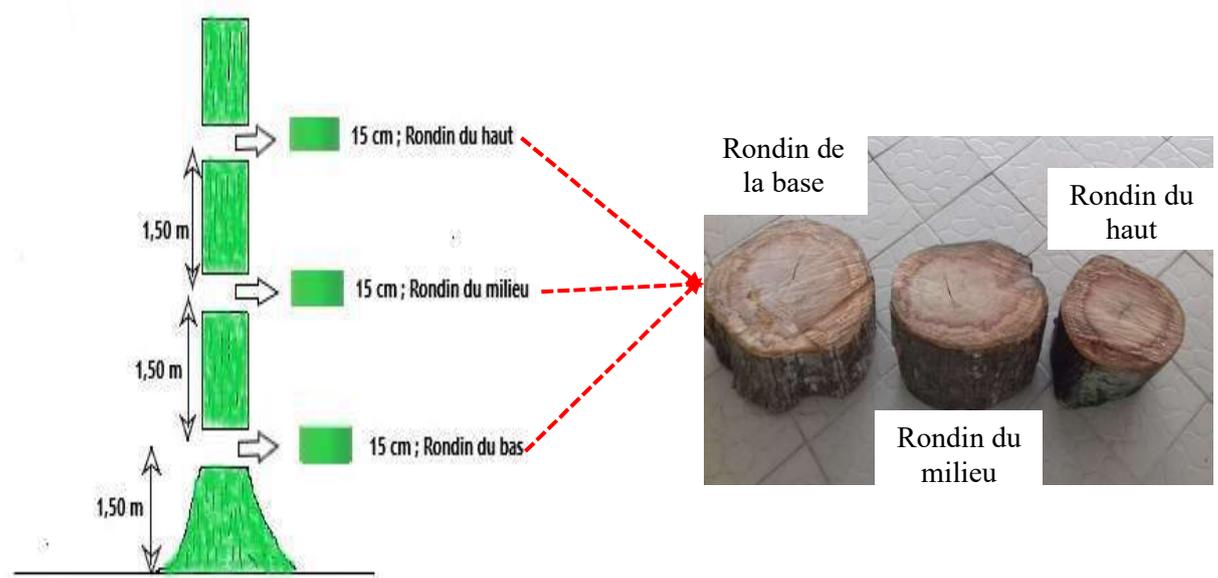


Figure 36: Protocole d'échantillonnage des rondins.

Différents échantillons ont été découpés et dimensionnés au LERMAB en fonction des essais à réaliser. Pour l'étude de la variabilité intra-arbre de la composition chimique de notre essence, différents échantillons ont été prélevés dans le sens radial sur les différents rondins prélevés précédemment de manière à sélectionner les différentes zones de bois (aubier, zone de transition, duramen externe, moyen et interne, et moelle) la figure 37 décrit le mode de prélèvement utilisé :

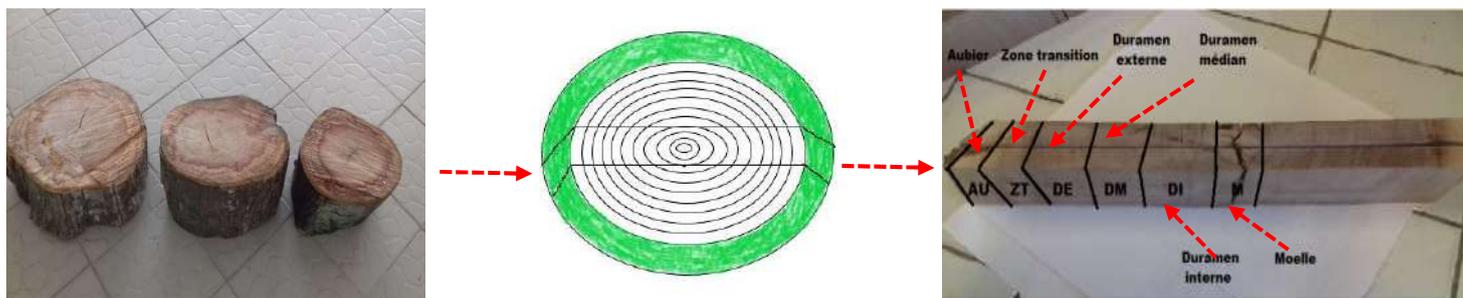


Figure 37: Dimensionnement des différents rondins.

Les sciures des différentes parties (écorce, aubier et duramen) ont été recueillies dans des petits sacs plastiques lors du dimensionnement des différents rondins. Ces sciures ont été broyées en fine poudre à l'aide d'un broyeur à bille (Retsh SM 100), tamisées à une granulométrie de ($\varnothing=0,160$ mm) pour optimiser les rendements d'extraction puis stockées dans des pots en verre après séchage 24 heures à l'étuve à 70°C. A l'aide d'une scie horizontale, des petites baguettes de bois de cœur de *C.edulis* ont été confectionnées pour la réalisation des éprouvettes de dimension nominale 30 x 10 x 5 mm³ dans les directions longitudinale, radiale et tangentielle. Selon les besoins, les éprouvettes ont été utilisées de façon aléatoire dans le lot disponible pour les différents essais de durabilité naturelle.

II.2. Méthodes

II.2.1 Composition chimique

Pour l'étude de la variabilité intra-arbre de la composition chimique, les échantillons ont été prélevés dans le sens radial sur les différents rondins comme l'indique la figure 37 ci-dessus puis les différentes parties ont été séparées en Aubier (AU), Zone de transition (ZT), la Moelle (M). Le Duramen a été divisé en Duramen externe (DE), Duramen médian (DM) et Duramen interne (DI). Après la séparation des différentes parties, les échantillons ont été découpés en petit morceaux à l'aide d'un ciseau à bois, broyés en fine poudre à l'aide d'un broyeur à bille (Retsh SM 100), tamisés ($\varnothing=0,160$ mm) puis séchés durant 24 heures à l'étuve à 70°C et stockés dans des pots en verre. 10 g de sciure des différents échantillons ont été ensuite extraits au Soxhlet successivement avec un mélange toluène/éthanol (2/1, v/v) pendant 24 heures, puis avec l'éthanol pendant 24 heures supplémentaires. Les extraits toluène-éthanol et éthanol ont été mélangés et le solvant évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les extraits ont

été séchés dans un dessiccateur sous vide en présence de P₂O₅ et pesés régulièrement à masse constante. La teneur en extractible a été déterminée en utilisant l'équation (3) décrite ci-dessus.

$$\text{Teneur en extractible (\%)} = \frac{m_{b+e} - m_b}{m_s} \times 100 \quad (3)$$

Où, m_b est la masse du ballon vide, m_{b+e} est la masse du ballon avec les extractibles et m_s la masse de sciure sèche extraite avant l'extraction. La sciure a été récupérée puis séchée au four à 103 °C pendant 48 heures avant la détermination des teneurs en lignine de Klason, cellulose, holocellulose et hémicelluloses. Toutes les analyses ont été adaptées de la procédure de la littérature avec de légères modifications (Rowell et al, 2005 ; Candelier et al, 2013) et réalisées en triplicat.

II.2.1.1. Teneur en cellulose

La fraction cellulosique a été obtenue en mélangeant 1 g de sciure de bois préalablement débarrassées de ses extractibles, avec 40 mL d'éthanol et 10 mL d'acide nitrique et chauffée à reflux (100 °C) durant 3 heures. A la fin de chaque heure, le mélange est filtré en s'assurant de conserver la partie insoluble. Après la troisième heure d'hydrolyse, le mélange est à nouveau filtré et rincé abondamment avec l'eau distillée, puis à l'éthanol et séché à 70 °C pendant 72 heures. La masse de la cellulose résiduelle (résidu blanc) obtenue est pesée, puis la teneur en cellulose est calculée selon l'équation (4):

$$\text{Teneur en cellulose (\%)} = \frac{\text{masse sèche du résidu de cellulose}}{1} \times 100 \quad (4)$$

II.2.1.2. Teneur en holocellulose

La fraction d'holocellulose est obtenue en mélangeant 2 g de sciure de bois préalablement débarrassée de ses extractible à 0,5 mL d'acide acétique en suspension dans 80 mL d'eau distillée et 1 g de chlorite de sodium. Le mélange a été chauffé à 70 °C pendant une heure. 0,5 mL d'acide acétique et 1 g de chlorite de sodium sont ajoutés régulièrement sous agitation toutes les heures pendant 7 à 8 heures (temps nécessaire pour dégrader la lignine). Le mélange est alors refroidi et filtré sur Buchner avec un filtre en papier préalablement séché et pesé. Le filtrat est lavé avec de l'eau distillée jusqu'à ce que la couleur jaune et l'odeur de dioxyde de chlore soient éliminées. Le résidu blanc (holocellulose) restant sur le papier filtre est ensuite lavé à l'acétone et séché à 103 °C pendant 24 heures. La teneur en holocellulose est déterminée selon l'équation (5):

$$\text{Teneur en holocellulose (\%)} = \frac{\text{masse sèche du résidu d'holocellulose}}{2} \times 100 \quad (5)$$

II.2.1.3. Teneur en lignine

La fraction de lignine est obtenue en éliminant les polysaccharides. 0,175 g de sciure de bois préalablement débarrassée de ses extractibles séchée à 103 °C a est mélangé dans une centrifugeuse avec 1,5 mL d'acide sulfurique H₂SO₄ (72%) et agité à 30 °C pendant une heure. Le tube est ensuite placé dans un bécher de 250 mL et autoclavé pendant 1 heure 30 minutes à 120 °C. Le mélange est alors dilué avec 100 mL d'eau distillée et filtré sur Buchner avec un filtre en papier préalablement séché et pesé. Le résidu de lignine Klason noir obtenu est séché à 103 °C pendant 24 heures jusqu'à masse constante. La teneur en lignine a été déterminée selon l'équation (6):

$$\text{Teneur en lignine (\%)} = \frac{\text{masse sèche du résidu de lignine}}{0,175} \times 100 \quad (6)$$

II.2.2. Extraction des sciures

Pour les extractibles destinées aux différentes analyses chimiques à venir, les sciures des différentes parties (écorce, aubier, duramen) recueillies lors du dimensionnement des différents rondins ont été utilisées. Ces sciures finement broyées en poudre, (tamisées granulométrie Ø= 0,160 mm) et stockées dans des pots en verre après séchage 24 heures à 70°C, ont subi des extractions successives avec des solvants de polarité croissante. Pour cela, deux méthodes d'extraction ont été utilisées : le Soxhlet et le Dionex ASE 350.

II.2.2.1. Extraction au Soxhlet

10 g des différentes sciures séchées ont été successivement extraits au Soxhlet pendant 24 heures avec des solvants de polarité croissante: dichlorométhane, acétone, toluène-éthanol (2/1, v/v) et eau. Chaque extraction a été réalisée en triplicat. Après extraction, le solvant a été évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, à l'exception des extraits aqueux qui ont été lyophilisés. Les extraits ont ensuite été séchés au dessiccateur sous vide en présence de P₂O₅ et pesés régulièrement jusqu'à masse constante (m_{b+e}). La teneur en extractible a été déterminée à l'aide de l'équation (3) citée plus haut au paragraphe II.2.1.

II.2.2.2. Extraction au Dionex ASE 350

Le système d'extraction ASE (Accelerated Solvent Extraction) de la société DIONEX permet des extractions rapides en utilisant les solvants habituels à des températures et pressions élevées (100°C et 200 bars). Les solvants retenus pour notre extraction au Dionex sont les mêmes que ceux utilisés pour l'extraction au Soxhlet et les extractions se sont également faites de la même manière (solvant de polarité croissante). La même masse de sciure (m_s) 10 g est utilisée avec

des cellules de 60 mL. Grâce à l'action combinée de la température et la pression, la durée totale de l'extraction est généralement inférieure à 15 minutes et la quantité de solvant utilisée est d'environ 1,5 fois le volume de la cellule d'échantillon (par exemple, environ 15 ml pour une cellule de 10 ml) . L'extraction est donc fortement accélérée par rapport au Soxhlet et nécessite peu de solvant. Au facteur rapidité s'ajoute l'automatisation totale du système d'extraction. Le processus d'extraction ASE se fait en plusieurs étapes de la manière suivante :

- ❖ L'échantillon solide est chargé dans une cellule d'échantillon 60 mL et les bouchons (contenant chacun un fritté) sont serrés à la main sur les cellules. Les cellules remplies d'échantillons sont chargées sur le carrousel de cellules et les récipients de collecte sont chargés sur le carrousel de collecte. Un bras robotisé transfère chaque cellule séparément dans le four pour l'extraction. Le four est maintenu à la température de fonctionnement sélectionnée tout au long des extractions (température ambiante à 100 °C) ;
- ❖ Une fois que la cellule est en place dans le four, la pompe commence immédiatement à injecter le solvant dans la cellule contenant d'échantillon à extraire. Des solvants purs ou mélanges sont utilisés. Une fois que la cellule d'extraction est remplie de solvant, la vanne statique se ferme pour permettre la pressurisation de la cellule. Comme le solvant se dilate en chauffant, la pression dans la cellule augmente lorsque la vanne statique se ferme. Lorsque la pression atteint 200 bars, la vanne statique s'ouvre rapidement pour relâcher la pression, puis se referme. La pompe fournit également du solvant frais à la cellule afin de ramener la pression à la valeur de consigne.
- ❖ Après les différents cycles d'extraction et la phase de rinçage, les extraits sont livrés aux récipients de collecte à travers un filtre et, dans de nombreux cas, ne nécessitent aucune préparation supplémentaire avant l'analyse. Une fois l'étape de purge terminée, la cellule est ramenée au plateau et l'échantillon suivant est amené au four pour recommencer le processus d'extraction. La figure 38 ci-dessous montre le schéma du processus d'extraction ASE.

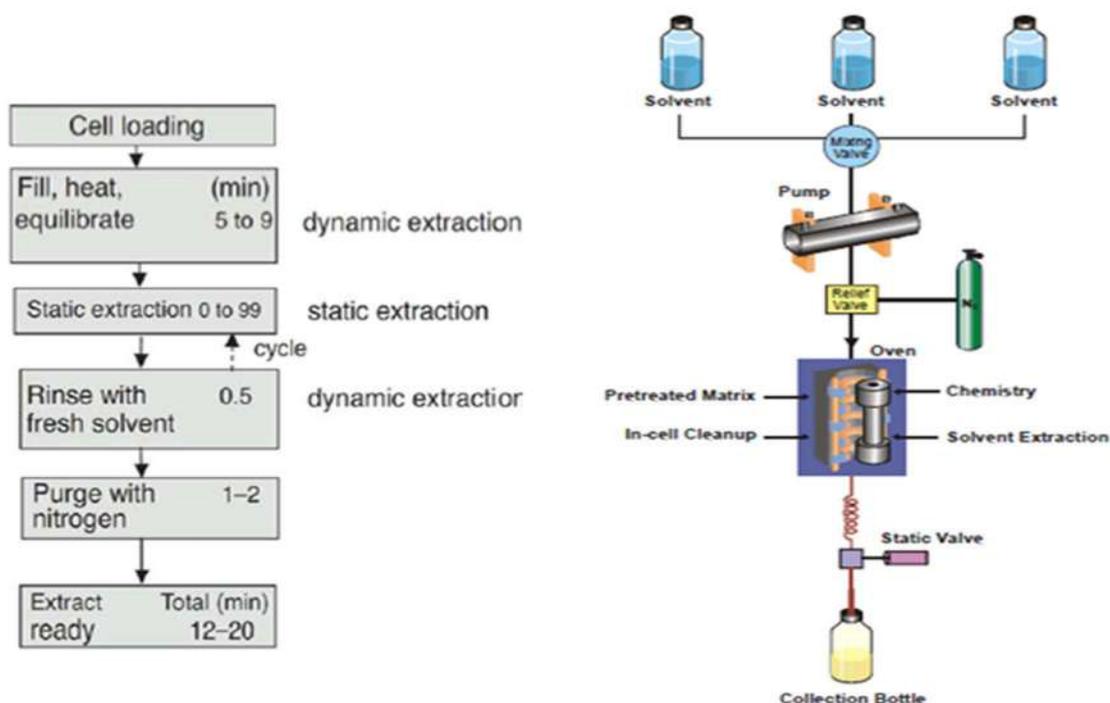


Figure 38: Schéma du processus d'extraction ASE

Une fois l'extraction finie, les récipients de collectes sont récupérés et leurs contenus transvasés dans des ballons de Buchi de 250 mL préalablement pesés (m_b). Le solvant est éliminé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif, excepté les extraits aqueux qui ont été lyophilisés. Les extraits sont ensuite séchés au dessiccateur sous vide en présence de P_2O_5 et pesés régulièrement jusqu'à masse constante (m_{b+e}). La teneur en extractible est déterminée à l'aide de l'équation (3) citée précédemment (paragraphe II.2.1). Les extractibles sont ensuite récupérés et conservés dans des piluliers fermés à l'obscurité pour les analyses futures.

II.2.3. Analyses chimiques

II.2.3.1. Analyse FTIR

Environ 2 mg d'extraits à l'état solide sont utilisés pour l'analyse par spectroscopie infrarouge à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge Nicolet 6700 Thermo-Scientific (Figure 39a) avec un accessoire de réflectance totale atténué Smart Orbit. Pour l'analyse, un applicateur de pression avec un bouton rotatif a été utilisé pour presser l'extrait à l'état solide et améliorer le contact avec le cristal de diamant ATR. Le rayonnement infrarouge du spectromètre avec un angle d'incidence fixe de 45 degrés au réfléchi à travers du cristal et pénètre dans l'échantillon *via* une onde évanescente. L'évaluation de la région IR moyen de 4000 à 400 cm^{-1} permet de caractériser l'échantillon. Les spectres IR sont traités à l'aide du logiciel OMNIC intégré à

l'ordinateur de pilotage (Figure 39b). Trois spectres sont collectés pour chaque échantillon afin de s'assurer de la reproductibilité.

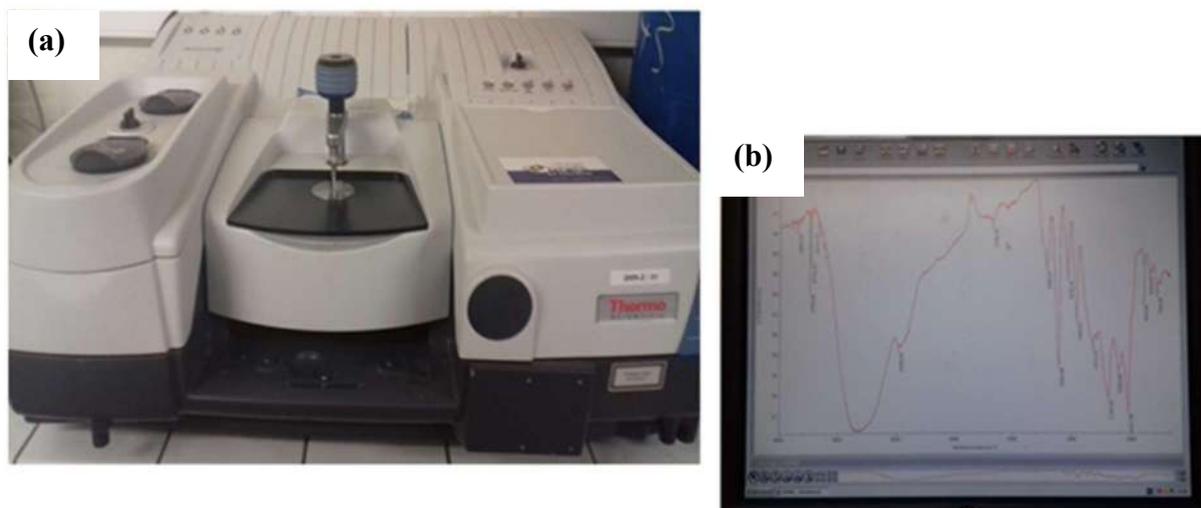


Figure 39: (a) Spectrophotomètre infrarouge Nicolet 6700 FT-IR Thermo-Scientific ; (b) Ordinateur de pilotage

II.2.3.2. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique des extraits a été effectué afin d'identifier les grandes familles chimiques présentes. Les réactifs utilisés pour effectuer le criblage phytochimique ont été préparés et utilisés selon les protocoles décrits précédemment (Houghton et Raman, 1998; Akinjogunla et al., 2010). Chaque test a été effectué en triplicat.

❖ *Test des alcaloïdes :*

Pour la détection des alcaloïdes, 20 mg d'extraits et 10 mL d'une solution diluée d'acide sulfurique à 10% ont été ajoutés dans un tube à essai. L'ensemble est agité pendant deux minutes et quelques gouttes de réactif de Mayer sont ajoutées. L'apparition d'un précipité jaunâtre est caractéristique de la présence d'alcaloïdes.

❖ *Test des flavonoïdes:*

Pour les flavonoïdes, 2 mg d'extraits ont été dissous dans 2 mL d'éthanol à 95% avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique et 0,5 g de ruban de magnésium dans un tube à essai. La couleur rose cerise prise par la solution indique la présence de flavonoïdes.

❖ *Test des polyphénols :*

Pour les polyphénols, 2 mL d'extraits (1 g/L) sont introduits avec une goutte de solution aqueuse de perchlorure de fer à 10% dans un tube à essai. L'apparition d'une couleur noirâtre intense, indique la présence de phénols dans les extraits.

❖ **Test des saponines :**

Pour les saponines, 25 mg d'extraits ont été mélangés à 15 mL d'eau distillée dans un tube à essai et le tout a été chauffé au bain-marie à 30 °C pendant 5 minutes. Après refroidissement, 10 mL de cette solution sont introduits dans un tube à essai et vigoureusement agité pendant 10 secondes au vortex. La présence d'une mousse persistante de 1 cm d'épaisseur après agitation indique la présence de saponines.

❖ **Test des stérols et terpènes :**

Pour la détection des stérols et des terpènes, 20 mg d'extraits, 3 mL de chloroforme, 10 gouttes d'anhydride acétique et 2 gouttes d'acide sulfurique concentré ont été introduits dans un tube à essai. L'apparition d'un anneau pourpre violet, virant au bleu puis au vert indique la présence de stérols et de terpènes.

II.2.3.3. Dosage des composés phénoliques

❖ **Dosage des phénols totaux**

Le dosage des phénols totaux a été réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par [Scalbert et al, 1989](#) avec une légère modification. D'abord une courbe d'étalonnage d'acide gallique à six points 0, 10, 30, 50, 80 et 100 ppm a été réalisée. Les différents extraits ont été dissouts dans le méthanol. Pour réaliser le dosage, on a introduit de manière successive dans un tube à essais 0,5 mL de solution d'extrait à 100 ppm dissous dans le méthanol et 2,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau distillée). Puis 30 secondes après l'ajout du réactif de Folin-Ciocalteu, on ajoute 2 mL de carbonate de sodium 0,7 M. Un blanc est réalisé sans polyphénol. Les mélanges réactionnels (extraits et acide gallique) correspondant à chaque point de la gamme et aux extraits, sont agités et incubés pendant 5 min à 50°C dans un bain d'eau thermostaté. Après ces 5 min, tous les échantillons sont transférés dans un bain d'eau froide pour stopper la réaction. Les mélanges réactionnels sont centrifugés à 4,4 rpm pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse 5702. L'absorbance est lue à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (UV-2550, de la marque SHIMADZU). Chaque test est effectué en triplicat et la teneur en phénols totaux est déterminée par le biais de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique en calculant la concentration moyenne des polyphénols présents dans les extraits en mg équivalents d'acide

gallique/g d'extrait sec. La courbe d'étalonnage réalisée à partir de l'acide gallique est donnée par la figure 40 ci-dessous :

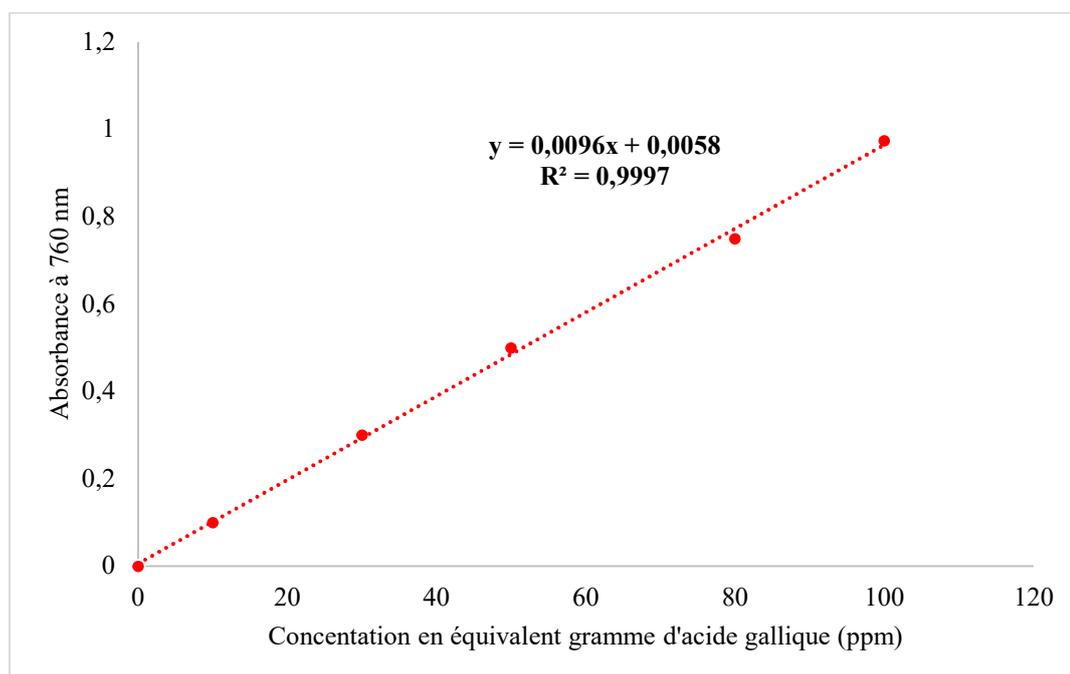


Figure 40: Courbe d'étalonnage : absorbance à 760 nm avec comme standard l'acide gallique.

❖ *Dosage des tannins condensés ou proanthocyanidines*

Le dosage des tannins condensés ou proanthocyanidines a été réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique vanilline-HCl décrite par [Broadhust et Jones, 1978](#) avec une légère modification. La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide de catéchine à six concentrations 0, 10, 30, 50, 80 et 100 ppm. Les différents extraits ont ensuite été dissouts dans du méthanol. Pour réaliser le dosage, on mélange dans un tube à essais 0,5 mL de solution d'extrait à 100 ppm dissout dans le méthanol avec 3 mL de réactif contenant la vanilline dissoute dans du méthanol (4%, poids/volume). 1,5 mL de HCL concentré (37%) sont alors ajoutés, puis le mélange a été maintenu dans le noir à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance de tous les mélanges réactionnels correspondant à chaque point de la gamme et aux extraits est lue à 500 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Visible (UV-2550, de la marque SHIMADZU). Le test est effectué en triplicat et la teneur en tannin condensé est déterminée par le biais de la courbe d'étalonnage de la catéchine en calculant la concentration moyenne de tannins condensés présents dans chaque extrait en mg équivalents catéchine/g d'extraits secs. La courbe d'étalonnage réalisée à partir de la catéchine est présentée ci-dessous (Figure 41).

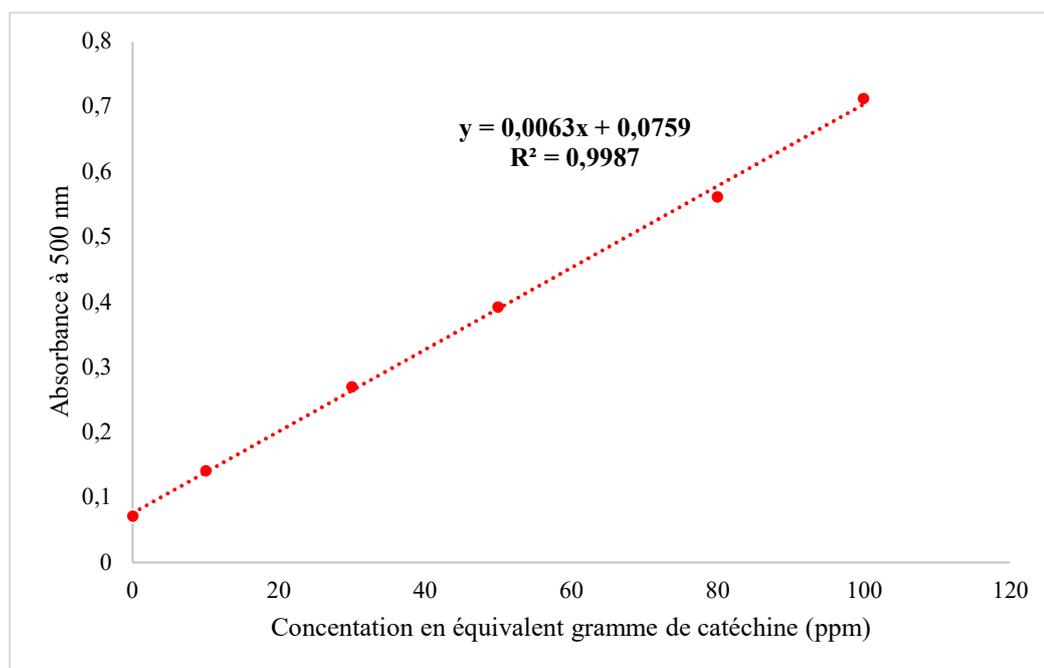


Figure 41: Courbe d'étalonnage : absorbance à 500 nm avec comme standard la catéchine

❖ **Dosage des flavonoïdes :**

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par [Fagbohoun, 2014](#) avec une légère modification. La courbe d'étalonnage est réalisée avec de la catéchine à six concentrations 0, 10, 30, 50, 80 et 100 ppm. Pour réaliser le dosage, on introduit de manière successive dans un tube à essais 0,5 mL de la solution d'extrait à 100 ppm dissous dans le méthanol, 2 mL d'eau distillée et 1 mL de chlorure d'aluminium à 10%, puis on attend 6 minutes. On ajoute alors 1 mL d'acétate de potassium 1M. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 30 minutes, puis l'absorbance de tous les mélanges réactionnels correspondant à chaque point de la gamme d'étalonnage et les différents extraits est lue à 415 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Visible (UV-2550, de la marque SHIMADZU). Le test est effectué en triplicat et la teneur en flavonoïdes est déterminée en calculant la concentration moyenne des flavonoïdes présents dans les extraits en mg équivalents catéchine/g d'extraits sec. La courbe d'étalonnage réalisée à partir de la catéchine est donnée ci-dessous (Figure 42).

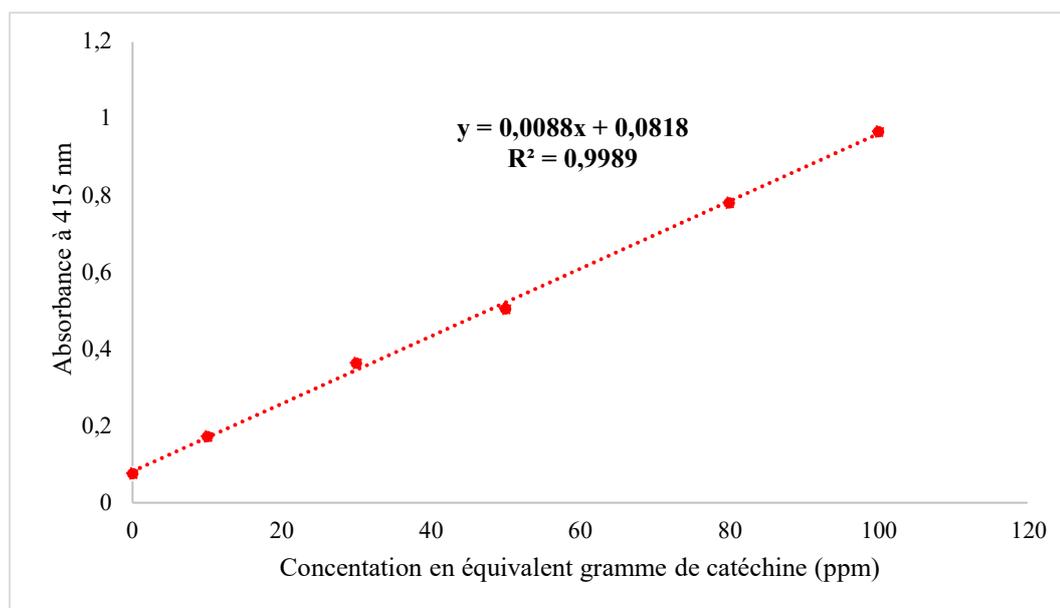


Figure 42: Courbe d'étalonnage : absorbance à 415 nm avec comme standard la catéchine

II.2.4. Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

L'analyse GC/MS a été effectuée avec une colonne DB-5MS (phase stationnaire (95% diméthyl / 5% diphenyl-polysiloxane; longueur: 30 m; diamètre interne: 0,25 mm; épaisseur du film: 0,25 μm) avec un chromatographe en phase gazeuse Perkin Elmer Clarus 680 couplé à un spectromètre de masse Perkin Elmer Clarus SQ8, l'ensemble étant piloté par le logiciel Turbo Mass v 6.1 et disposant d'une base de données NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) (édition 2011). Avant l'injection, les échantillons ont été dérivatisés pour faciliter la détection de tous les composés présents. Dans ce but, 1 à 2 mg d'extraits secs sont solubilisés dans 50 μL de BSTFA + TMCS à 1% dans un pilulier de 2 mL. Le mélange est maintenu pendant 120 minutes, pilulier fermé, à 70 $^{\circ}\text{C}$, pour permettre à la réaction de silylation d'avoir lieu. Le BSTFA est ensuite évaporé puis les extraits dérivés sont dissouts dans 1 mL d'acétate d'éthyle. 1 μL de cette solution est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse à une température d'entrée de 250 $^{\circ}\text{C}$ en mode splitless. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur. Le programme de température est le suivant: 80 $^{\circ}\text{C}$ pendant 2 minutes, puis chauffage à une vitesse 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ jusqu'à 190 $^{\circ}\text{C}$, suivi d'un chauffage à une vitesse de 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ jusqu'à 280 $^{\circ}\text{C}$ et maintien à cette température pendant 10 minutes, avant un nouveau chauffage à une vitesse de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ jusqu'à 300 $^{\circ}\text{C}$ et maintien à cette température pendant 14 minutes. Le programme de chauffage a pu être selon les cas légèrement modifié pour améliorer la résolution de certains échantillons, ce qui a parfois entraîné des temps de

rétenctions différents pour certains composés. Un flux d'hélium de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a été utilisé comme phase mobile. Après l'étape de séparation, les composés sont transférés vers le spectromètre de masse par une ligne de transfert chauffée à $250 \text{ }^\circ\text{C}$ et l'ionisation est réalisée selon la méthode de l'impact électronique (énergie d'ionisation 70 eV). Les composés sont identifiés sur la base de la comparaison de leur spectre de masse avec la bibliothèque NIST via NIST MS Search 2.0 (2011). L'identification a été jugée pertinente pour l'appariement et l'appariement inverse lorsque les valeurs des coefficients étaient supérieures à 900. La figure 43 présente l'appareil GC/MS ayant servi pour la caractérisation des différents extraits et le carrousel à pilulier.



Figure 43: Appareil GC/MS.

II.2.5. Essais de durabilité naturelle

La durabilité naturelle du bois de cœur de *C.edulis* a été évaluée vis-à-vis des champignons basidiomycètes et vis-à-vis des termites et pour cela les échantillons de bois de cœur de notre essence ont été préalablement préparés.

II.2.5.1. Préparation des éprouvettes de bois

A partir des baguettes préalablement fabriquées lors du dimensionnement de nos échantillons, des éprouvettes du bois de cœur $30 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$ ont été dimensionnées respectivement dans les directions longitudinale, radiale et tangentielle pour des essais en laboratoire. Elles ont été poncées, numérotées puis séchées à l'étuve à 103°C pendant 24h avant d'être pesées (m_0). Après les avoir pesées, une partie de ces éprouvettes a été extraite au Soxhlet durant trois semaines en utilisant le mélange acétone-eau (1/1, v/v) pour évaluer l'influence des extractibles sur la durabilité naturelle de notre essence. Le solvant d'extraction était rajouté lorsque le besoin

se faisait ressentir. Un temps particulièrement long est nécessaire pour permettre une extraction efficace du bois massif comparativement aux extractions menées sur des sciures.

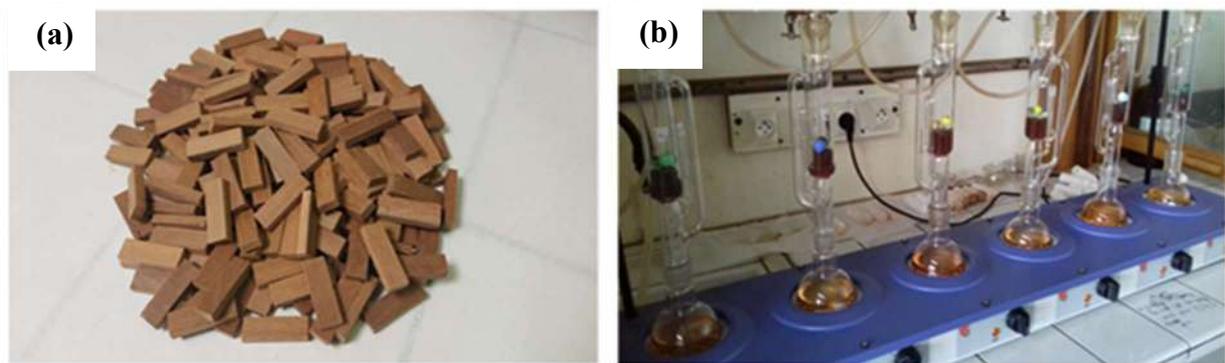


Figure 44: (a) Eprouvettes poncées $30 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$; (b) Extraction des éprouvettes au Soxhlet

II.2.5.2. Confrontation des éprouvettes aux champignons basidiomycètes

Les champignons ont été cultivés sur un milieu gélosé préparé en additionnant 40 g d'extrait malt et 30 g d'agar dans un litre d'eau. La solution gélosée a ensuite été stérilisée à l'autoclave à 120°C durant 25 minutes. Après refroidissement (à environ 40°C), le milieu gélosé est réparti dans les boîtes de Pétri de 8,5 cm de diamètre à raison de 20 mL du milieu gélosé par boîte sous une hotte à flux laminaire et à proximité d'une flamme. Les milieux sont laissés au repos sous la hotte jusqu'à solidification. Après solidification, les milieux de culture sont inoculés avec d'un disque de mycélium fongique prélevé d'une culture de champignon fraîchement repiquée. Puis chaque boîte est scellée avec du parafilm. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 22°C et 70% d'humidité relative dans une enceinte climatique de marque Binder KBF 115 pendant 15 jours pour permettre la croissance du mycélium sur les milieux.

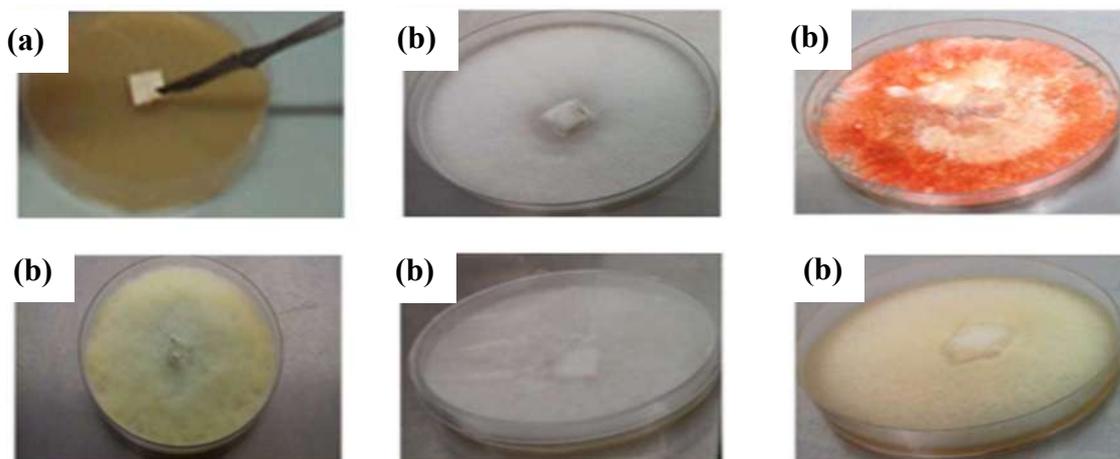


Figure 45: (a) Inoculation du champignon ; (b) colonisation de la boîte par le mycélium

Après la croissance du mycélium, trois blocs séchés et stérilisés de bois de cœur extrait (m_1) et non extrait (m_0) de *C. edulis* sont placés sur de petites grilles en plastique stérilisées dans chaque boîte de Pétri, (la stérilisation étant effectuée en autoclave). Chaque expérience est répétée quatre fois. Le bois de hêtre (*fagus sylvatica*) a été utilisé comme témoin de virulence pour les champignons de la pourriture blanche et, l'aubier de pin (*Pinus sylvestris linnaeus*) pour les champignons de la pourriture brune. Des échantillons extraits et non extraits de bois de cœur de *C. edulis* ont également été placés sur un milieu de culture stérile sans inoculation fongique pour évaluer les pertes de masse dues à la diffusion des extractibles. Les boîtes de Pétri scellées avec du parafilm sont incubées à 22°C et 70% d'humidité relative pendant 16 semaines.



Figure 46: Confrontation des éprouvettes de bois aux différents champignons

À la fin de l'essai, les blocs de bois sont raclés avec une spatule pour éliminer le mycélium et pesés pour obtenir la masse humide (m_2) pour le calcul de l'humidité du bois à la fin de l'essai fongique. Les blocs sont ensuite séchés à l'étuve pendant 24 heures à 103 °C jusqu'à une masse constante (m_3). La perte de masse (PM) causée par une attaque fongique et la teneur en humidité (H) sont déterminées selon les équations (7) et (8) ci-dessous :

$$PM (\%) = \frac{((m_0 \text{ ou } m_1) - m_3)}{m_0 \text{ ou } m_1} \times 100 \quad (7)$$

$$H (\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_3} \times 100 \quad (8)$$

Où m_0 est la masse initiale des éprouvettes séchées non extraites, m_1 la masse des éprouvettes extraites séchées avant exposition fongique, m_2 la masse des éprouvettes humides après exposition fongique et m_3 la masse des éprouvettes séchées après exposition fongique.

II.2.5.3. Confrontation des éprouvettes aux termites *Reticulitermes flavipes*

Les tests de durabilité vis-à-vis des termites ont été réalisés sur des éprouvettes extraites et non extraites de *C.edulis*. Ces essais screening ont été réalisés au CIRAD à Montpellier dans le cadre d'une mission scientifique aidée par le GDR 3544 Sciences du Bois. Toutes les éprouvettes à tester ont été préalablement séchées à 103°C. Les masses anhydres des différentes éprouvettes ont été relevées, (m_1) pour celles extraites et (m_0) pour celles non extraites. Puis, elles ont été conditionnées à l'abri de la lumière dans une enceinte climatique bien aérée et réglée à une température de 20°C ± 2°C et à une humidité relative de 65% ± 5% avant d'être exposées aux termites (*Reticulitermes flavipes*, provenant de Soulac-sur-Mer). La procédure de ces essais a été adaptée de la norme EN 117 (2013). Chaque échantillon est placé dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre, avec ergots de ventilation, contenant 40 g de sable de Fontainebleau humidifié (4 volumes de sable/1 volume d'eau distillée). Chaque éprouvette de bois est placée sur une grille en plastique afin d'éviter la saturation en eau des échantillons. Un total de 50 termites ouvriers, une nymphe et un soldat sont introduits dans chaque boîte de Pétri. Un fragment de bois (issus de l'élevage de départ) de masse inférieure à 0,5 g est également introduit dans chaque dispositif. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à l'abri de la lumière, dans une chambre climatique réglée à 27 ± 1 °C, avec une humidité relative supérieure à 75%, pendant quatre semaines durant lesquelles l'activité des termites est suivie de façon hebdomadaire. Six répliquats de chaque modalité ont été réalisés. A la fin de l'essai, les échantillons de bois sont retirés de la boîte et nettoyés. Une cotation visuelle des dégâts est réalisée (selon les critères définis dans la norme EN 117).

- cotation 0 ; aucune attaque
- cotation 1 ; tentative d'attaque
- cotation 2 ; attaque légère
- cotation 3 ; attaque moyenne
- cotation 4 ; attaque forte à destruction totale

Puis le nombre de termites encore en vie est déterminé et leur taux de survie calculé selon l'équation (9):

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\text{Nombre de termites ouvriers en vie après le test}}{\text{Nombre de termites ouvriers utilisés pour le test}} \times 100 \quad (9)$$

Enfin les échantillons ont été séchés à 103°C, pesés (m_2) et les pertes de masse dues aux attaques des termites (PM_{ter}) sont calculées selon l'équation (10) ci-dessous :

$$PM_{\text{ter}} (\%) = \frac{((m_0 \text{ ou } m_1) - m_2)}{m_0 \text{ ou } m_1} \times 100 \quad (10)$$

II.2.6. Essais de durabilité conféré par extrait de *C.edulis*

Afin de mieux apprécier la contribution des extractibles du bois de *C.edulis* sur sa durabilité naturelle, des essais de durabilité vis-à-vis des champignons et des termites ont également été réalisés sur des éprouvettes d'aubier de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et de hêtre (*fagus sylvatica*) imprégnés d'extraits de *C.edulis* obtenus avec un mélange acétone/eau (1/1, v/v) à des concentrations de 5 et 10%. Le choix du mélange eau/acétone pour effectuer l'extraction est réalisé de manière à extraire aussi bien les extraits lipophiles que les extraits hydrophiles.

II.2.6.1. Imprégnation des éprouvettes

Les éprouvettes d'aubier de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et de hêtre (*fagus sylvatica*) de dimensions 25×15×5 mm³ (L,R,T) sont mises à sécher pendant 24 heures à 103°C à l'étuve, puis maintenues à l'état anhydre jusqu'à leur imprégnation. La masse anhydre avant imprégnation (m_0) a été relevée.

Les éprouvettes ont été imprégnées avec les solutions éthanoliques suivantes :

- Solution d'extrait 5% (100mL) : 5 g d'extrait de *C.edulis* dans 100 mL d'éthanol.
- Solution d'extrait 10% (100mL) : 10 g d'extrait de *C.edulis* dans 100mL d'éthanol.

II.2.6.2. Imprégnation des éprouvettes

Les éprouvettes ont été imprégnées à l'aide du système d'imprégnation décrit ci-dessous :

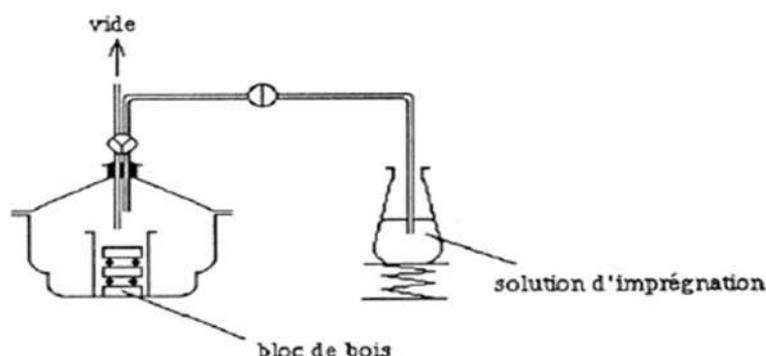


Figure 47: Schéma du procédé d'imprégnation

Durant l'imprégnation, les éprouvettes ont été soumises aux cycles suivants :

- 15 minutes de vide à 5 mbar ;
- Introduction de la solution d'imprégnation par aspiration à l'aide d'un robinet deux voies jusqu'à recouvrement complet des éprouvettes ;
- 30 minutes à pression atmosphérique avant d'être égouttées, puis séchées pendant 24 heures à l'étuve à 103°C avant d'être pesées (m_1) .

II.2.6.3. Confrontation des éprouvettes vis-à-vis des champignons basidiomycètes et des termites *Reticulitermes flavipes*

Les essais de confrontation des éprouvettes imprégnées d'aubier de pin et hêtre aux champignons et aux termites est réalisé de manière similaire aux essais décrits dans la section II.2.4 Essais de durabilité naturelle. Mais ici, pour les différents témoins de virulence, nous avons utilisé des éprouvettes d'aubier de pin et hêtre imprégnées d'éthanol uniquement. La figure 48 présente la confrontation des éprouvettes aux termites (Figure 48a) et aux différents champignons (Figure 48b).

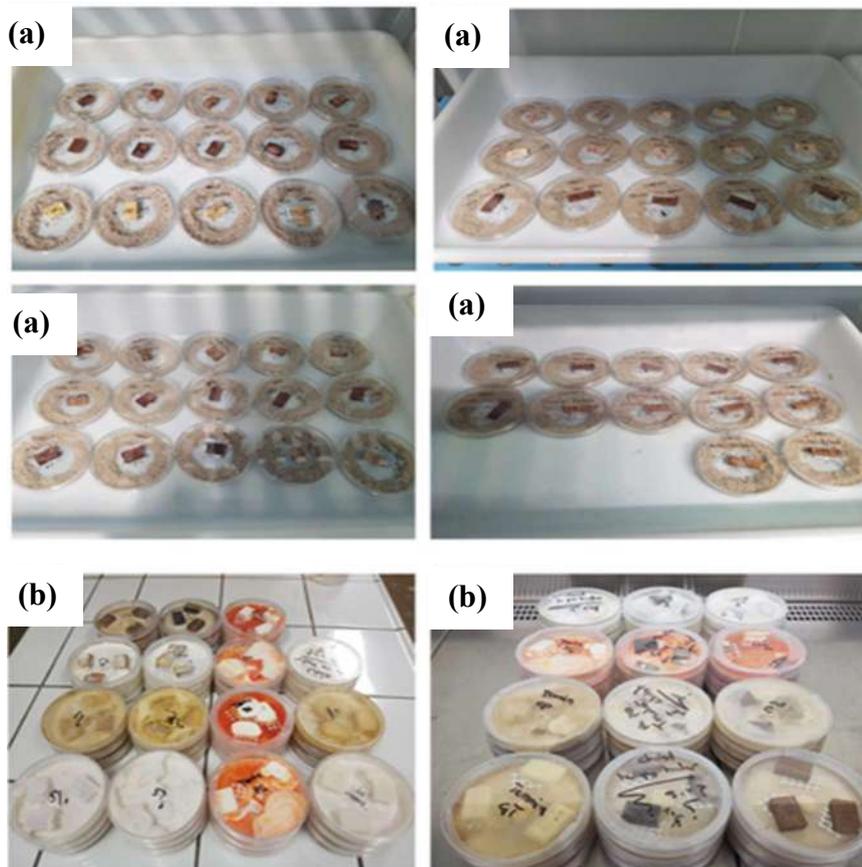


Figure 48: Confrontation des éprouvettes (a) aux termites ; (b) aux différents champignons

En plus des tests décrits plus haut et pour mieux comprendre la durabilité naturelle de notre essence d'une part et dans l'optique de leurs valorisations d'autre part, les activités antifongique, anti-termite et antioxydante des extractibles ont été étudiées.

II.2.7. Activité antifongique : effet des extractibles sur la croissance des champignons

II.2.7.1. Préparation des milieux gélosés

Pour l'évaluation de l'effet des extractibles sur la croissance des champignons, les tests antifongiques ont été effectués selon la méthode de [Chang et al, 1999](#) avec une légère modification. Les différents extractibles ont été dissouts dans un volume minimal d'éthanol (1 mL maximum). Les milieux gélosés ont été préparés dans des erlenmeyers de 100 mL en additionnant 4 g d'extrait de malt et 2 g d'agar, puis avec de l'eau distillée on ajuste jusqu'au trait à 100 mL. Ensuite les solutions gélosées sont stérilisées dans un autoclave à 120°C pendant 25 minutes. Il faut prendre la précaution de boucher les récipients contenant les milieux gélosés avec du coton cardé et d'envelopper le bouchon avec du papier aluminium. La figure 49 ci-dessous présente les milieux gélosés avant et après stérilisation à l'autoclave.

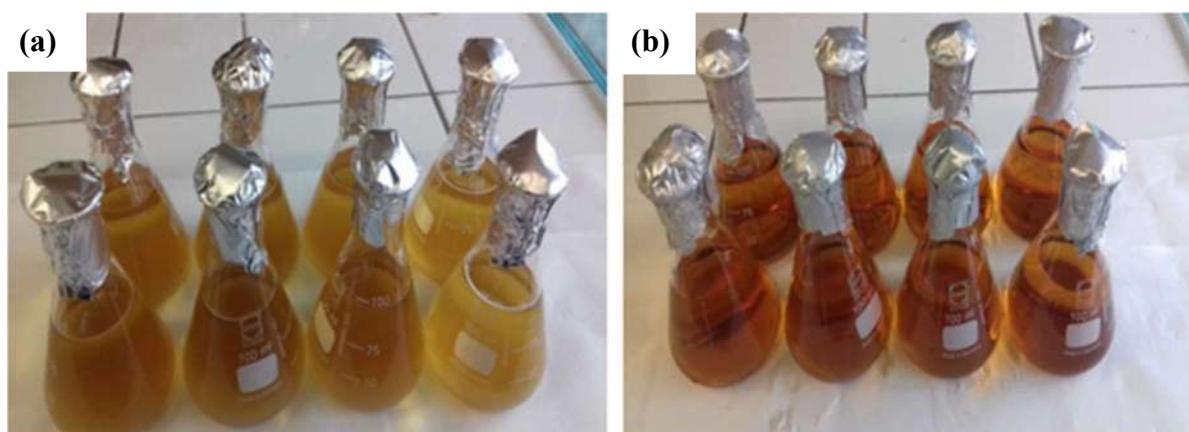


Figure 49: Milieux gélosés : (a) avant stérilisation ; (b) après stérilisation à l'autoclave

II.2.7.2. Préparation des différentes concentrations d'extractibles et mélanges aux milieux gélosés

50 mg et 100 mg des différents extraits solubilisés dans un minimum d'éthanol (1 mL maximum) sont ajoutés aux milieux gélosés stérilisés (100 mL) afin que la concentration résultant des mélanges soit respectivement de 500 ppm et 1000 ppm. Nous avons travaillé en ppm équivalentes à des g/L du fait de la composition indéterminée des extraits. Les mélanges ont été réalisés à proximité d'une flamme sous une hotte à flux laminaire, puis homogénéisés et laissé au repos. Après refroidissement (à environ 40°C), chaque erlenmeyer contenant les

milieux gélosés à différentes concentrations d'extraits sont transvasés dans des boîtes de Pétri à raison de 20 mL de milieux gélosés stérilisés par boîte sous une hotte à flux laminaire et à proximité d'une flamme. Les milieux sont laissés au repos sous la hotte jusqu'à leur solidification.

II.2.7.3. Inoculation de la souche fongique

Après solidification, les milieux ont alors été inoculés avec un disque de mycélium fraîchement cultivé des différentes souches fongiques. Pour chaque champignon et chaque concentration, nous avons préparé trois boîtes de Pétri avec extraits et trois boîtes de Pétri avec éthanol sans extrait comme témoin. Les boîtes ont été incubées à 22°C et à 70% d'humidité relative dans une enceinte climatique de marque Binder KBF 115. Tous les jours, la croissance des champignons a été mesurée, jusqu'à ce que les boîtes témoins soient totalement envahies (1 à 12 jours selon les cas). L'essai est alors arrêté et l'évaluation de la croissance des champignons représentée sous forme de courbes de croissance en fonction du temps d'incubation afin de faciliter les interprétations.

II.2.8. Activité anti-termite des extractibles

Pour l'étude de l'activité anti-termite des extractibles, des essais screening rapides ont été réalisés au CIRAD. Les mêmes concentrations d'extraits 500 ppm et 1000 ppm ont été testées. 70 µL de solutions d'extraits à différentes concentrations ont été imprégnées sur des papiers filtres Whatman préalablement pesés (m_0) avant d'être exposées aux termites (*Réticulitermes flavipes*). Les papiers imprégnés des différentes solutions à tester ont été séchés à l'air libre 20°C - 65% d'humidité relative pendant 2 heures puis pesés de nouveau (m_1). Les essais ont été réalisés dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, dans lesquelles 40 g de sable de Fontainebleau humide (1 volume d'eau pour 4 volumes de sable) ont été placés à la périphérie. Les papiers Whatman imprégnés ont été placés sur une grille en plastique (pour éviter une saturation en humidité) au milieu de la boîte de Pétri et 20 termites ouvriers ont été ajoutés à chaque dispositif de test. Les boîtes de Pétri ont été ensuite conservées à l'obscurité à 27°C, et 75% d'humidité relative. Comme témoin, nous avons testé dans les mêmes conditions les papiers témoins, papiers imbibés d'éthanol et boîtes sans papier filtre (diète). Ces dispositifs ont fait l'objet d'un suivi régulier tout au long de l'essai. L'essai est arrêté lorsque tous les termites ouvriers dans les boîtes témoins sont morts (environ 21 jours). A la fin des essais, les termites survivants sont comptés et leur taux de survie déterminé comme indiqué dans

l'équation (9). Les échantillons ont été nettoyés et séchés à l'air libre puis pesés (m_2) pour déterminer les pertes de masses (PM_{ter}) dues aux attaques des termites selon l'équation (11):

$$PM_{ter} (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (11)$$

Où m_0 était la masse initiale stabilisée des papiers Whatman avant l'imprégnation, m_1 la masse des papiers Whatman après imprégnation et séchage à l'air libre avant l'exposition aux termites, m_2 la masse des papiers Whatman après imprégnation et séchage à l'air après exposition aux termites. La figure 50 ci-dessous présente la confrontation des papiers Whatman imprégnés de solution d'extraits aux termites.



Figure 50: Essais termites sur papier Whatman.

II.2.9. Activité antioxydante des extractibles

Pour l'étude de l'activité antioxydante des différentes fractions d'extraits, nous avons utilisé deux méthodes différentes. Celle utilisant le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ou DPPH et celle avec le radical cationique 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS⁺.

II.2.9.1. Méthode avec le radical libre DPPH

L'activité antioxydante a été estimée en utilisant le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl inspiré de la méthode décrite par [Brand-Williams et al, en 1995](#). Le DPPH a été préparé en mélangeant 39,4mg de DPPH solide dans 100 mL de méthanol pur. Puis 20 mL de cette solution sont prélevés et dilués dans une fiole de 100 mL. Des extraits à différentes concentrations sont dissouts dans du méthanol. On introduit 1 mL de DPPH ($10^{-4}M$) et 1 mL d'extraits dissous dans du méthanol dans la cuve d'analyse du spectrophotomètre. L'ensemble est stocké dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Après cette période, l'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (UV-2550 de la marque

SHIMADZU). Le test est effectué en triplicat et l'activité antioxydante des extractibles (AA) est calculée en pourcentage par rapport au témoin (DPPH seul dans du méthanol sans extrait) selon l'équation (12) suivante:

$$AA (\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (12)$$

Ou A_0 est l'absorbance du témoin et A l'absorbance de la solution de DPPH en présence des extraits. La concentration efficace pour consommer 50% de DPPH (CE_{50}) est déterminée à partir de l'équation de la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons. Les faibles concentrations CE_{50} correspondent aux activités antioxydantes élevées.

II.2.9.2. Méthode avec le radical cationique libre ABTS⁺

L'activité antioxydante a été estimée en utilisant le radical cationique 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) inspiré du protocole de [Simona P et al, 2008](#) avec une légère modification. L'ABTS⁺ (7mM) a été préparé en mélangeant 384mg d'ABTS solide dans 100 mL de persulfate de potassium (2,45mM). La solution a ensuite été diluée dans une solution de tampon phosphate de sodium (5mM) de pH=7 afin d'avoir une absorbance à 1,4 à 734 nm. Des extraits à différentes concentration sont dissouts dans du méthanol. Dans des tubes à essais, on introduit 1mL d'ABTS⁺ et 1mL d'extraits dissouts dans du méthanol. L'ensemble est stocké à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Après ce délais, l'absorbance est mesurée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (UV-2550 de la marque SHIMADZU). Le test est effectué en triplicat et l'activité antioxydante (AA) en pourcentage pour chaque concentration est calculée par rapport au témoin (ABTS⁺ seul dans du méthanol sans extrait). Le test est effectué en triplicat et l'activité antioxydante des extractibles (AA) en pourcentage est calculé par rapport au témoin selon l'équation (13).

$$AA (\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (13)$$

Ou A_0 est l'absorbance du témoin et A l'absorbance de la solution de ABTS⁺ en présence des extractibles. La concentration efficace pour consommer 50% d'ABTS⁺ (CE_{50}) est déterminée à partir de l'équation de la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons. Les faibles concentrations CE_{50} correspondent aux activités antioxydantes élevées.

**CHAPITRE III
VARIABILITE INTRA-ARBRE DE LA
COMPOSITION CHIMIQUE,
QUANTIFICATION ET
CARACTERISATION DES SUBSTANCES
EXTRACTIBLES**

CHAPITRE III VARIABILITE INTRA-ARBRE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE, QUANTIFICATION ET CARACTERISATION DES SUBSTANCES EXTRACTIBLES

Dans ce chapitre, sont présentés les résultats obtenus sur la variabilité intra-arbre de la composition chimique, aussi bien au niveau de la quantification des polymères principaux que de la quantification et la caractérisation des extractibles de notre essence. Le dosage des phénols totaux, tannins condensés, flavonoïdes a également été réalisé ainsi que l'analyse GC/MS permettant l'identification des composés majoritaires présents dans les extractibles.

III.1. Variabilité intra-arbre de la composition chimique

Comme indiqué dans le chapitre II, les échantillons ont été prélevés dans le sens radial sur les différents rondins indiqué dans la figure 35, puis les différentes parties séparées en Aubier (AU), Zone de transition (ZT), Duramen et Moelle (M). Le Duramen a été séparé en Duramen externe (DE), Duramen médian (DM) et Duramen interne (DI). Après la séparation, les teneurs en extractible, lignine, cellulose et holocellulose ont été déterminées. Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 51 ci-dessous :

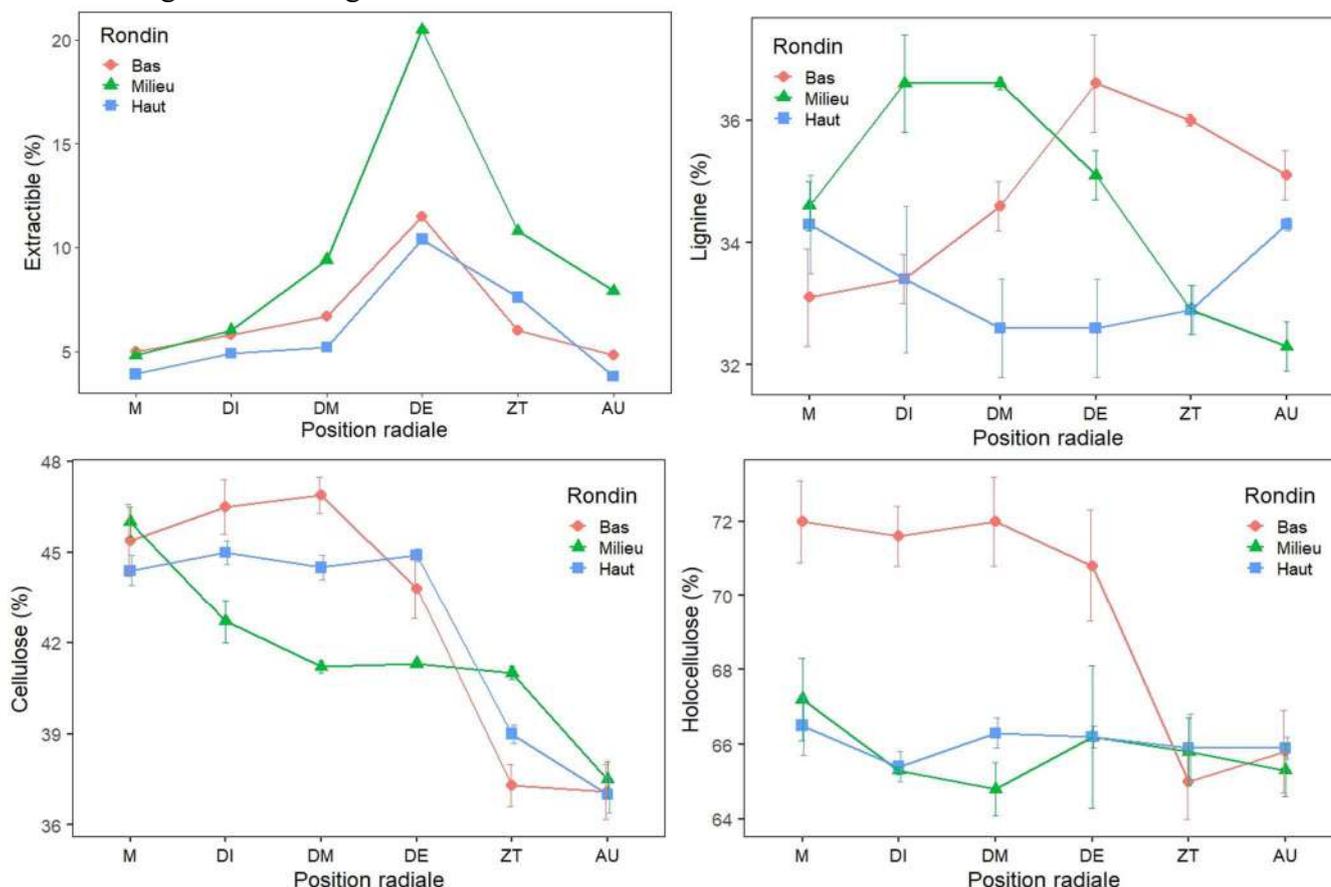


Figure 51: Variabilité intra-arbre de la composition chimique (moyenne trois essais \pm écart-type) des différents compartiments en bois sur la section transversale à partir des rondins : M, DI, DM, DE, TZ, AU

Il ressort de la figure 51 que les teneurs en matières extractibles augmentent de la moelle (5% rondin de la base ; 4,8% celui du milieu ; 3,9 % celui du haut) vers le duramen externe (11,5% rondin de la base ; 20,5% celui du milieu ; et 10,4% celui du haut), où la teneur maximale en extractible est toujours trouvée, puis diminue vers l'aubier (4,8% rondin de la base ; 7,9 % celui du milieu et 3,8% celui du haut). Cette tendance est la conséquence de la distribution radiale des extractibles qui présentent une concentration maximale dans la zone duramen externe-zone de transition. Cette variation radiale est associée aux activités métaboliques observées dans la zone de transition entre l'aubier et le duramen externe liée à la formation du duramen, à l'hydrolyse enzymatique des triglycérides et à une augmentation des acides gras au cours du processus de duraminisation (Hillis WE, 1972). Ce type de variation radiale des substances extractives a déjà été signalé chez d'autres espèces, par exemple *Fagus sylvatica* et *Prunus serotina* (Hillis WE, 1987). Cette variation radiale des matières extractibles explique d'une part la variabilité de durabilité naturelle que l'on observe sur le bois de certaines essences dans la littérature à l'attaque des agents pathogènes et d'autre part la couleur du bois de certaines essences qui est étroitement liée à la présence des extractibles. C'est par exemple le cas du bois du Teck où la couleur varie selon le plan radial, avec des couleurs plus foncées dans le duramen interne et des rougeurs dans le duramen externe. Ces résultats sont en accord avec ceux de Miranda et al, (2011), obtenus sur le Teck du Timor de l'Est qui ont montré que le taux d'extractibles augmente de la moelle (8,3%) à la zone de transition (12,7%) et diminue dans l'aubier (9,2%).

Concernant la teneur des différents constituants pariétaux, la teneur en lignine est élevée dans le rondin du milieu, de la moelle au duramen médian par rapport au rondin du bas et celui du haut. En revanche la teneur en cellulose est plus élevée dans les rondins du bas et celui du haut, de la moelle jusqu'au duramen externe par rapport au rondin du milieu. La teneur en holocellulose est plus élevée dans le rondin du bas, de la moelle au duramen externe par rapport aux autres rondins. La variation radiale des différents constituants pariétaux dans le bois est totalement différente de celle des substances extractibles. Ce résultat reflète très bien le profil général de variation radiale de la composition chimique dans le bois (Banstsen 1978; Zeeuw 1980), Une teneur décroissante en lignine de la moelle vers l'extérieur indique que le bois juvénile devrait avoir une plus grande teneur en lignine et une plus faible teneur en cellulose (Thomas, 1984). Globalement de très faibles variations radiales et axiales de la composition chimique ont été enregistrées, Aucune différence significative de la composition chimique n'a été observée entre les différents rondins. Les teneurs particulièrement élevées en lignine sont

cohérentes avec celles trouvées dans la plupart des bois tropicaux contrairement à celles rencontrées dans la littérature sur les bois tempérés qui sont généralement plus faibles. C'est le cas du Bilinga (31,2%) ; Doussie (32,2%) ; Okan (34,4%) dans les travaux de [Mounguengui et al \(2016\)](#), mais aussi du Teck du Timor oriental (32,2%) dans les travaux de [Miranda et al \(2011\)](#).

Pour la suite de l'étude, nous avons travaillé sur un seul niveau le **rondin du bas**, qui permettait un échantillonnage plus aisé des sciures d'écorce, d'aubier et de duramen et le dimensionnement des éprouvettes.

III.2. Quantification et caractérisation des substances extractibles

III.2.1. Teneur en extractibles

Pour la quantification des extractibles, les teneurs en extractibles ont été déterminées à partir des sciures finement broyées et tamisées ($\varnothing=0,160$ mm) et séchées des différentes parties de notre rondin (écorce, aubier, duramen). Dans ce cadre le duramen a été considéré dans sa globalité. Des extractions successives en utilisant des solvants de polarité croissante (dichlorométhane, acétone, toluène/éthanol (2/1 ; v/v) et eau) ont été réalisées au Soxhlet (24h par solvant) et au Dionex durant 15 minutes sous l'effet combiné de la température et la pression, 100°C et 100 bars. Dans la littérature en général, c'est le Soxhlet qui est utilisé, le Dionex ASE 350 a été utilisé afin de comparer les teneurs en extraits pour définir le meilleur type d'extraction. Les résultats de ces extractions sont présentés dans les tableaux 3 et 4 ci-dessous :

Tableau 3: Taux d'extraits (moyenne de trois essais \pm écart-type) obtenu au Soxhlet

Solvant	Taux d'extraction (%)		
	Ecorce	Aubier	Duramen
Dichlorométhane	4,1 \pm 1,0	0,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2
Acétone	7 \pm 0,7	9,2 \pm 0,8	8,5 \pm 0,2
Toluène/éthanol	3,6 \pm 0,3	2 \pm 0,1	2,9 \pm 0,4
Eau	6,3 \pm 0,1	3,2 \pm 1	3,6 \pm 0,2
Total	21 \pm 2,1	14,6 \pm 2,1	16,1 \pm 1,0

Tableau 4: Taux d'extraits (moyenne de trois essais \pm écart-type) obtenu au Dionex

Solvant	Taux d'extraction (%)		
	Ecorce	Aubier	Duramen
Dichlorométhane	4,1 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
Acétone	6,8 \pm 0,8	9,1 \pm 0,4	7,9 \pm 0,2
Toluène/éthanol	0,6 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
Eau	6,3 \pm 1,2	3 \pm 0,4	4,1 \pm 0,3
Total	17,8 \pm 2,2	12,5 \pm 1,0	14 \pm 0,7

Les résultats montrent que non seulement les taux d'extraits varient d'un solvant à l'autre, d'une partie du bois à une autre, mais aussi d'une méthode à l'autre. Les taux d'extraits sont généralement plus élevés pour l'écorce, suivie du duramen puis l'aubier. Ces résultats sont en accord avec la littérature. De manière générale, les données bibliographiques des bois tropicaux et celles des feuillus comme *Acacia*, *Populus* et *Salix* (Pietarinen et al, 2005 ; Pietarinen et al, 2006 ; Pohjamo et al, 2003), rapportent les taux d'extraits plus élevés au niveau de l'écorce que dans les autres parties de l'arbre. La valeur totale d'extraits au niveau de l'aubier se rapproche de celle du duramen. Ces résultats sont conformes à ceux de Miranda et al, (2011) qui ont rapporté en travaillant sur le teck du Timor de l'Est que cette essence montrait des taux d'extraits respectivement de 9,2% et 10,0% pour l'aubier et le duramen. Les taux d'extraits obtenus au dichlorométhane sont pratiquement semblables quel que soit le type d'extraction. En effet, le dichlorométhane est le premier solvant utilisé lors de l'extraction successive et le solvant le moins polaire. Pour l'extraction au Soxhlet, le taux d'extraits le plus élevé a aussi été obtenu avec l'aubier à l'acétone (9,1%) et la valeur la plus faible toujours avec l'aubier au dichlorométhane (0,2%). S'agissant du Dionex, le taux d'extraits le plus élevé a été obtenu avec l'aubier à l'acétone (9,1%) et la valeur la plus faible également avec l'aubier au dichlorométhane (0,2%). Lors de l'étude des bois tropicaux par le Centre Technique Forestier Tropical, on a trouvé pour le movingui des taux d'extractibles variant de 1,3% (extractibles à l'eau) à 13% (extractibles à l'alcool-benzène). Les solvants non polaires extraient majoritairement des substances apolaires (huiles, graisses, terpènes) alors que les solvants polaires solubilisent les composés polaires tels que les polyphénols. L'extraction successive qui combine solvants apolaires et polaires permet de partitionner les extractibles en différentes fractions facilitant les analyses ultérieures et la somme des extraits avec chaque solvant donne une idée de la teneur globale en extraits du bois. Le taux d'extrait global des différentes parties étudiées varie de 21,0% (écorce) à 14,6% (aubier) avec le Soxhlet et de 17,8% (écorce) à 12,5% (aubier) avec le Dionex. Les totaux en extractibles obtenus au Soxhlet sont plus élevés que ceux obtenus au Dionex, cette différence est clairement imputable aux faibles valeurs en extractibles obtenues au Dionex avec le mélange toluène/éthanol (0,6% écorce ; 0,2% aubier ; 0,7% duramen) par rapport à celles obtenues au Soxhlet avec le même solvant (3,6% écorce ; 3,2% aubier ; 3,6 duramen) qui pourrait s'expliquer par un temps d'extraction beaucoup plus long au Soxhlet entraînant ainsi une éthanolyse plus importante des molécules présentes dans la sciure de bois. De nombreuses études menées sur plusieurs essences tropicales ont montré des taux d'extraits très variables avec parfois des fortes teneurs de 20 à 22% pour certains bois (Huang

et al, 2009 ; Sirmah, 2009 ; Mburu et al, 2007 ; Neya et al, 2004 ; Cheumani, 2009). Après la quantification des extraits, nous avons effectué des analyses spectroscopique infrarouge à transformée de Fourier de toutes les fractions d'extraits pour la prédiction des composés potentiels contenus dans ses derniers.

III.2.2. Analyses infrarouges FTIR des extractibles

Ces analyses ont été réalisées avec un spectrophotomètre infrarouge Nicolet 6700 Thermo-Scientific avec un accessoire de réflectance totale atténué Smart Orbit. Les spectres infrarouges des différentes fractions d'extraits d'écorce, du bois de cœur et d'aubier sont respectivement présentés dans les figures 52 ; 53 et 54 ci-dessous :

❖ Analyses infrarouges FTIR des fractions d'extractibles de l'écorce de *C.edulis*

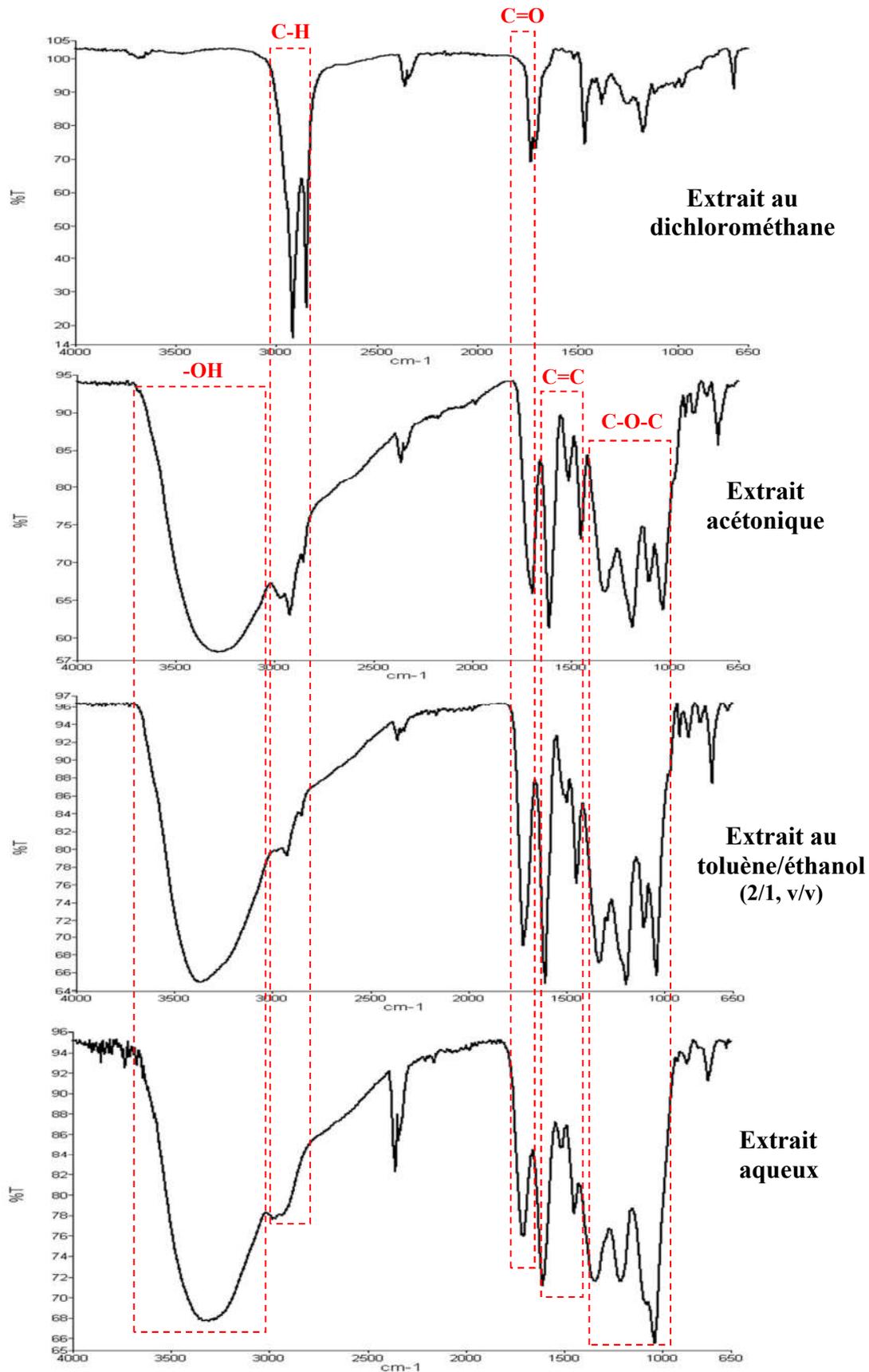


Figure 52: Analyses infrarouges des fractions d'extractibles de l'écorce de *C.edulis*

❖ Analyses infrarouges FTIR des fractions d'extractibles du duramen de *C.edulis*

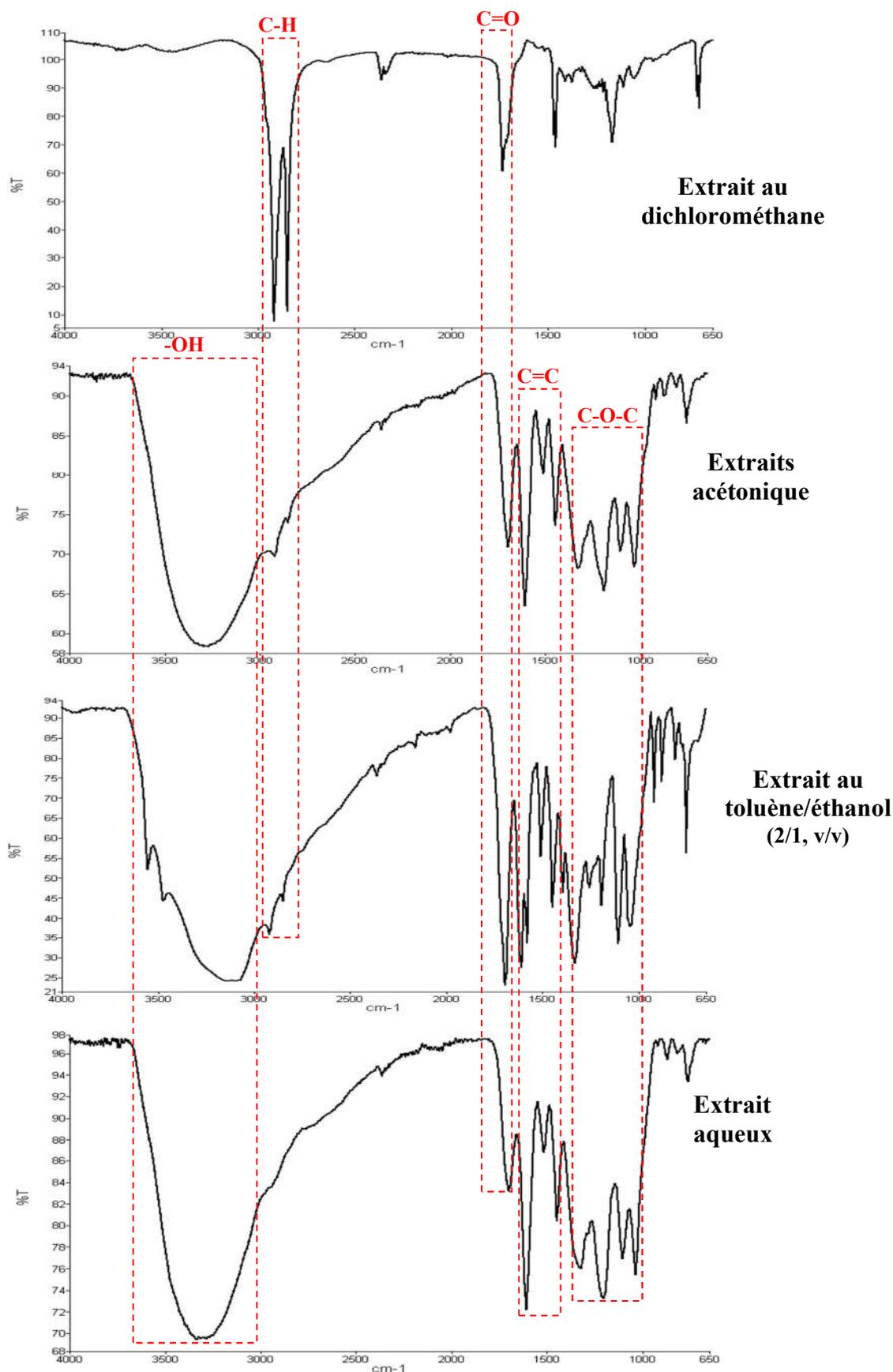


Figure 53: Analyses infrarouges des fractions d'extractibles du duramen de *C.edulis*

❖ Analyses infrarouges FTIR des fractions d'extractibles de l'aubier de *C.edulis*

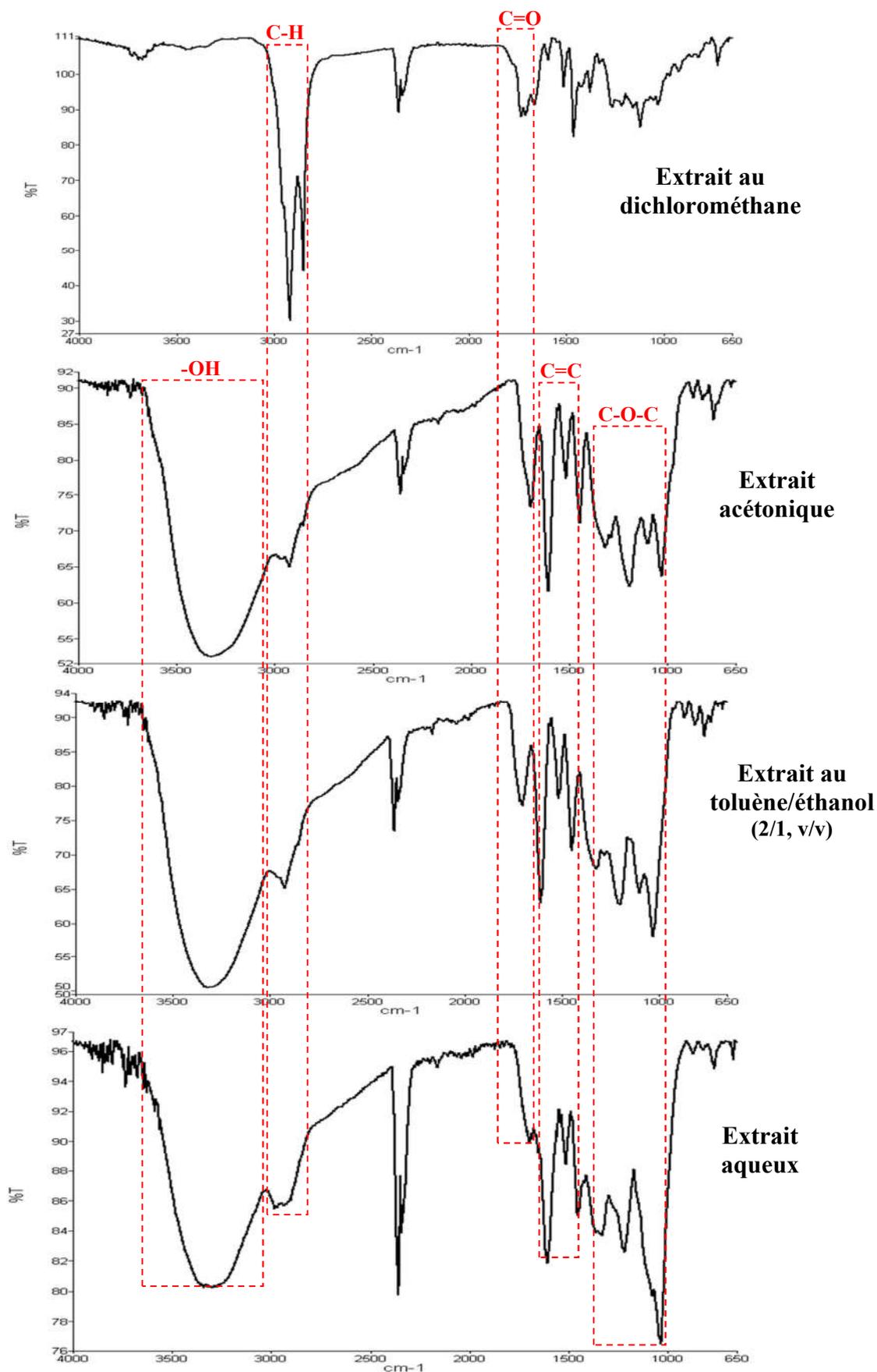


Figure 54: Analyses infrarouges des fractions d'extractibles de l'aubier de *C.edulis*

Les spectres infrarouges des différents extraits obtenus avec différents solvant pour les différents compartiments du bois de *C.edulis* sont présentés dans les figures 52, 53 et 54. Les extraits au dichlorométhane renferment des composés différents de ceux contenus dans les extraits d'acétone, de toluène / éthanol ou d'eau. Les pics à 2913, 2849 et 1462 cm^{-1} sont caractéristiques des vibrations d'élongation CH_2 et CH_3 présentes dans les composés tels que les cires, les graisses et les terpènes. Le pic à 1732 cm^{-1} indique la présence de groupes carbonyle $\text{C} = \text{O}$ présents dans les acides gras, des cires, des graisses ou autres composés renfermant des groupes carbonyle. Les extraits obtenus à l'acétone, avec le mélange toluène/éthanol (2/1,v/v) et à l'eau présentent des signaux relativement similaires. La présence de composés phénoliques est caractérisée par la forte bande d'absorption à 3218 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation de la liaison $-\text{OH}$ des structures aromatiques et aliphatiques. Les fortes bandes d'absorption à 1694; 1512 et 1445 cm^{-1} sont caractéristiques des vibrations d'élongation des liaisons $\text{C} = \text{C}$ du cycle aromatique, qui peuvent être attribuées à des composés aromatiques tels que les tanins, des lignanes, des flavonoïdes ou autres composés phénoliques. Les bandes d'absorption à 1322 et 1191 cm^{-1} sont attribuables aux vibrations d'élongation d'étirement C-O-C trouvées dans des composés tels que les flavonoïdes. De manière assez surprenante, les extraits à l'acétone, avec le mélange toluène/éthanol et à l'eau de l'écorce, l'aubier et le duramen présentent peu de différence au niveau de leur profil FTIR indiquant la présence de composés relativement similaires. Cette faible variabilité intraspécifique peut constituer un avantage dans le cadre d'une utilisation ultérieure.

En parallèle et pour confirmer les résultats obtenus par FTIR, un screening phytochimique a été effectué afin d'identifier les principales familles chimiques (polyphénols, saponines, flavonoïdes, stérols, terpènes et alcaloïdes) présents dans les différents extraits selon les protocoles décrits précédemment (Houghton et Raman, 1998; Akinjogunla et al, 2010).

III.2.3. Criblage phytochimique

Plusieurs tests qualitatifs ont été réalisés pour identifier les principales familles de composés présents dans les différentes fractions d'extractibles afin d'avoir une idée de la composition de chaque extrait. Les résultats de ce criblage phytochimique sont rapportés dans le tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5: Criblage phytochimique des extraits obtenus par extractions successives.

Composés actifs recherchés	Procédure des tests	Solvant d'extraction	Ecorce	Aubier	Duramen
Alcaloïdes	Mayer, Bouchardât	Dichlorométhane	-	-	-
		Acétone	+	-	-
		Toluène/éthanol	+	+	+
		Eau	+	+	+
Flavonoïdes	Test de Shinoda	Dichlorométhane	-	-	-
		Acétone	+	+	+
		Toluène/éthanol	+	+	+
		Eau	+	+	+
Polyphénols	Fer (III) chlorure	Dichlorométhane	-	-	-
		Acétone	+	+	+
		Toluène/éthanol	+	+	+
		Eau	+	+	+
Saponines	Pouvoir aphrogène	Dichlorométhane	-	-	-
		Acétone	+	+	+
		Toluène/éthanol	+	+	+
		Eau	+	+	+
Stéroïls et terpènes	Liebermann Bouchard	Dichlorométhane	+	+	-
		Acétone	-	+	-
		Toluène/éthanol	-	-	-
		Eau	-	-	-

(+/-) = présence / absence des composés actifs recherchés.

Il ressort du tableau 5 que les polyphénols, les flavonoïdes et les saponines sont présents dans tous les extraits de l'écorce, l'aubier et le bois de cœur de *C.edulis*, à l'exception des extraits au dichlorométhane. Des réactions positives avec le test au perchlorure de Fer (III) pour les polyphénols, le test de Shinoda pour les flavonoïdes et le pouvoir moussant pour les saponines ont en effet été obtenues systématiquement. Les alcaloïdes sont présents dans tous les extraits d'écorce et dans les extraits au mélange toluène/éthanol et les extraits aqueux du duramen et l'aubier de *C.edulis* comme en témoignent la réaction positive avec le réactif de Mayer. Les stéroïls et/ou les terpènes ont été identifiés dans les extraits au dichlorométhane des écorce et aubier et dans les extraits acétoniques de l'aubier. Les résultats du screening phytochimique obtenus sont en adéquation avec les résultats obtenus au niveau de l'analyse infrarouge. La

présence de toutes les classes de composés dans les bois tropicaux a été reportée dans la littérature. [Killic et Niemz, 2012](#), lors de l'étude des extractibles de quelques essences tropicales, ont mis en évidence la présence des composés lipophiles, principalement les acides gras et des composés hydrophiles (acides phénoliques, flavonoïdes, stérols, stilbènes et lignanes). Après le criblage phytochimique des différents extraits, nous avons procédé au dosage des phénols totaux, des proanthocyanidines ou tannins condensés et des flavonoïdes sur tous les extraits à l'exception de ceux au dichlorométhane qui ne montrent pas la présence de composés phénoliques suite au criblage phytochimique et aux analyses IR.

III.2.4. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux des différents extraits a été réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique de folin-Ciocalteu décrite par [Scalbert et al, \(1989\)](#) avec une légère modification. Les résultats des dosages sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extractible sec, (mg EGA g⁻¹ d'extrait sec). Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 6 et 7 ci-dessous :

Tableau 6: Teneur en phénols totaux des différents extraits obtenus au Soxhlet (moyenne de trois essais ± écart-type)

Solvant	Teneur en phénols totaux (mg EGA g ⁻¹ d'extrait sec)		
	Ecorce	Aubier	Duramen
Dichlorométhane	nd	nd	nd
Acétone	728,4 ± 1,6	656,3 ± 1,4	703,6 ± 1,4
Toluène/éthanol	552,8 ± 1,7	510,4 ± 0,8	525,7 ± 1,3
Eau	526,3 ± 0,5	273,5 ± 1,6	364,5 ± 1,6

nd: non déterminé.

Tableau 7: Teneur en phénols totaux des différents extraits obtenu au Dionex (moyenne de trois essais ± écart-type)

Solvant	Teneur en phénols totaux (mg EGA g ⁻¹ d'extrait sec)		
	Ecorce	Aubier	Duramen
Dichlorométhane	nd	nd	nd
Acétone	733,1 ± 1,3	661,5 ± 1,3	707,1 ± 1,6
Toluène/éthanol	394,8 ± 0,8	156,2 ± 0,4	229,3 ± 0,8
Eau	561,5 ± 1,3	436,4 ± 1,2	616,7 ± 1,7

nd: non déterminé.

Il ressort de ces tableaux que les teneurs en phénols totaux des différentes fractions d'extraits varient de 273,5 à 728,4 (Soxhlet) et 156,2 à 733,1 (Dionex) milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme d'extraits sec. On remarque également que la teneur en phénols totaux

varie d'un solvant à l'autre, d'une partie du bois à une autre et en fonction du type d'extraction. Les extraits acétoniques présentent les grandes teneurs en phénols totaux. Ceci s'explique par le fait que l'acétone est le premier solvant polaire utilisé après l'extraction au dichlorométhane qui n'extrait aucun composé phénolique lors des séries d'extractions successives. Dans tous les cas, des teneurs assez similaires sont obtenues dans les différents compartiments du bois pour un même solvant. Globalement les extraits obtenus au Dionex présentent les teneurs les plus élevées en phénols totaux par rapport à ceux obtenus au Soxhlet, excepté pour ceux obtenus au mélange toluène/éthanol. Ceci pourrait s'expliquer par l'effet combiné de la pression et la température qui assurerait une meilleure extraction des composés phénolique en limitant les réactions de dégradation. Plusieurs travaux notamment ceux de [Hang et al, \(2009\)](#) sur l'étude de vingt-deux essences tropicales et ceux menés par [Saha-Tchinda et al, \(2013\)](#) sur l'activité antioxydante, teneur en phénols totaux et la composition chimique des extraits de quatre bois camerounais: padouk (*Pterocarpus soyauxii Taubb*), tali (*Erythrophleum suaveolens*), moabi (*Baillonella toxisperma*) et movingui (*Distemonanthus benthamianus*), montrent des résultats similaires. Ces résultats corroborent parfaitement ceux des analyses FTIR des extraits et du criblage phytochimique avec la présence des polyphénols dans les fractions acétoniques, au toluène/éthanol et aqueuses. Après avoir dosé les phénols totaux, nous avons déterminé par la suite les concentrations des proanthocyanidines ou tannins condensés et des flavonoïdes.

III.2.5. Dosage des proanthocyanidines et des flavonoïdes

Le dosage des proanthocyanidines ou tannins condensés a été réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique de condensation acide de la vanilline décrite par Broadhurst et Jones, (1978), le dosage des flavonoïdes par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par Luis et al, (2014) avec une légère modification. Les résultats combinés des dosages exprimés en milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extraits sec, (mg ECat g⁻¹ d'extrait sec) sont présentés dans le tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8: Teneur en tannins condensés et en flavonoïdes (moyenne de trois essais ± écart-type)

	Teneur en tannins condensés et flavonoïdes (mg ECat g ⁻¹) d'extrait sec					
	Ecorce		Aubier		Duramen	
	Tannins condensés	Flavonoïdes	Tannins condensés	Flavonoïdes	Tannins condensés	Flavonoïdes
Dichlorométhane	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acétone	192,2 ± 1,5	60,2 ± 0,9	156,9 ± 2,1	39,5 ± 1,2	178,3 ± 0,9	57,2 ± 0,8
Toluène/éthanol	156,6 ± 1,3	58,6 ± 1,3	121,3 ± 1,7	31,3 ± 1,3	139,2 ± 1,4	55,4 ± 1,2
Eau	122,4 ± 1,1	30,1 ± 1,1	83,4 ± 1,4	21,6 ± 0,8	118,4 ± 1,6	28,2 ± 1,1

nd: non déterminé.

On constate dans le tableau 8 que les teneurs en tannins condensés varient de 83,4 à 192,2 milligrammes et celles des flavonoïdes varient de 21,6 à 60,2 milligrammes équivalent catéchine par gramme d'extraits secs. Ces teneurs en tannins condensés et en flavonoïdes sont similaires à celles trouvées par [Anouhe et al, 2018](#) lors de ses travaux sur le rôle des extractibles dans la durabilité naturelle du bois de cœur de *Dicorynia guianensis* Amsh et ceux de [Saha-Tchinda et al \(2013\)](#) sur les propriétés antioxydantes et antifongiques des extractibles de quatre bois camerounais (padouk (*Pterocarpus soyauxii* Taubb), tali (*Erythrophleum suaveolens*), moabi (*Baillonella toxisperma*) et movingui (*Distemonanthus benthamianus*)). Elles varient également d'un solvant à l'autre et d'une partie du bois à une autre. Les teneurs les plus élevées en tannins condensés et flavonoïdes sont obtenues avec les extraits acétoniques et les valeurs les plus faibles avec les extraits aqueux. Ceci peut s'expliquer par le caractère polaire des extraits et par le fait que l'extraction à l'acétone est réalisée avant l'extraction à l'eau lors de nos extractions successives. Ces résultats sont à nouveau en adéquation avec les teneurs en extractibles, et les teneurs en phénol totaux enregistrés et ceux obtenu lors de l'analyses FTIR des extractibles et le criblage phytochimique réalisé précédemment. Après le dosage des phénols totaux, des tannins condensés et des flavonoïdes, des analyses chromatographiques en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) des extraits des différentes parties de notre essence ont été réalisées.

III.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses GC/MS des extraits des différentes parties de *C.edulis* ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 680 couplé à un spectromètre de masse Perkin Elmer Clarus SQ8, l'ensemble piloté par le logiciel Turbo Mass v 6.1 et disposant d'une base de données NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) (édition 2011). Grâce à cette base de données, les composés ont été identifiés et donnés sans faire mention des groupements triméthylsilyle ajoutés pour la dérivation des extractibles. Lors de ces analyses, seuls les extraits obtenus à l'aide de solvants organiques ont conduit à des résultats exploitables. Aucun signal étant obtenu dans le cas des extraits aqueux.

III.3.1. Extractibles identifiés au niveau de l'écorce

Sur la figure 55 ci-dessous sont présentés les chromatogrammes des différents extractibles de l'écorce de *C.edulis* en fonction des solvants d'extraction.

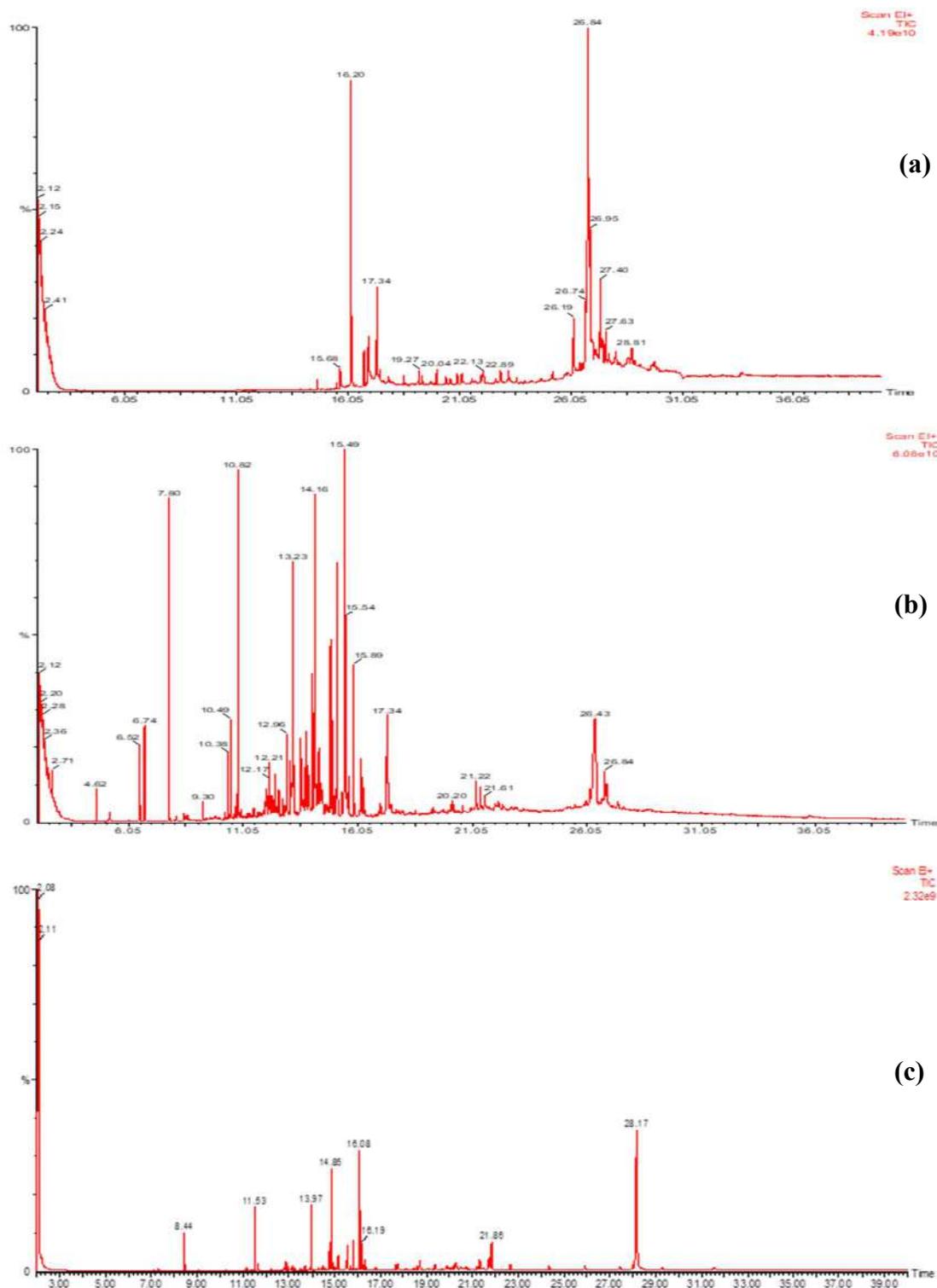


Figure 55: Analyse GC/MS des extraits de l'écorce de *C. edulis*: (a) extraits dichlorométhane ; (b) extraits acétone ; (c) extraits toluène/éthanol

L'analyse des différents signaux à l'aide de la base de données NIST a permis d'identifier les composés présentés dans le tableau 9 :

Tableau 9: Composés identifiés dans les extraits de l'écorce de *C.edulis*

Solvent	Temps de Rétention (min)	Nom de la molécule:	Composition (%)
Dichlorométhane	15,68	/	1
	16,20	Acide hexadécanoïque	8
	17,34	Acide trans-9-Octadécenoïque	3
	19,27	/	/
	20,04	/	/
	22,13	1-Monolinoleoylglycerol	1
	22,89	/	1
	26,19	Stigmastérol	7
	26,84	β -Sitostérol	42
	27,40	Non identifié	14
	27,63	Lupéol	7
	28,81	Non identifié	16
	Acétone	7,80	Glycérol
10,38		Butane	1
10,49;10,82		méso-Erythritol	2;9
12,17		D-(-)-Ribofuranose	1
12,21;12,96		β -L-Mannopyranose	1;2
13,23		Xylitol	9
14,07		D-(-)-Fructofuranose	3
14,16		d-(-)-Fructose	9
15,13		D-Sorbitol	5
15,49		Acide gallique	12
15,54		β -D-Allopyranose	4
15,89		Inositol	3
16,19		Acide hexadécanoïque	2
16,34		Myo-Inositol	1
17,34		Acide trans-9-Octadécenoïque	6
20,20		/	/
21,22		Catéchine	1
21,61		/	1
26,43	Acide ellagique	14	
26,84	Non identifié	6	
Mélange toluène/éthanol (2/1,v/v)	8,44	Glycérol	4
	11,53	meso-Erythritol	6
	13,97	Arabinitol	6
	14,78,14,85	D-(-)-Fructofuranose	3;8
	15,83	Mannitol	3
	16,08	Acide gallique	9
	16,19	D-Glucose	3
	20,27	/	5
	21,33	/	3
	21,73	Acide octadécanoïque	3
	21,86	Acide stéarique	4
28,17	Acide ellagique	43	

(/) : Colonne.

III.3.2. Extractibles identifiés au niveau de l'aubier de *C.edulis*

Les chromatogrammes obtenus par GC/MS suite à l'extraction de l'aubier avec les différents solvants sont présentés ci-dessous (Figure 56).

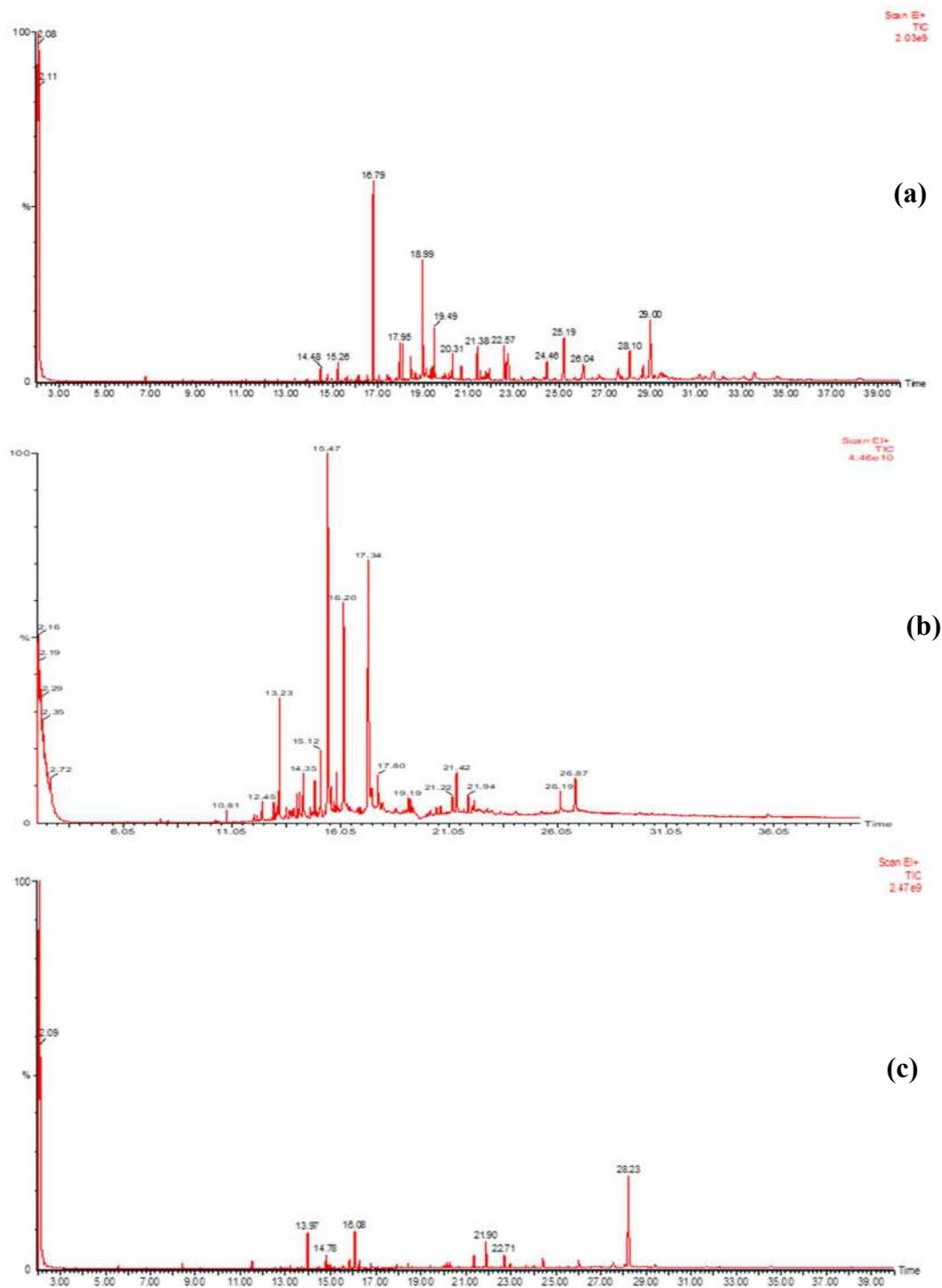


Figure 56: Analyse GC/MS des extraits de l'aubier *C.edulis*: (a) extraits dichlorométhane ; (b) extraits acétone ; (c) extraits toluène/éthanol

A partir du traitement des chromatogrammes des différents extraits d'aubier à l'aide de la base de données NIST, nous avons identifié les composés présentés dans le tableau 10:

Tableau 10: Composés identifiés dans les extraits de l'aubier de *C.edulis*

Solvent	Temps de Rétention (min)	Nom de la molécule:	Composition (%)
Dichlorométhane	14,48	Acide vanillique	2
	15,26	Acide tétradécanoïque	2
	16,79	Acide hexadécanoïque	18
	17,95	Acid trans-9-Octadécenoïque	4
	18,99	Acide 9-Décenoïque	19
	19,49	Acid 5,8,11,14-Eicosatétraynoïque	6
	22,57	Acide tétracosanoïque	7
	25,19	Acide hexacosanoïque	10
	28,10	Stigmastérol	10
	29,00	β -Sitostérol	21
Acétone	12,45	D-Xylopyranose	1
	13,23	L-(-)-Arabitol	6
	14,35	Benzoic acid, 3,4-bis	2
	15,12	D-Mannitol	3
	15,47	acide gallique	16
	16,20	Acide hexadécanoïque	12
	17,34	Acide trans-9-Octadécenoïque	26
	17,80	Acide 9-Octadécenoïque	4
	21,22;21,24	Catéchine	2;3
	21,94	/	1
	26,19	Stigmastérol	4
	26,87	β -Sitostérol	17
Mélange toluène/éthanol (2/1,v/v)	13,97	D-(+)-Arabitol	7
	16,08	Acide gallique	7
	21,38	/	5
	21,90	Acide Stéarique	11
	22,71	/	6
	24,43	/	6
	26,03	/	5
28,23	Acide ellagique	53	

(/) : Colonne.

III.3.2. Extractibles identifiés au niveau du bois de cœur de *C.edulis*

La figure 57 présente les chromatogrammes des différents extraits du bois de cœur de *C.edulis* en fonction des solvants d'extraction.

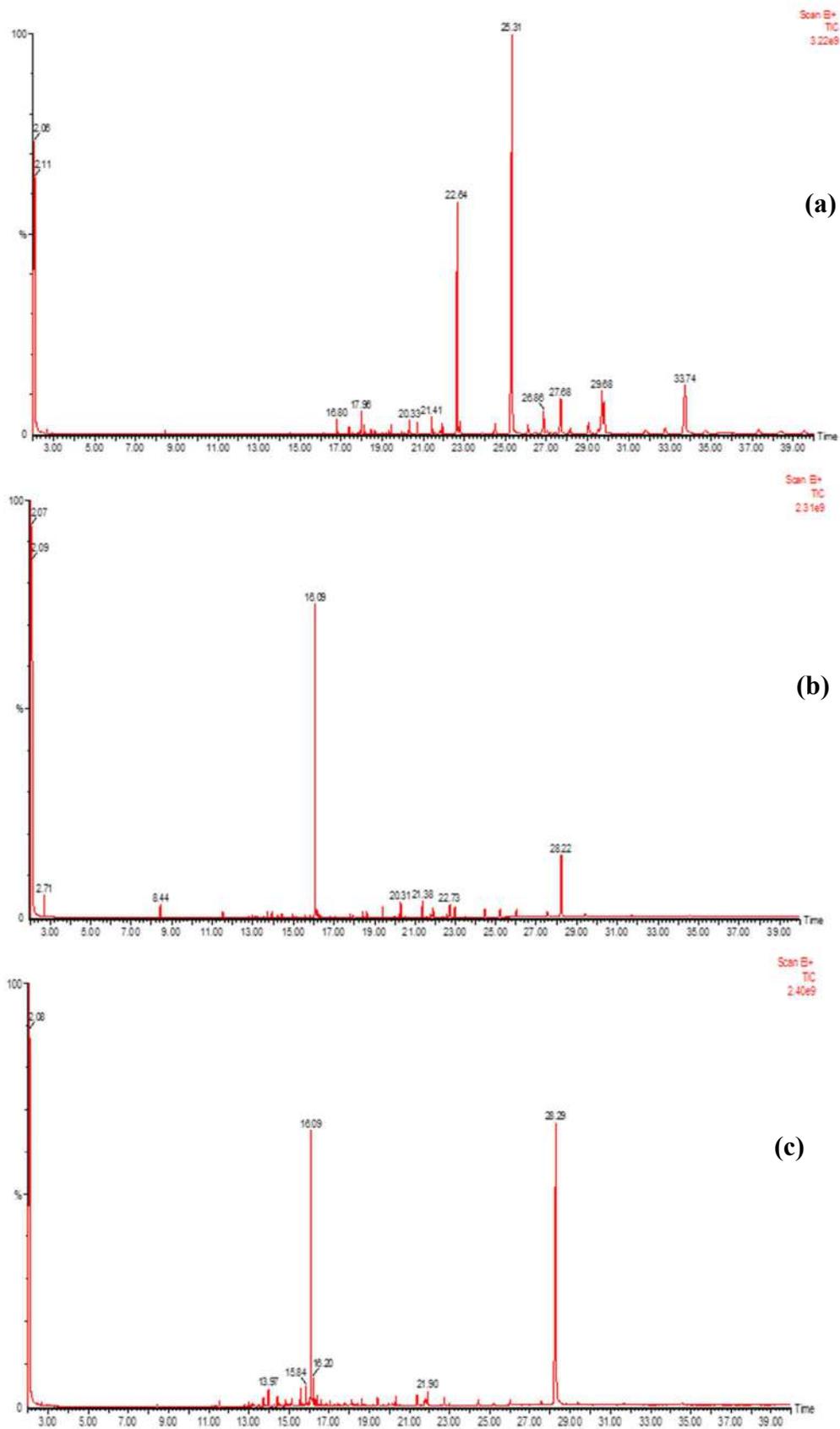


Figure 57: Analyse GC/MS des extraits du duramen de *C. edulis*: (a) extraits dichlorométhane ; (b) extrait acétone ; (c) extrait toluène/éthanol

Une fois encore, le traitement des chromatogrammes des différents extraits à l'aide de la base de données NIST, a permis d'identifier un certain nombre de composés (Tableau 11).

Tableau 11: Composés identifiés dans les extraits de l'aubier de *C.edulis*

solvent	Temps de Rétention (min)	Nom de la molécule	Composition (%)
Dichlorométhane	22,64	Acide tétracosanoïque	20
	25,31	Acide hexacosanoïque	54
	27,68	Acide Docosanoïque	5
	29,68	Non identifié	11
	33,74	Non identifié	11
Acétone	16,09	Acide gallique	53
	20,31	/	3
	21,38	/	4
	22,73	/	6
	24,46	/	3
	28,22	Acide ellagique	30
Mélange toluène/éthanol (2/1,v/v)	16,09	Acide gallique	20
	28,29	Acide ellagique	80

(/): colonne

Il ressort que tous ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux obtenus lors de l'analyse des spectres infrarouges des extractibles, du criblage phytochimique et ceux obtenus lors des différents dosages des composés phénoliques. Ils indiquent que les extraits obtenus avec le dichlorométhane sont très différents de ceux obtenus avec tous les autres solvants. De plus, les résultats des analyses GC/MS confirment sans ambiguïté les conclusions faites lors de l'analyse des spectres infrarouges indiquant la présence de composés lipophiles avec l'identification de composés comme les acides hexadécanoïque, hexacosanoïque ou le stigmastérol et le β -sitostérol. Les extraits polaires obtenus à l'acétone ou avec le mélange toluène/éthanol contiennent principalement des sucres et des composés phénoliques, les extraits de duramen étant particulièrement riches en acide gallique et ellagique retrouvés de manière moins importante dans l'aubier et l'écorce. Les phytostérols, comme le β -sitostérol ou le stigmastérol ont également été identifiés dans les extraits acétoniques de l'aubier résultant probablement de formes glycosylées pouvant être extraites à l'acétone et pas avec le dichlorométhane.

**CHAPITRE IV
DURABILITE NATURELLE ET
DURABILITE CONFEREES PAR LES
SUBSTANCES EXTRACTIBLES**

CHAPITRE IV DURABILITE NATURELLE ET DURABILITE CONFEREES PAR LES SUBSTANCES EXTRACTIBLES

Dans ce chapitre seront présentés les résultats obtenus lors de l'étude de la durabilité naturelle du bois de cœur de *C.edulis* vis-à-vis des champignons basidiomycètes et les termites *Reticulitermes flavipes* ainsi que les résultats de la durabilité conférée après imprégnation d'extraits acétone/eau de *C.edulis* dans des essences peu durables telles que le hêtre (*Fagus sylvatica*) et sur l'aubier de pin (*Pinus sylvestris linnaeus*).

IV.1. Durabilité naturelle du bois de cœur de *C.edulis* vis-à-vis des champignons

Pour l'étude de la durabilité naturelle, des éprouvettes de 30×10×5 mm³ extraites et non extraites de *C.edulis* ont été mises en contact avec des champignons de pourritures blanches et brunes durant seize semaines en laboratoire afin d'évaluer l'influence des extractibles sur la durabilité de notre essence. Le bois de hêtre a été utilisé comme témoin de virulence pour les champignons de la pourriture blanche et l'aubier de pin comme témoin de virulence pour les champignons de la pourriture brune. Les résultats des pertes de masses des éprouvettes dues à l'attaque des différents champignons sont présentés dans le tableau 12 ci-dessous :

Tableau 12: Pertes de perte de masse corrigées après 16 semaines d'exposition à différents agents de pourriture (moyenne de 12 essais ± écart type).

Essence de bois	Perte de masse corrigée des blocs (%)				
	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Rhodonina placenta</i>	<i>Coniophora puteana</i>	<i>Gloephyllum trabeum</i>
Témoin Hêtre	48,9 ± 3	50,2 ± 9,5	-	-	-
Témoin Pin	-	-	40,6 ± 7,5	48,5 ± 8,3	35,3 ± 1,9
<i>C.edulis</i> non extrait	1,3 ± 0,4	1,28 ± 0,9	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	- 0,2 ± 0,1
<i>C.edulis</i> Extrait	19,8 ± 0,9	17,5 ± 0,9	10,8 ± 0,9	12,8 ± 0,3	8,5 ± 0,7

(-): Non testé

Les résultats du tableau 12 indiquent que les pertes de masse des témoins de virulence varient de 48,9% pour *Trametes versicolor* à 50,2% pour *Pycnoporus sanguineus* pour le hêtre et de 35,3% pour *Gloephyllum trabeum* à 48,5% pour *Coniophora puteana* pour l'aubier de pin. Pour que les essais soient valables, la norme européenne EN 113 (1996) requiert que les éprouvettes de contrôle de virulence montrent des pertes de masse non inférieures au minimum indiquées selon la souche de champignon considérée, 20% pour les champignons de pourritures brunes et 25% pour les champignons de pourritures blanches. Les essais peuvent ainsi être validés pour

tous les champignons utilisés. Les pertes de masse de toutes les éprouvettes de bois de cœur non extraits de *C. edulis* sont inférieures à 2%, quel que soit le champignon utilisé indiquant une bonne durabilité naturelle du duramen de *C. edulis* aux attaques des pourritures blanches et des pourritures brunes. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus sur d'autres essences du bassin du Congo par [Nzokou et al, 2005](#) lors de leurs travaux sur l'étude de la durabilité naturelle de huit essences camerounaises et [Saha Tchinda et al, 2018](#) sur l'inhibition de la croissance des champignons avec des extraits et la durabilité naturelle de cinq essences de bois camerounaises. Les pertes de masse obtenues avec les éprouvettes de bois de cœur de *C. edulis* préalablement soumis à l'extraction confirment le rôle important joué par les extractibles sur sa durabilité naturelle. En effet, les pertes de masse des éprouvettes extraites sont comprises entre 10,8 et 19,8% selon le champignon. Des résultats similaires ont été obtenus par [Kirker et al, 2013](#) lors de leurs travaux sur le rôle des extractibles d'essences naturellement durables. De plus [Mohareb et al, \(2010\)](#) ont également enregistré des pertes de masse importantes après l'extraction de *Cupressus lusitanica*. Tous ces résultats confortent parfaitement les hypothèses existant dans la littérature selon lesquelles même si plusieurs facteurs tels que la densité, le taux de lignine, les composés inorganiques (le taux de silice par exemple), l'âge, la zone géographique, la saison d'abattage de l'arbre peuvent expliquer la durabilité naturelle d'une essence, la teneur en extractibles reste le facteur le plus pertinent. On remarque également que les éprouvettes sont plus dégradées par les champignons de pourritures blanches que par les champignons de pourritures brunes. Ceci peut s'expliquer par le fait que, les champignons de la pourriture blanche peuvent dégrader tous les composants de la paroi cellulaire, y comprise la lignine. Ils provoquent souvent un blanchiment de la coloration normale du bois. Leur capacité à métaboliser de grandes quantités de lignine dans le bois est unique parmi les micro-organismes. Les champignons qui causent la pourriture blanche sont un groupe hétérogène qui peut dégrader des quantités plus ou moins importantes d'un composant spécifique de la paroi cellulaire. Certains d'eux retirent préférentiellement la lignine du bois en laissant des poches de cellules blanches dégradées entièrement constituées de cellulose, tandis que d'autres dégradent la lignine et la cellulose simultanément ([Blanchette, 1990](#)). Alors que les champignons de pourriture brune dépolymérisent la cellulose rapidement pendant les premiers stades de la colonisation du bois. Les hydrates de carbone de la paroi cellulaire sont fortement dégradés pendant l'exposition aux champignons, laissant un substrat modifié riche en lignine. La norme EN 350-1 (1996) permet de classer la durabilité naturelle en cinq catégories en fonction du rapport (x) de la perte de masse mesurée chez une espèce durable et de la perte de masse mesurée chez une espèce non durable utilisée dans un contrôle de la virulence. Ainsi donc, les

valeurs de pertes masses obtenues ont permis de calculer la valeur de (x) pour classer la durabilité naturelle de notre essence en fonction des différents champignons utilisés. Les résultats sont consignés dans le tableau 13 ci-dessous :

Tableau 13: Classification de la durabilité basée sur la norme EN 350-1, 1994

Essence de bois	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Rhodonía placenta</i>	<i>Coniophora puteana</i>	<i>Gloephyllum trabeum</i>
<i>C.edulis</i> non extrait	1 (x = 0,02)	1 (x = 0,02)	1 (x = 0,01)	1 (x = 0,01)	1 (x = 0,005)
<i>C.edulis</i> extrait	3 (x = 0,40)	3 (x = 0,35)	2 (x = 0,27)	2 (x = 0,26)	2 (x = 0,24)

1= Très durable, 2= Durable, 3= Moyennement durable, 4= Peu durable, 5= Non durable.

D'après le tableau 13, on peut remarquer que les éprouvettes de *C.edulis* non extraites atteignent toutes la classification "très durable" quel que soit le champignon utilisé. En revanche après extraction, les éprouvettes passent de "très durable" à "durable" avec les champignons de pourritures brunes *Rhodonía placenta*, *Coniophora puteana* et *Gloephyllum trabeum*, tandis que pour les champignons de pourritures blanches *Trametes versicolor* et *Pycnoporus sanguineus*, les éprouvettes passent de "très durable" à "moyennement durable". L'extraction a donc un effet significatif sur la durabilité naturelle de notre essence. Lorsque les substances extractibles sont enlevées, le bois devient généralement plus vulnérable aux champignons lignivores. La durabilité naturelle du bois de cœur peut être largement attribuée à la quantité et à la nature des composés extractibles identifiés précédemment, corroborant les résultats de la littérature selon lesquels les bois durables dont les extractibles sont retirés deviennent sensibles à la pourriture (Scheffer et Cowling, 1966; Smith et al, 1989).

De même, l'ajout des extractibles d'une espèce durable à un bois d'une essence non durable peuvent rendre cette dernière plus résistante à la pourriture (Kamden, 1994 ; Onuorah, 2001 ; Smith et al, 1989). De nombreuses études évaluant l'effet des extractibles sur l'inhibition de la croissance fongique (Seppänen et al, 2004; Eslyn et al, 1981; Diouf et al, 2002; Carrillo-Parra et al, 2012 ; Tchinda et al, 2018) ont conclu que les composés phénoliques et les terpènes étaient des composés fortement antifongiques. Ainsi, la présence de composés phénoliques dans les extraits pourrait aider à prédire la durabilité naturelle contre les attaques fongiques. Les extractibles présentent des activités spécifiques aux microorganismes qui attaquent l'arbre vivant (Etheridge, 1962; Ohsawa et al, 1992; Wilcox, 1969). De plus, les extraits peuvent contenir plusieurs composés à faible toxicité qui interagissent de manière synergique pour conduire à une inhibition de l'attaque fongique (Schultz et al, 1995; Shultz et Nicholas, 2002).

Enfin, dans certains cas, des espèces comme par *Larix* spp, produisent de grandes quantités de matières extractibles sans pour autant que leur bois présente une forte durabilité naturelle (DeBell et al, 1999 ; Srinivasan et al, 1999 ; Hillis, 1987). La figure 58 présente le développement des champignons sur les éprouvettes extraites et non extraites de *C. edulis*.

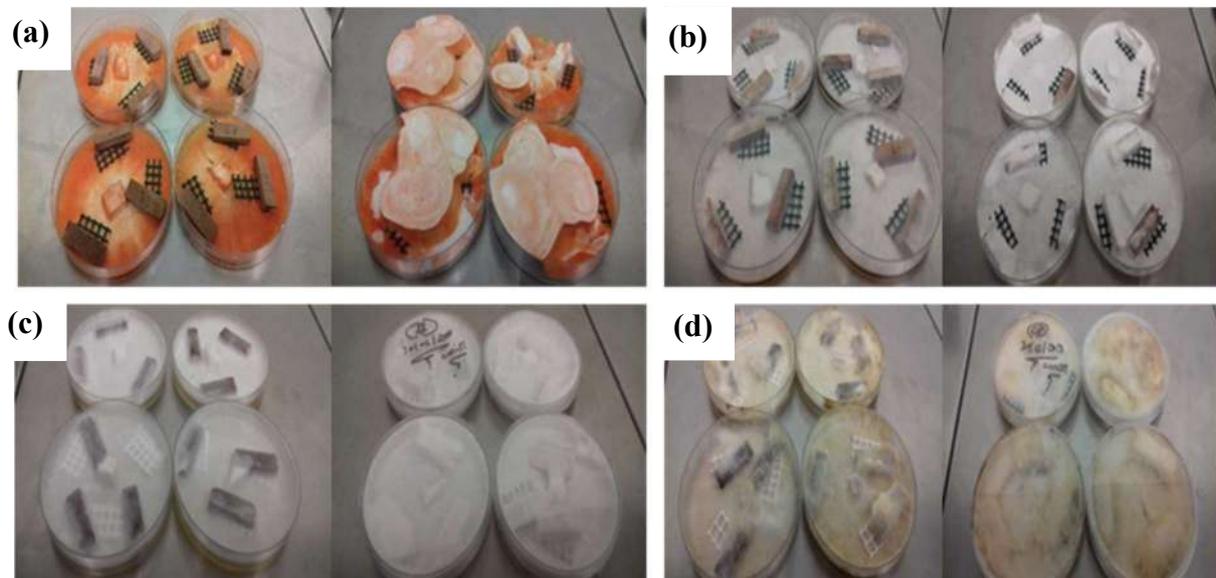


Figure 58: (a) blocs extraits et non extraits exposés à *PS* ; (b) blocs extraits et non extraits exposés à *TV* ; (c) blocs extraits et non extraits exposés à *RP*; (d) blocs extraits et non extraits exposés à *CP*.

Un autre point important pour que les champignons puissent dégrader le bois est la teneur en humidité (MC). Selon la littérature, la teneur en humidité du bois doit être supérieure à 20% en zone tempérée et 30% en zone tropicale pour que les champignons provoquent une dégradation totale du bois (Blanchette et al, 1990), tandis que Zabel et Morrell, 1992 ont affirmé que la teneur en humidité entre 40 et 80% était fortement préférable. La teneur moyenne en humidité des éprouvettes après 16 semaines d'exposition aux attaques fongiques est présentée dans le tableau 14 ci-dessous :

Tableau 14: Teneur en humidité après 16 semaines d'exposition à différents agents de pourriture (moyenne de 12 essais \pm écart type)

Essence de bois	Taux d'humidité (%)				
	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Rhodonía placenta</i>	<i>Coniophora puteana</i>	<i>Gloephyllum trabeum</i>
Témoin <i>Hêtre</i>	50,3 \pm 10,7	51,3 \pm 4,9	-	-	-
Témoin <i>Pin</i>	-	-	49,0 \pm 5,3	53,7 \pm 6,7	43,2 \pm 7,3
<i>C.edulis</i> non extrait	27,4 \pm 0,9	27,1 \pm 1,1	20,8 \pm 1,0	25,7 \pm 1,8	26,4 \pm 2,5
<i>C.edulis</i> extrait	45,0 \pm 4,4	40,9 \pm 3,6	32,7 \pm 8,0	43,5 \pm 7,7	37,5 \pm 1,9

(-): Non testé

Le tableau 14 montre qu'après 16 semaines d'exposition des éprouvettes à 70% d'humidité relative à 22 °C, la teneur en humidité des éprouvettes varie de 20,8 à 53,7% ce qui indique un état parfaitement approprié pour la dégradation des éprouvettes. Il montre également qu'après extraction, les éprouvettes absorbent plus d'humidité. La teneur en matières extractibles semble donc influencer la teneur en humidité du bois, qui pourrait expliquer également la durabilité du bois du fait de son caractère plus hydrophobe. L'encombrement stérique et le caractère hydrophile des extractibles peuvent expliquer la teneur en eau plus élevée des éprouvettes extraites corroborant l'effet similaire observé sur le teck (Rizanti et al, 2018). Ces résultats sont totalement en accord avec les pertes de masse enregistrées sur les éprouvettes.

Après avoir effectué des essais de durabilité naturelle sur le duramen de *C.edulis*, nous avons envisagé la mise en place d'essais de durabilité conférée sur le bois de *hêtre* et sur l'aubier de *pin* en imprégnant des extraits de duramen de *C.edulis* obtenus au Soxhlet au mélange acétone/eau (1/1, v/v) choisi de manière à extraire aussi bien les composés polaires que les composés apolaires.

IV.2. Durabilité conférée par les extraits de duramen de *C.edulis* à des essences peu durables

Pour apprécier les propriétés antifongiques des extraits de *C.edulis*, des essais de durabilité conférée ont été réalisés sur des éprouvettes 25×15×5 mm³ d'aubier de pin sylvestre et le hêtre préalablement imprégnées d'extraits au mélange acétone/eau (1/1, v/v) du duramen de *C.edulis* à des concentrations de 5 et 10%. Les éprouvettes imprégnées ont été exposées aux différents champignons testés précédemment durant 16 semaines dans une enceinte climatique à 75%

d'humidité relative et à 22°C. Les résultats de ces différents essais sont présentés dans les figures 59 et 60.

❖ *Pertes de masses des éprouvettes avec les champignons de pourritures brunes :*

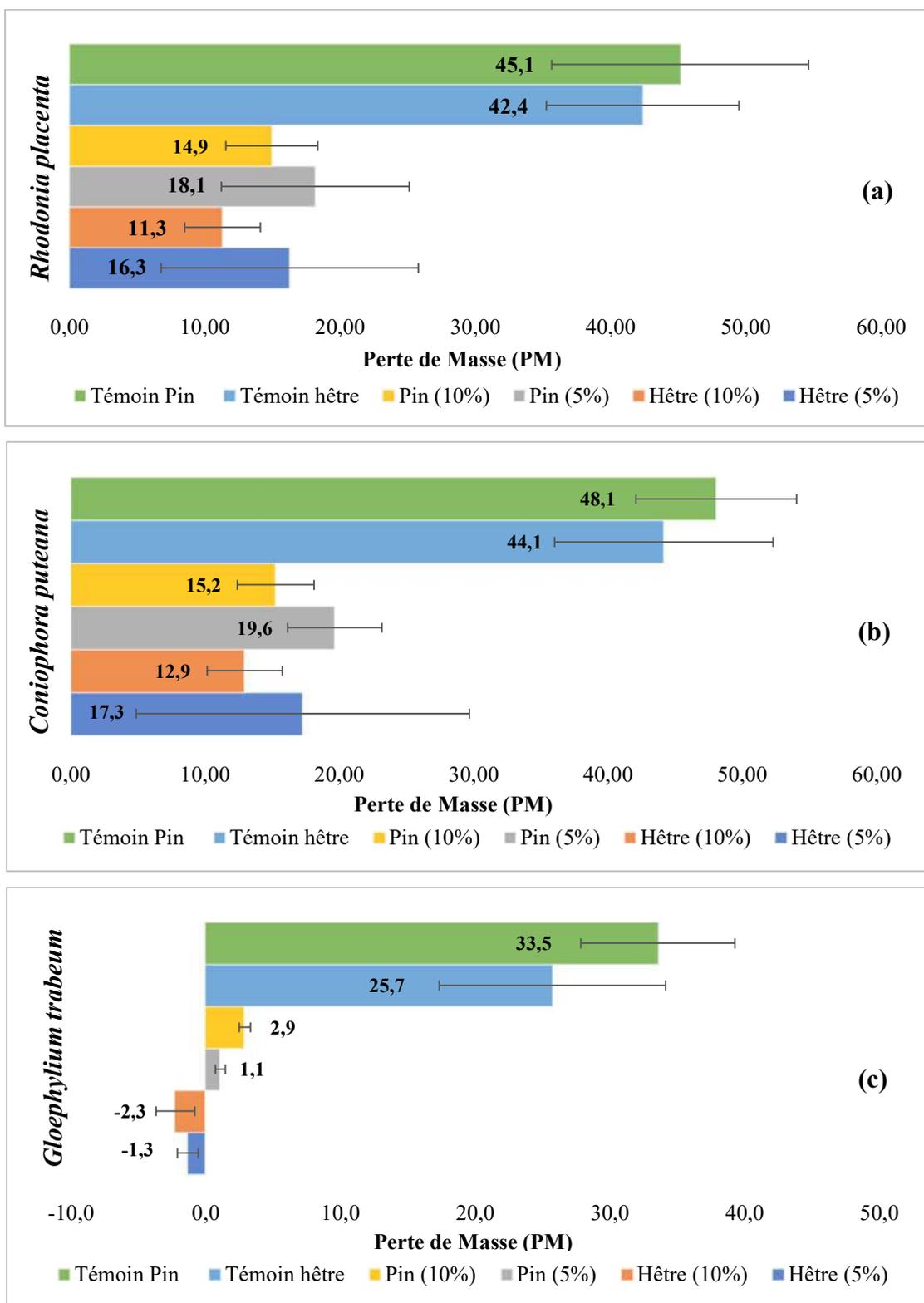


Figure 59: Pertes de masses des éprouvettes de pin ou de hêtre imprégnées ou non avec des extraits de *C.edulis* après exposition aux différents agents de pourriture brune. (a) *Rhodonia placenta* ; (b) *Coniophora puteana* ; (c) *Gloeophyllum trabeum*

❖ *Pertes de masses des éprouvettes avec les champignons de pourritures blanches :*

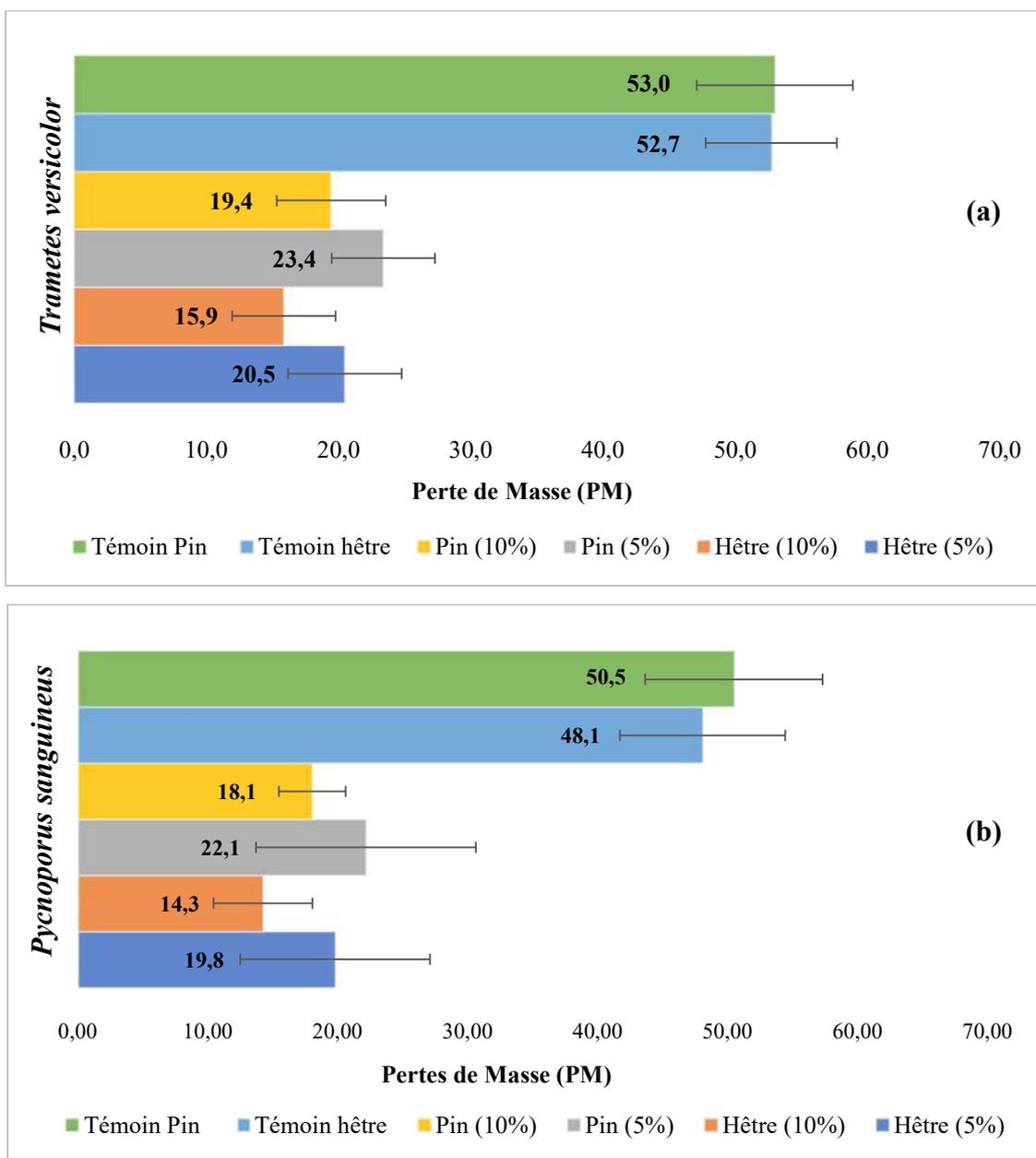


Figure 60: Pertes de masses des éprouvettes de pin ou de hêtre imprégnées ou non avec des extraits de *C.edulis* après exposition aux différents agents de pourriture blanches. (a) *Trametes versicolor* ; (b) *Pycnoporus sanguineus*

On peut observer sur les figures 58 et 59 qu'après 16 semaines d'exposition des éprouvettes aux différents champignons, les pertes de masse des témoins de virulence sont d'environ 50% pour les agents de pourritures blanches indépendamment de la nature de l'essence, hêtre ou pin. Dans le même temps, les pertes de masse des témoins de virulence exposés aux agents de pourritures brunes sont comprises entre 30 et 48%, les éprouvettes de pin étant toujours un peu plus dégradées que les éprouvettes de hêtre. Les essais peuvent ainsi donc être validés. On observe également que, malgré le traitement apporté par l'imprégnation d'extraits du duramen

de *C.edulis* aux différentes éprouvettes d'aubier de pin et de hêtre, les pertes de masses des éprouvettes sont toutes supérieures à 10% avec les différents champignons à l'exception de *Gloephyllum trabeum*, pour lequel les pertes de masses des éprouvettes sont inférieures, à 5%. Cependant, même si les pertes de masse des éprouvettes imprégnées sont comprises entre 10% et 25%, elles restent largement inférieures aux pertes de masse mesurées pour les éprouvettes témoins confirmant le rôle de protection des extraits. Ces résultats sont en accord avec les résultats des pertes de masse obtenus avec les éprouvettes de *C.edulis* où les plus faibles valeurs des pertes de masse ont été enregistrées en présence des extraits. On remarque également que les pertes de masse des éprouvettes sont plus élevées avec les champignons de pourritures blanches qu'avec les pourritures brunes et que les pertes de masse diminuent avec l'augmentation de la concentration. Elles sont plus élevées chez les éprouvettes imprégnées avec les solutions à 5% qu'avec celles imprégnées avec les solutions à 10%. Ces résultats sont parfaitement en accord avec la littérature sur la durabilité conférée notamment les travaux de [Bédoungindzi et al \(2020\)](#) concernant l'utilisation de résines de *Dacryodes edulis* G.Don H.J.Lam pour améliorer la durabilité d'essences peu durable comme le hêtre et le pin. Après ces essais de durabilités naturelle et conférée vis-à-vis des champignons, des essais screening (rapide) ont été réalisés au CIRAD vis-à-vis des termites.

IV.3. Durabilité naturelle du bois de cœur de *C.edulis* et durabilité conférée par les extraits de *C.edulis* à des essences peu durables vis-à-vis des termites.

Des éprouvettes 30×10×5 mm³ de duramen de *C.edulis* extrait ou non extraites et des éprouvettes 25×15×5 mm³ de hêtre et d'aubier de pin imprégnées d'extraits du duramen de *C.edulis* ont été utilisées pour évaluer la résistance du bois vis-à-vis de *Reticulitermes flavipes* selon la procédure décrite par la norme EN 117 (2013). Les résultats des pertes de masses dues à l'attaque des termites sont présentés dans le tableau 15:

Tableau 15: Résultats des essais de durabilité des différents blocs de bois *C.edulis* extraits ou non extraits et hêtre ou pin imprégnés ou non imprégnés d'extraits de *C.edulis* à 5 ou 10% vis à vis des termites (moyenne de 6 essais \pm écart type)

		PM _{ter} (%)	Taux de survie (%)	Cotation visuelle
<i>C.edulis</i>	Non-extrait	0,8 \pm 0,2	0,3 \pm 0,8	1
	Extrait	4,5 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0	3
Hêtre	Témoin simple	10,5 \pm 1,2	68,0 \pm 13,0	4
	Témoin Ethanol	9,7 \pm 0,5	83,50 \pm 5,3	4
	5% Extrait	8,2 \pm 0,9	47,7 \pm 12,4	4
	10% Extrait	4,7 \pm 2,3	16,3 \pm 26,6	3
Pin	Témoin simple	10,9 \pm 0,8	84,0 \pm 4,3	4
	Témoin Ethanol	17,4 \pm 1,2	84,0 \pm 7,5	4
	5% Extrait	11,5 \pm 4,9	55,0 \pm 41,2	4
	10% Extrait	7,7 \pm 2,4	30,7 \pm 24,0	4

PM_{ter} (%) = Perte de masse due aux termites ; Cotation visuelle : "0" - Aucune attaque ; "1" - Tentative d'attaque ; "2" - Attaque légère ; "3" - Attaque moyenne ; "4" - Attaque forte.

Le tableau 15 ci-dessus montre qu'après quatre semaines d'exposition aux termites, les pertes de masse varient de 0,78% pour les éprouvettes de *C. edulis* non extraites à 17,38% pour le témoin éthanol de *pin*. Les éprouvettes de *C.edulis* non extraites sont moins dégradées par les termites avec des pertes de masse inférieures à 1% contrairement aux éprouvettes témoins de pin et de hêtre et celles de *C.edulis* ayant subies des extractions préalables. De plus, même après l'extraction des éprouvettes de *C.edulis*, la cotation visuelle varie très peu de 1 à 3 indiquant simplement des tentatives d'attaques des termites. Ces résultats indiquent le rôle important joué par les extractibles dans la durabilité du bois de cœur de *C.edulis* vis-à-vis des termites comme le témoigne clairement les faibles pertes de masse et les faibles taux de survies des termites. En effet l'analyse GC/MS des extraits du bois de cœur de *C.edulis* a montré que ces extraits sont très riches en composés phénoliques tels que l'acide gallique et l'acide ellagique qui sont, en général, des fragments des tannins hydrolysables qui confèrent très souvent aux bois leurs résistances aux termites et à la pourriture des champignons. Des résultats similaires vis-à-vis des champignons et des termites ont été obtenus par [Tahar Elaieb et al \(2019\)](#) lors de l'étude sur la durabilité naturelle de quatre *Eucalyptus Tunisiens spp* et leurs compositions respectives en extractibles, dont les résultats ont montré que les teneurs élevées en acides gallique et ellagique, en glycérides d'acides gras, en esters d'acides gras et en composés phénoliques des quatre extraits *Eucalyptus* conféraient au bois une résistance élevée aux termites et à la pourriture. On constate également dans ce tableau que le traitement apporté par

l'imprégnation des extractibles du bois de cœur dans le *hêtre* et l'aubier de *Pin* améliore légèrement la résistance de ces derniers vis-à-vis des termites. En effet, les dégâts causés par l'attaque des termites sont moins importants sur les éprouvettes imprégnées avec les solutions d'extrait à 10% qu'avec celles imprégnés à 5% comme le témoignent les pertes de masses et les taux de survies enregistrés ainsi que la cotation visuelle enregistrée, même si cette dernière varie peu avec la concentration. Ces résultats viennent compléter, ceux déjà obtenus vis-à-vis des champignons basidiomycètes concernant la bonne durabilité naturelle du duramen de *C.edulis*.

CHAPITRE V
ACTIVITE ANTIFONGIQUE, ANTI-
TERMITE ET ANTIOXYDANTES DES
SUBSTANCES EXTRACTIBLES

CHAPITRE V
ACTIVITE ANTIFONGIQUE, ANTI-TERMITE ET ANTIOXYDANTES DES
SUBSTANCES EXTRACTIBLES

Dans ce chapitre seront présentés les résultats des propriétés antifongiques, anti-termite et antioxydantes des différents extraits de *C.edulis*

V.1. Activité antifongique : effet des extractibles sur la croissance des champignons basidiomycètes

Afin de mieux comprendre les résultats obtenus sur la durabilité naturelle de notre essence et valoriser ses substances extractibles, l'effet des extractibles sur la croissance de trois champignons de pourritures brunes (*Rhodonía placenta*, *Coniophora puteana* et *Gloephyllum trabeum*) et deux champignons de pourritures blanches (*Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*) a été évalué selon la méthode de [Chang et al, 1999](#) avec une légère modification. Pour ces essais, nous avons travaillé avec deux concentrations : 500 ppm et 1000 ppm. Ces résultats sont présentés sous forme de courbes de croissance du mycélium de chaque souche fongique en fonction du temps d'incubation afin de faciliter les interprétations.

❖ **Effet des extractibles sur la croissance des champignons de pourritures brunes**

Les résultats obtenus sur l'effet des extractibles de *C.edulis* sur la croissance de *Rhodonía placenta*, *Coniophora puteana* et *Gloephyllum trabeum* sont présentés dans les figures 61, 62 et 63 respectivement.

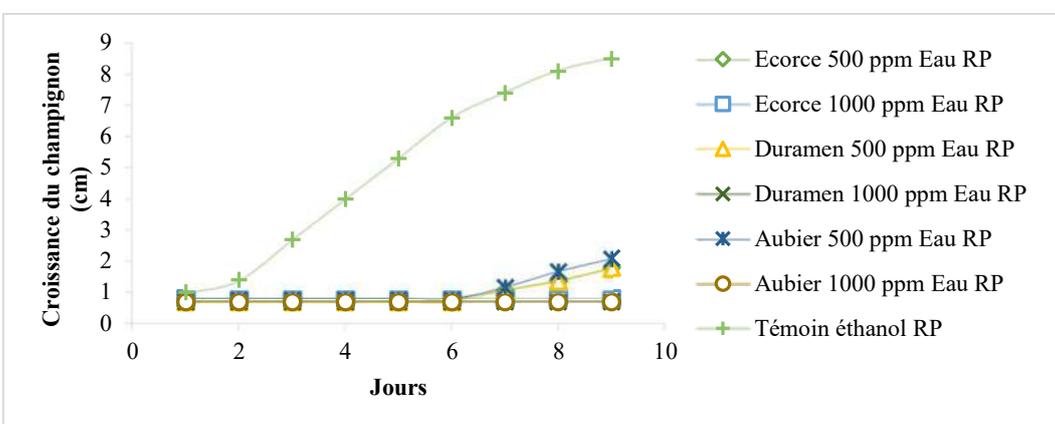
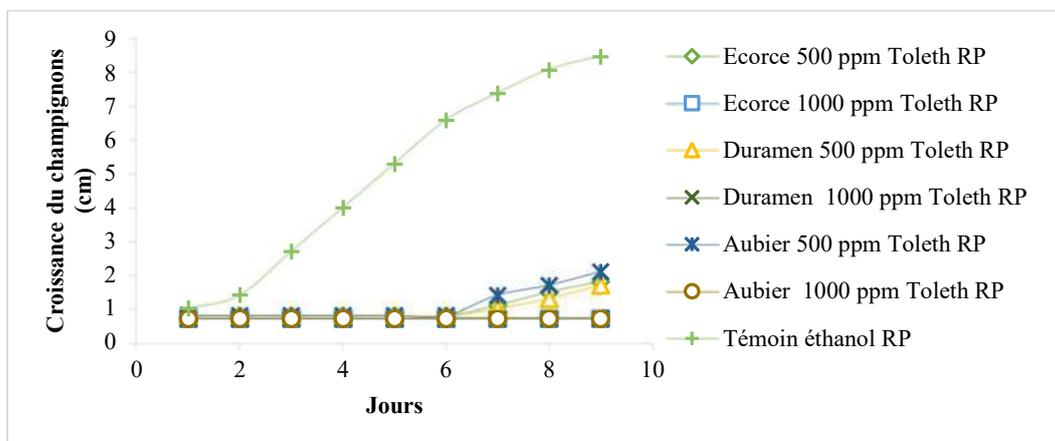
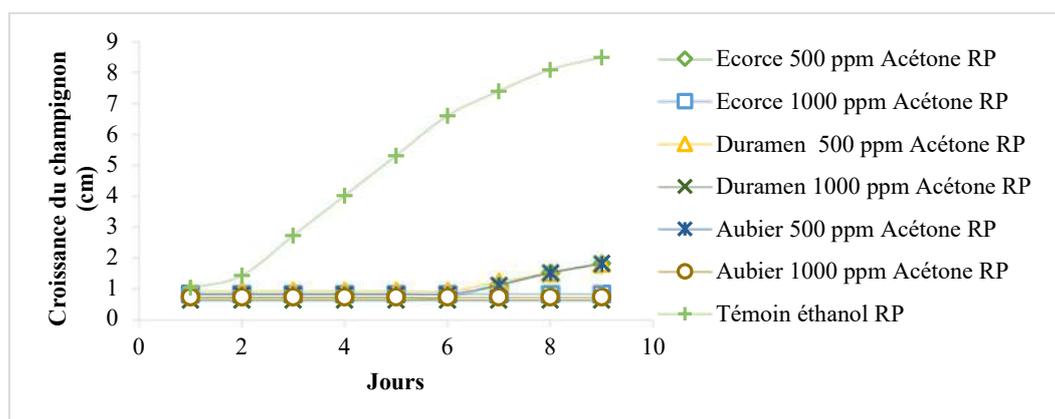
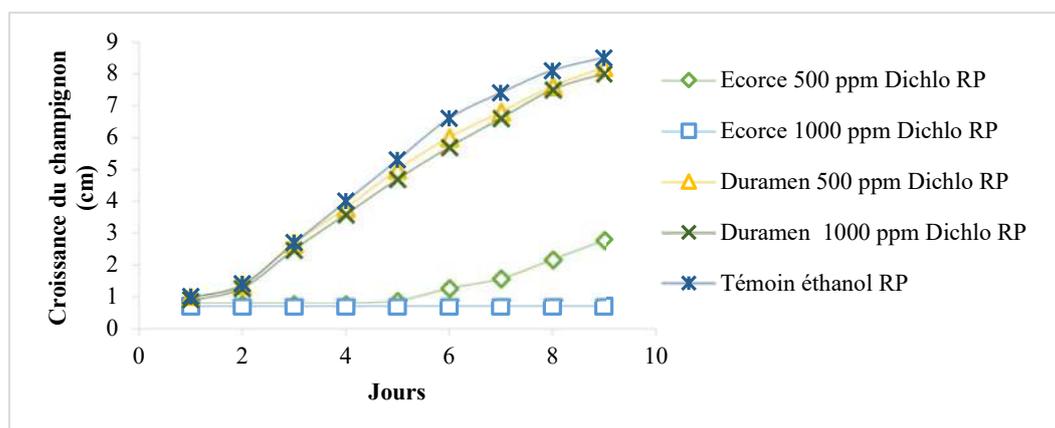


Figure 61: Effet des extractibles sur la croissance de *Rhodonia placenta*

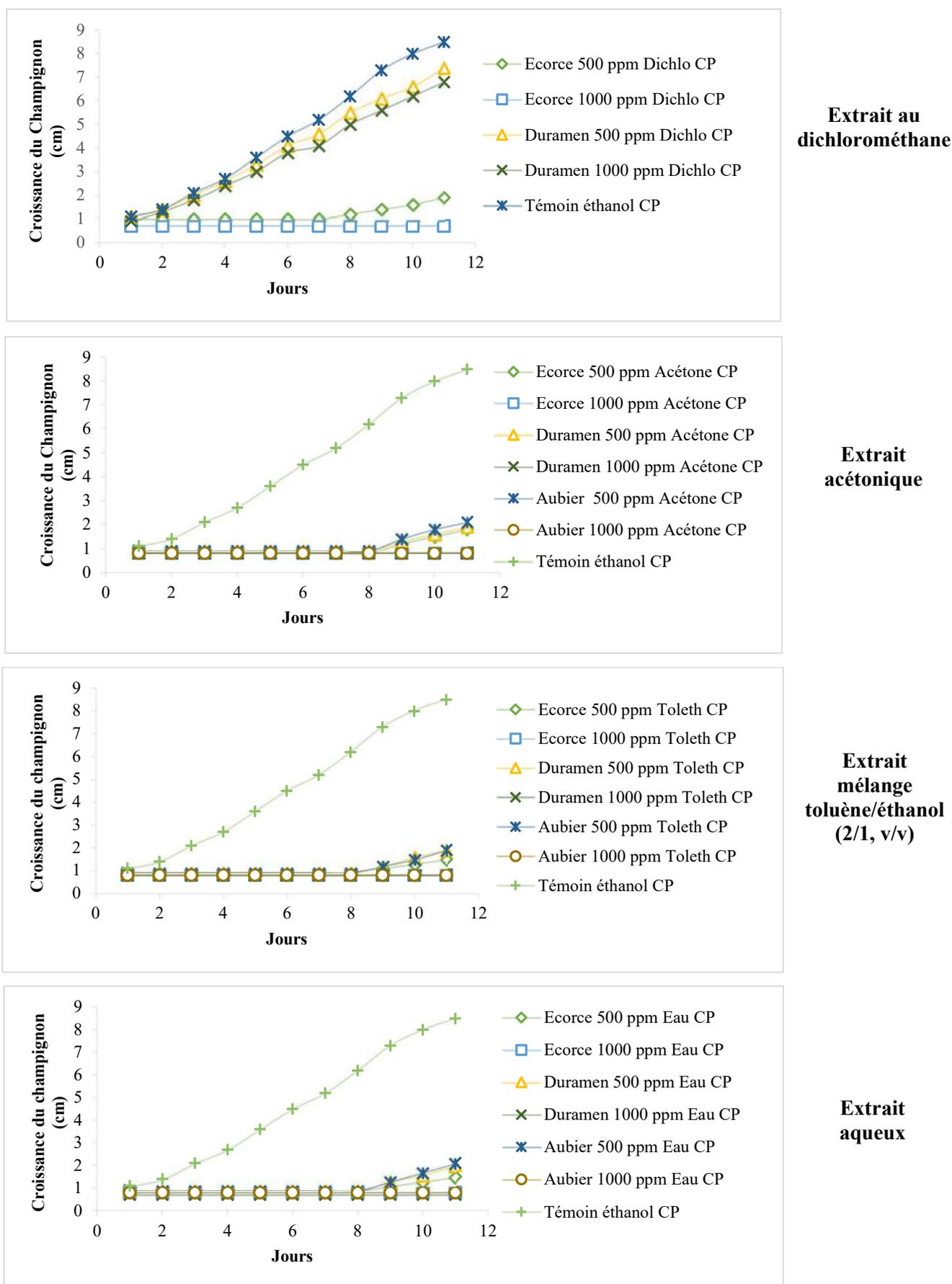


Figure 62: Effet des extractibles sur la croissance de *Coniophora puteana*

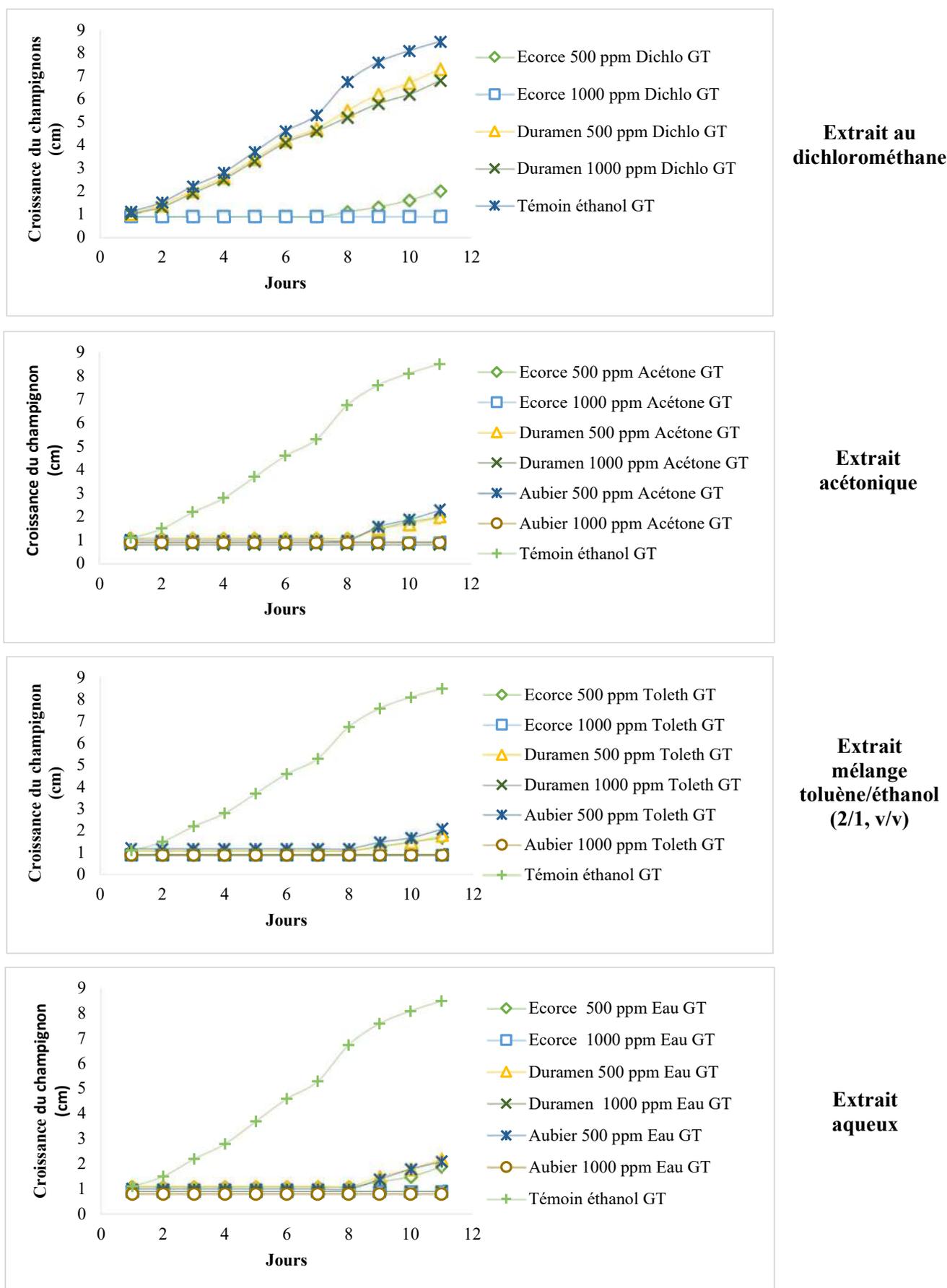


Figure 63: Effet des extractibles sur la croissance de *Gloeophyllum trabeum*

❖ **Effet des extractibles sur la croissance des champignons de pourritures blanches**

Les résultats obtenus sur l'effet des extractibles de *C.edulis* sur la croissance de *Trametes versicolor* et *Pycnoporus sanguineus* sont présentés respectivement dans les figures 64 et 65.

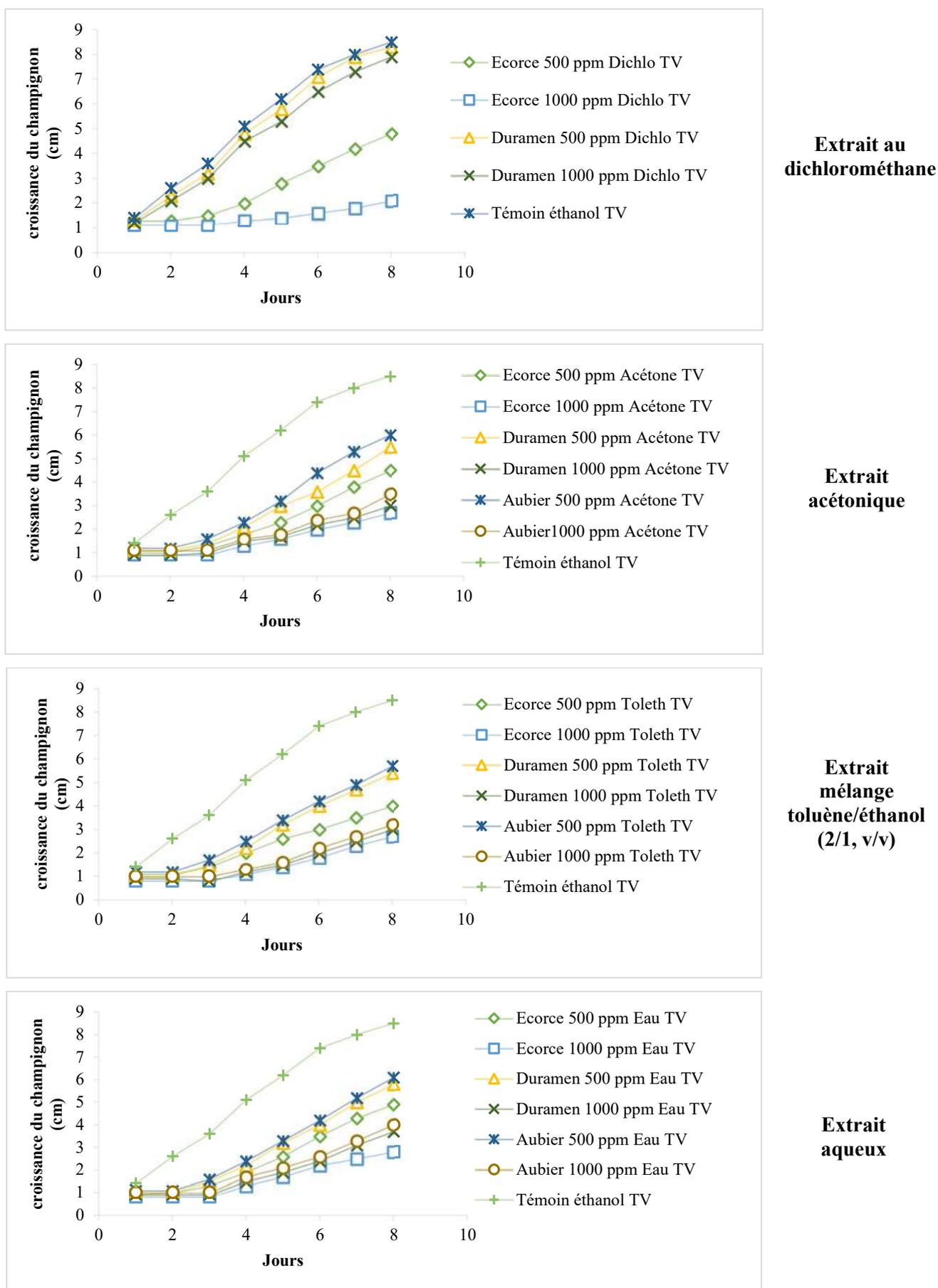


Figure 64: Effet des extractibles sur la croissance de *Trametes versicolor*

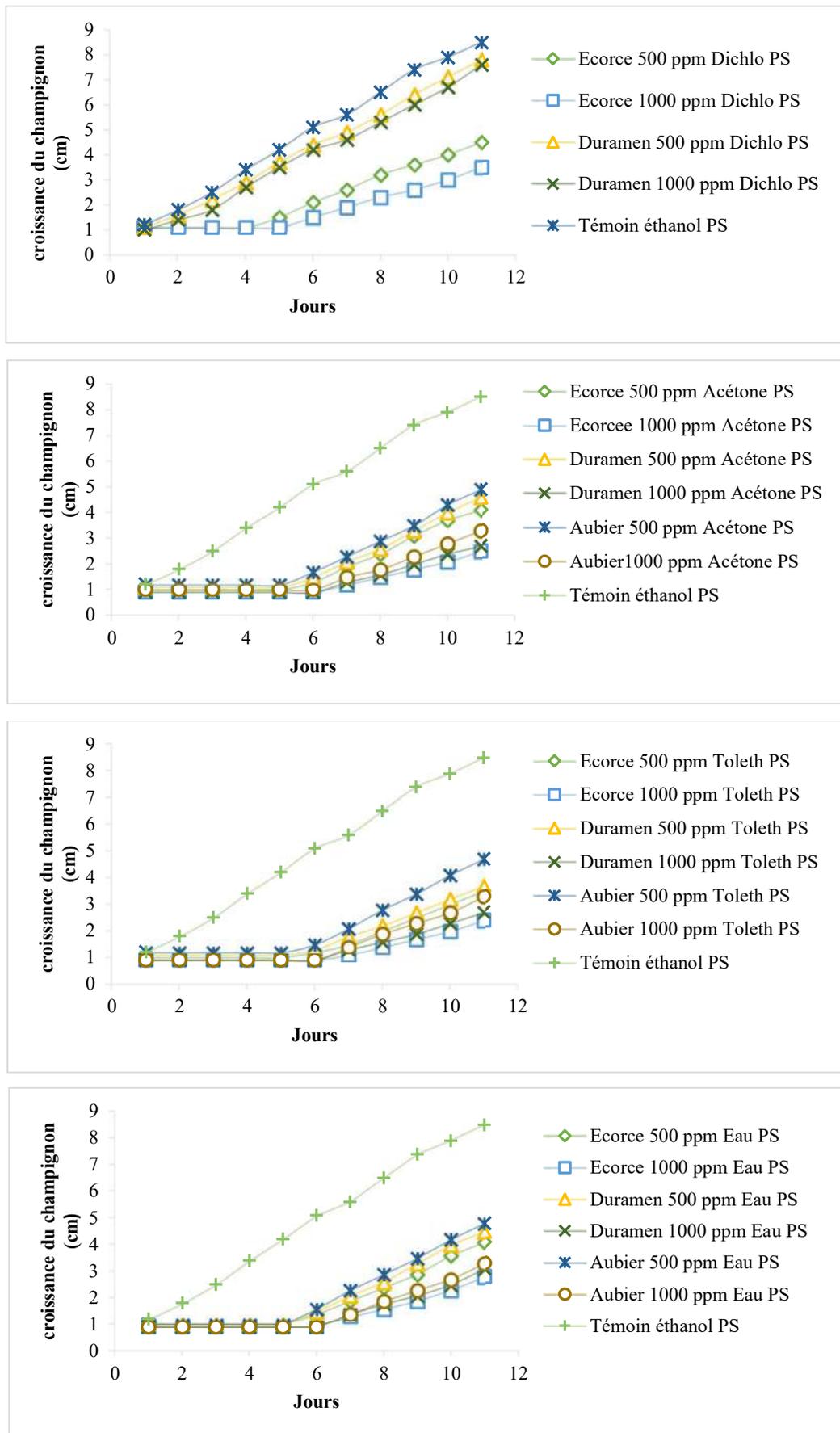


Figure 65: Effet des extractibles sur la croissance de *Pycnoporus sanguineus*

En observant les figures 61,62 et 63, il ressort en général que l'extrait au dichlorométhane du duramen de *C.edulis* a très peu d'effet sur la croissance de *R. placenta*, *C. puteana* et *G. trabeum*. A l'inverse les extraits au dichlorométhane de l'écorce montrent un effet fongistatique sur la croissance des champignons à 500 ppm et un effet fongicide à 1000 ppm comme le témoigne les cinétiques de croissance journalière mesurées. L'extrait au dichlorométhane à 500 ppm de l'écorce de *C.edulis* ralentit la croissance de *R. placenta* qui ne démarre véritablement qu'à partir du sixième jour. En revanche, avec *C. puteana* la croissance démarre le huitième jour et avec *G. trabeum* le neuvième jour alors que la croissance de tous ces champignons dans les boîtes témoins intervient 48 heures après le lancement des essais. A 1000 ppm, l'extrait d'écorce au dichlorométhane inhibe totalement la croissance des champignons. Par contre les extraits obtenus avec l'acétone, le mélange toluène/éthanol (2/1, v/v) et l'eau des autres parties de *C.edulis* (écorce, duramen et aubier) ont tous un effet fongistatique plus important sur ces champignons que celui de l'extrait au dichlorométhane de l'écorce à 500 ppm et un effet fongicide à 1000 ppm. Avec tous ces extraits, à 500 ppm, la croissance de *R. placenta* ne commence véritablement que le septième jour, le neuvième jour avec *C. puteana* et *G. trabeum* tandis que la croissance de tous ces champignons dans les boîtes témoins intervient 24 heures après le lancement des essais. A 1000 ppm, ces extraits inhibent aussi totalement la croissance de ces champignons. Avec les champignons de pourritures blanches (Figure 64 et 65), les extraits au dichlorométhane du duramen de *C.edulis* présentent peu d'effet sur la croissance de *Trametes versicolor* et *Pycnoporus sanguineus* contrairement aux extraits dichlorométhane de l'écorce qui ont un effet fongistatique sur la croissance de ces deux champignons à 500 ppm et à 1000 ppm comme le montrent les cinétiques de croissance journalières de ces champignons. Sur ces figures à 500 et à 1000 ppm avec l'extrait au dichlorométhane de l'écorce, la croissance de *T.versicolor* ne commence qu'à partir du troisième jour comme avec les extraits acétoniques, toluène/éthanol (2/1,v/v) et aqueux d'ailleurs. Par contre, avec *P.sanguineus* la croissance commence à partir du cinquième jour avec l'extrait au dichlorométhane de l'écorce à 500 et à 1000 ppm, alors qu'avec les extraits acétoniques, toluène/éthanol et aqueux, elle ne commence qu'à partir du sixième jour à 500 et à 1000 ppm. Dans le même temps, la croissance des témoins commence 48 heures après l'inoculation du champignon. L'analyse de tous ces résultats révèle que les différents extraits de *C.edulis* ont plus d'effet sur la croissance des champignons de pourritures brunes que sur celles des champignons de pourritures blanches. Ceci s'explique par le fait que les pourritures blanches sécrètent des enzymes oxydantes telles que les laccases et les peroxydases capables de dégrader les substances extractibles. Ces enzymes sont capables de métaboliser les composés phénoliques limitant ainsi leur toxicité et donc l'efficacité de

l'extrait pour inhiber la croissance du mycélium (Gochev et Krastanov, 2007). De plus cet effet augmente avec la concentration. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus dans d'autres études de la littérature (Saha-Tchinda et al, 2018 ; Rosdiana et al, 2017 ; Obiang et al, 2016). Les résultats obtenus avec l'extrait au dichlorométhane de l'écorce sont semblables à ceux obtenus par Mburu et al, 2007 lors de ses travaux sur les propriétés fongicides et termicides des extractibles du bois de cœur de *Prunus africana* montrant que l'extrait au dichlorométhane, composé essentiellement de glycosides d'acides triterpéniques comme les acides oléanilique et ursolique, avait une activité élevée sur la croissance de *Coriolus versicolor*, *Poria placenta* et *Aureobasidium pullulans* avec une inhibition totale pour ces trois champignons à 500 ppm.

Les analyses chromatographiques de l'extrait au dichlorométhane de l'écorce de *C.edulis* ont mis en évidence la présence de composés terpéniques comme le stigmastérol et le β -Sitostérol décrits dans la littérature (Bédounguindzi et al, 2020 ; Escalente et al, 2002 ; Becker et al, 2005) pour posséder des propriétés antifongiques et anti-termites pouvant être à l'origine de l'activité de cet extrait. Les phytostérols (β -Sitostérol, stigmastérol) présents dans le bois de *Coula edulis* sont des molécules très importantes qui font partie de la famille des stérols (Lercker et Rodriguez-Estrada, 2000). Ces molécules ont des propriétés biologiques importantes. Les phytostérols sont biogénétiquement et structuralement proches des stéroïdes qui sont biologiquement actifs. De nombreuses études ont montré que les stérols et les alcools triterpéniques ont des propriétés anticancéreuses sur le cancer du côlon, des poumons et de la prostate (Woyengo et al, 2009 ; Awad et al, 2004 ; Smith-Kielland et al, 1996 ; Raicht et al, 1980). Le stigmastérol a des propriétés antidiabétiques, anticancéreuses, antidiarrhéiques et antivirales (Venkata Raman et al, 2012). De plus, le sitostérol est le composé qui représente le mieux les phytostérols, appartenant à la classe des molécules des sterols Liswidowati et al. (2001). L'activité antifongique du sitostérol végétal a également été mise en évidence par Mbambo et al. 2012. Lall et al. (2006) ont constaté que les sitostérols ont une bonne activité inhibitrice contre *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* et *Phytophthora sp. Fung.* Les extraits obtenus par extraction à l'acétone, avec le mélange toluène/éthanol et à l'eau présentent des activités similaires à celles obtenus par Rosdiana et al, (2017) lors de la caractérisation des propriétés antifongiques d'extraits d'écorce de différentes espèces indonésiennes et de nombreuses autres études de la littérature (Mori et al, 1997; Novriyanti et al, 2010; Martinez-Sotres et al, 2012). L'analyse GC/MS de ces extraits a confirmé la présence importante des composés phénoliques tels que l'acide gallique et l'acide ellagique ou la catéchine, bien qu'en faible quantité, qui expliquerait les activités des extraits sur la croissance

des champignons. En effet, les composés phénoliques sont réputés dans la littérature pour affecter les membranes des micro-organismes entraînant des fuites du contenu cytoplasmique (Borges et al, 2013). Le mécanisme d'inhibition dépend de la capacité des fonctions phénoliques à interagir avec les lipoprotéines cellulaires des membranes, provoquant ainsi l'affaiblissement de l'homéostasie cellulaire ionique qui détruit la structure cellulaire (Zabka et Pavela, 2013). A titre indicatif, la figure 66 montre un aspect des observations visuelles effectuées lors des différents essais sur les champignons testés.

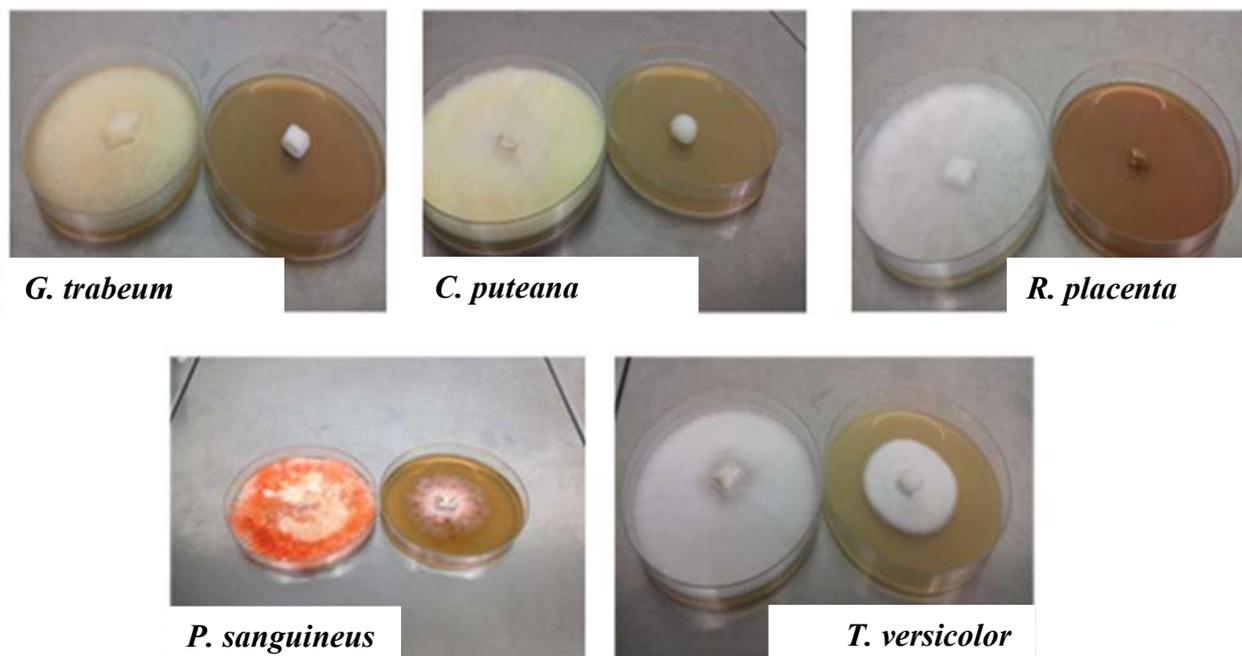


Figure 66: Quelques aspects des observations visuelles effectuées lors des différents essais sur les champignons testés

Afin de vérifier l'effet des acides gallique et ellagique identifiés dans nos extraits sur l'inhibition de la croissance des champignons, des standards d'acide gallique et d'acide ellagique achetés chez Sigma-Aldrich ont été testés dans les mêmes conditions. Compte tenu du temps à notre disposition, les tests avec les standards ont été réalisés uniquement avec quatre champignons : les deux champignons de pourritures blanches *Trametes versicolor* et *Pycnoporus sanguineus* et *Rhodonía placenta* et *Coniophora puteana* pour les champignons de pourritures brunes.

❖ Effet des standards sur la croissance des différents champignons

Les résultats de l'effet des standards obtenus sur la croissance de *Rhodonía placenta*, *Coniophora puteana*, *Trametes versicolor* et *Pycnoporus sanguineus* sont présentés dans les figures 67.

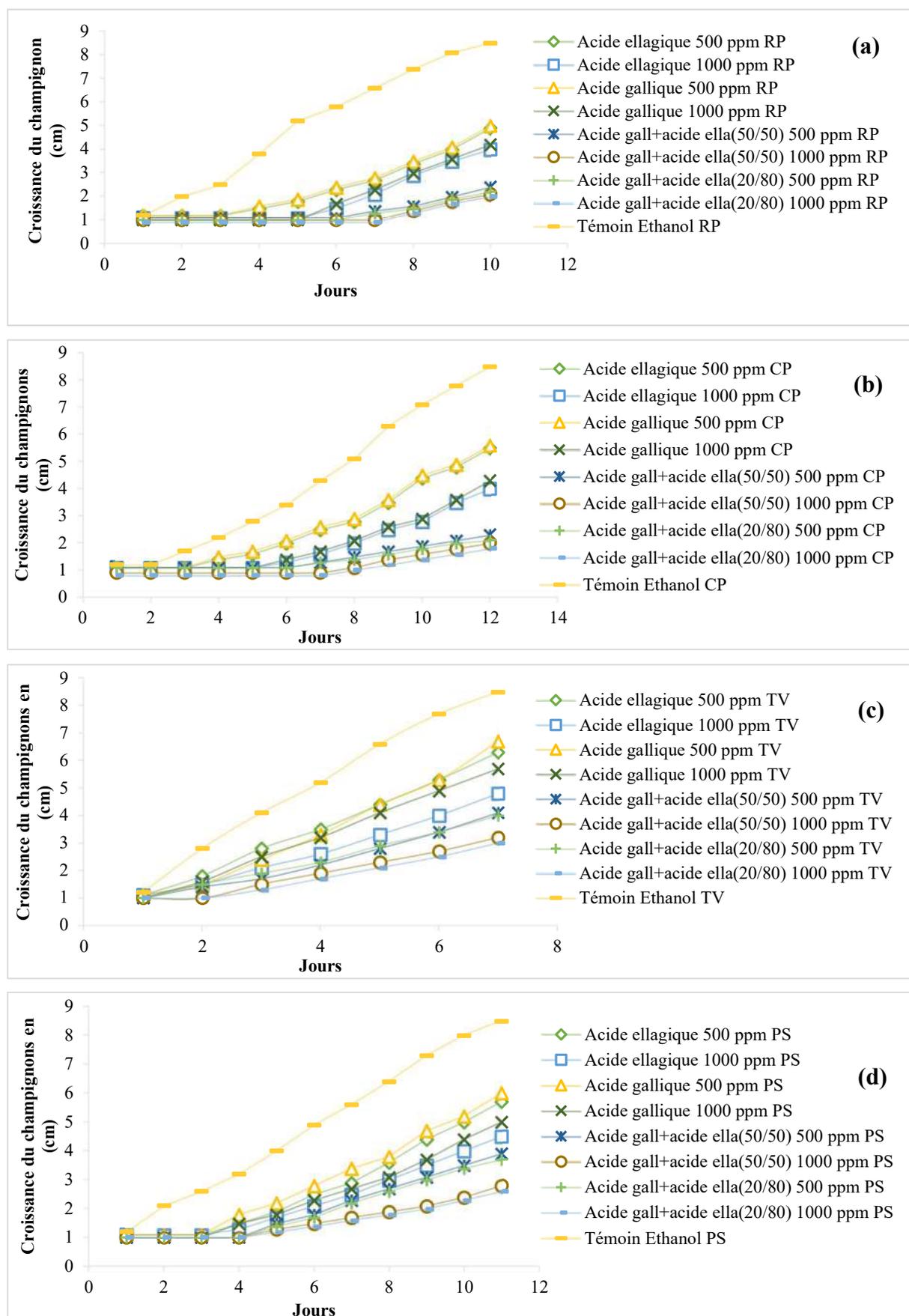


Figure 67: Effet des standards d'acides gallique et ellagique sur la croissance des différents champignons (a) : *R. placenta*, (b) *C. puteana*, (c) *T.versicolor* et (d) *P.sanguineus*

D'après les observations faites sur la figure 67, il ressort clairement que les standards d'acide gallique et d'acide ellagique ont un effet fongistatique sur la croissance des différents champignons. En effet à 500 ppm et à 1000 ppm on remarque très bien que les standards d'acide gallique et d'acide ellagique retardent la croissance journalière des champignons qui ne débute respectivement que les troisièmes et cinquièmes jours avec les champignons de pourritures brunes alors que dans les boîtes témoins la croissance de ces champignons débute 24 ou 48 heures après le lancement des essais selon le champignon. Avec les champignons de pourritures blanches, à 500 ppm et à 1000 ppm, l'effet des standards sur la croissance de *Trametes versicolor* est moins important que sur celle de *Pycnoporus sanguineus* qui ne débute que trois jours après le lancement des essais. Tandis que, dans les boîtes témoins, la croissance de ces champignons commence 24 heures après le lancement des essais. On remarque également que lorsqu'on fait des mélanges de nos standards à différentes concentrations, l'effet fongistatique sur la croissance des champignons augmente suggérant de possibles synergies entre les deux acides. Cet effet fongistatique est plus important chez les champignons de pourritures brunes que sur les champignons de pourritures blanches. L'acide gallique a été signalé pour ses activités antifongiques (Kishino et al. 1995) mais aussi pour son activité anti-termite (Tascioglu et al. 2012). L'acide ellagique s'est révélé modérément actif contre les termites (Mishra et al. 2017). L'acide gallique a été observé chez plusieurs espèces et sa quantité varie considérablement, mais elle est inférieure à celle de l'acide ellagique (Hillis, 1972). Ces deux composés phénoliques peuvent jouer un rôle direct dans la résistance aux champignons. Des essais biologiques *in vitro*, dans des études antérieures, ont confirmé que l'acide gallique et l'acide ellagique inhibaient indépendamment la croissance des champignons *Phytophthora ramorum* (Ockels et al. 2007; McPherson et al. 2014). Ces résultats corroborent parfaitement ceux obtenus plus haut avec nos différents extraits de *C.edulis*. Après l'évaluation des effets antifongiques des différents extraits de *C.edulis* sur l'inhibition de croissance des champignons, des essais de screening rapide ont été réalisés avec les différents extraits sur les termites.

V.2. Effet des extractibles sur les termites *Reticulitermes flavipes*

Toujours dans l'optique de mieux cerner la durabilité naturelle de *C.edulis* et valoriser ses substances extractibles, des essais de screening rapide en laboratoire ont été réalisés au CIRAD pour évaluer les propriétés anti-termites des extractibles. Les mêmes concentrations d'extraits 500 ppm et 1000 ppm ont été testées. 70 µL de solutions d'extraits à différentes concentrations ont été imprégnées sur des papiers filtres Whatman avant exposition de ces derniers aux

termites. Les essais ont été arrêtés lorsque tous les termites ouvriers dans les boîtes témoins sont morts environ (21 jours). Les résultats de ces essais sont consignés dans le tableau 16.

Tableau 16: Activité anti-termite des différentes fractions d'extraits de *C.edulis* vis-à-vis de *Reticulitermes flavipes* (moyenne de 3 essais \pm écart type).

Compartiment	Solvant	Concentration	Taux de survie (%)	Pertes de Masse (%)
Ecorce	Eau	500 ppm	80,0 \pm 2,9	41,6 \pm 2,7
		1000 ppm	71,7 \pm 5,3	37,3 \pm 8,7
	Toluène/Ethanol (2/1, v/v)	500 ppm	65,0 \pm 4,0	28,9 \pm 4,8
		1000 ppm	8,3 \pm 7,6	8,3 \pm 1,8
	Acétone	500 ppm	58,3 \pm 4,6	22,1 \pm 8,1
		1000 ppm	6,6 \pm 7,6	6,7 \pm 1,6
	Dichlorométhane	500 ppm	30,0 \pm 3,0	14,6 \pm 3,3
		1000 ppm	1,7 \pm 2,9	8,6 \pm 2,0
Duramen	Eau	500 ppm	80,0 \pm 5,0	44,2 \pm 4,9
		1000 ppm	68,3 \pm 2,9	37,0 \pm 1,0
	Toluène/Ethanol (2/1, v/v)	500 ppm	56,7 \pm 4,4	22,4 \pm 7,8
		1000 ppm	65,0 \pm 0,0	20,3 \pm 5,8
	Acétone	500 ppm	60,0 \pm 5,0	17,6 \pm 1,2
		1000 ppm	18,3 \pm 6,1	12,1 \pm 6,5
	Dichlorométhane	500 ppm	83,3 \pm 2,9	40,9 \pm 5,0
		1000 ppm	73,3 \pm 2,9	34,6 \pm 0,9
Aubier	Eau	500 ppm	78,3 \pm 7,6	39,4 \pm 5,5
		1000 ppm	83,3 \pm 2,9	33,5 \pm 5,3
	Toluène/Ethanol (2/1, v/v)	500 ppm	90,0 \pm 4,0	29,4 \pm 3,4
		1000 ppm	45,0 \pm 5,0	7,4 \pm 1,1
	Acétone	500 ppm	81,7 \pm 5,4	32,5 \pm 4,8
		1000 ppm	63,3 \pm 3,5	15,2 \pm 1,8
Témoin	Virulence	n.c	70,0 \pm 6,1	37,3 \pm 6,8
	Ethanol	n.c	78,3 \pm 5,9	28,3 \pm 4,3
	Diète	n.c	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

n.c : non concentré

Les résultats obtenus indiquent que l'activité anti-termite varie avec la partie du bois étudiée, le solvant d'extraction et la concentration des extraits utilisés comme souvent rapporté dans la littérature (Andréa et al, 2009). Globalement, de faibles activités anti-termites ont été observées avec les extraits d'aubier et du duramen de *C.edulis* comme le témoignent les forts taux de survie et les différentes pertes de masse des papiers Whatman enregistrées, en dehors de

l'extrait acétonique du duramen qui présente une activité anti-termite légèrement meilleure avec un taux de survie à 18,3% et une perte de masse de papier Whatman de 12,1% à 1000 ppm. A l'inverse, les extraits d'écorce présentent des activités beaucoup plus intéressantes. Les plus fortes activités anti-termites ont été enregistrées avec les extraits d'écorce à 1000 ppm comparativement aux essais réalisés à 500 ppm. En effet, des taux de survie de 30,0 , 58,3 et 65,0% pour des pertes de masse de papier Whatman de 14,6 , 22,1 et 28,9% ont été mesurés à 500 ppm alors que, dans le même temps, des taux de survie de 1,7 , 6,6 et 8,3% pour des pertes de masse de papier Whatman de 8,6 , 6,7 et 8,3% à 1000 ppm respectivement pour les extraits dichlorométhane, acétone et toluène/éthanol (2/1, v/v) étaient enregistrés.

Les analyses antérieures notamment le criblage phytochimique et l'analyse GC/MS des différents extraits de l'écorce de *C.edulis* ont permis d'identifier les composés terpéniques tels que le stigmastérol et le β -sitostérol dans l'extrait au dichlorométhane qui pourrait expliquer la bonne activité anti-termite de cet extrait. En effet, selon les données de la littérature, il a été démontré que les phytostérols possèdent des propriétés toxiques, antifédives et répulsives contre les termites et d'autres insectes (Lajide et al, 1995; Viegas, 2003; Blaske et al, 2003; Park et Shin, 2005; Watanabe et al, 2005). Pour les extraits acétoniques et au mélange toluène/éthanol de l'écorce, les analyses antérieures et précisément l'analyse GC/MS ont permis de mettre en évidence la présence de composés phénoliques comme l'acide gallique et l'acide ellagique, pouvant indiquer la présence de tannins hydrolysables permettant d'expliquer la bonne activité anti-termite de ces extraits. Ces résultats sont corroborés par la littérature qui explique que les tanins, en raison de leurs propriétés de liaison aux protéines et de l'inhibition de plusieurs enzymes digestives, sont connus pour être fortement astringents (Monteiro et al, 2005). Ayres et al, (1997) ont vérifié que la forte mortalité des insectes traités avec des tanins condensés et hydrolysables semble être due aux propriétés toxiques de ces composés et non à l'inhibition de la digestion. De plus le criblage phytochimique a révélé la présence de composés phénoliques comme les flavonoïdes dans ces extraits qui ont un potentiel intéressant comme agents de lutte contre les termites (Simmonds, 2001 ; Ohmura et al, 2000). Selon Ohmura et al. (2000), les flavonoïdes présents dans le bois ont montré de fortes activités de dissuasion alimentaire contre les termites souterrains (*Coptotermes formosanus Shiraki*), et ont suggéré que ces derniers ont des activités anti-germes contre les termites souterrains. D'autres études antérieures ont également signalé l'activité anti-termite des flavonoïdes (Chen et al. 2004; Morimoto et al. 2006) ; il a été démontré que les flavonoïdes, tels que la catéchine, interagissent avec le récepteur de l'ecdysone des termites à l'aide d'un test de gène rapporteur et de lignées

cellulaires sensibles à l'ecdysone (Oberdorster et al. 2001). Compte tenu de la capacité des flavonoïdes à se lier au récepteur de l'ecdysone, les flavonoïdes peuvent affecter d'autres systèmes biologiques chez les termites (Boué et Raina 2003). Ragon et al, (2008) ont émis l'hypothèse que les termites détectaient et évitaient les bois contenant des extraits riches en molécules antioxydantes, car ces derniers pouvaient interférer avec la digestion de la lignocellulose par les symbiotes des termites. Ces résultats expliquent parfaitement l'importance des composés terpéniques et phénoliques dans la résistance du bois aux termites. Dans la littérature, les extraits de bois présentant une très bonne résistance aux termites ont été étudiés pendant de nombreuses années et offrent une certaine garantie en tant que sources de développement d'agents de lutte contre les termites parce qu'ils constituent un réservoir riche en composés bioactifs qui présentent, conjointement ou indépendamment, une toxicité, une dissuasion alimentaire ou une répulsion (Scheffrahn, 1991; Escoubas et al, 1995; Chen et al, 2004). En revanche, le mécanisme exact par lequel les extractibles tuent, dissuadent ou repoussent les termites n'est toujours pas clairement défini. La figure 68 ci-dessous montre l'aspect des observations visuelles effectuées sur les papiers Whatman imprégnés d'extraits lors des différents essais effectués.

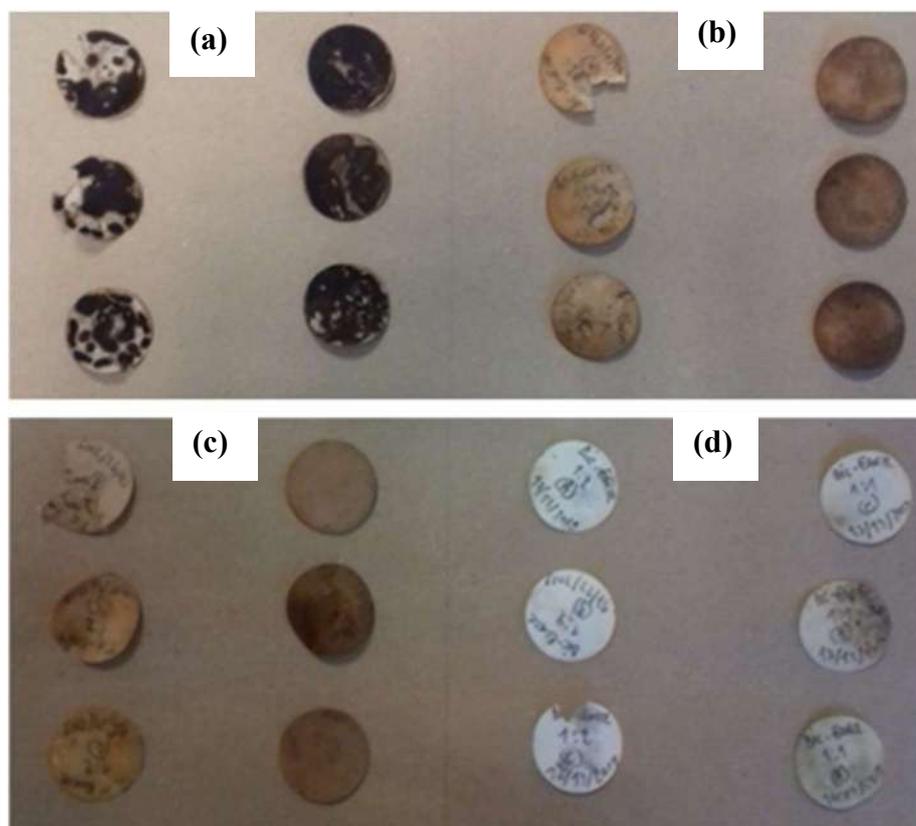


Figure 68: Aspect des papiers Whatman imprégnés d'extraits d'écorce après exposition aux termites. (a) extrait aqueux ; (b) extrait acétone ; (c) extrait toluène/éthanol ; (d) extrait dichlorométhane

V.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extractibles de *C.edulis*

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par deux méthodes. Celle utilisant le radical (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ou DPPH inspirée de la méthode décrite par [Brand-Williams et al, en 1995](#) et celle utilisant le radical cationique 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS⁺ inspirée du protocole de ([Simona P et al, 2008](#)) avec une légère modification. Les tests ont été effectués en triplicat et l'activité antioxydante des extractibles (AA) calculée en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin, puis la concentration efficace (CE₅₀) pour consommer 50% du radical après 30 minutes de réaction déterminée à partir de l'équation de la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons. Les faibles valeurs de CE₅₀ correspondent aux activités antioxydantes les plus élevées. Tous les résultats obtenus avec les deux méthodes sont consignés dans les tableaux 17 et 18 ci-dessous :

Tableau 17: Activités antioxydantes par dosage du radical DPPH

	Test	Ecorce CE ₅₀	Aubier CE ₅₀	Duramen CE ₅₀	Catéchine CE ₅₀	BHT CE ₅₀
Dichlorométhane	DPPH	795,3 ± 0,4	955,4 ± 0,3	1265,1 ± 0,3	3,0 ± 0,2	4,1 ± 0,2
Acétone	DPPH	9,6 ± 0,2	11,4 ± 0,2	8,4 ± 0,4		
Toluène/éthanol	DPPH	10,1 ± 0,4	12,9 ± 0,4	6,6 ± 0,2		
Eau	DPPH	21,1 ± 0,6	27,5 ± 0,2	14,3 ± 0,6		

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± écart-type

CE₅₀ Concentration en ppm

Tableau 18: Activités antioxydantes par dosage du radical ABTS⁺

	Test	Ecorce CE ₅₀	Aubier CE ₅₀	Duramen CE ₅₀	Catéchine CE ₅₀	BHT CE ₅₀
Dichlorométhane	ABTS ⁺	532,8 ± 0,2	730,4 ± 0,5	998,2 ± 0,4	1,05 ± 0,4	2,08 ± 0,2
Acétone	ABTS ⁺	5,6 ± 0,5	6,0 ± 0,3	5,0 ± 0,2		
Toluène/éthanol	ABTS ⁺	7,6 ± 0,2	8,6 ± 0,5	4,0 ± 0,1		
Eau	ABTS ⁺	10,2 ± 0,7	11,1 ± 0,2	9,2 ± 0,3		

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± écart-type

CE₅₀ Concentration en ppm

Globalement, il ressort des tableaux 17 et 18 que la capacité des extraits à éliminer les radicaux libres varie en fonction de la partie du bois étudiée et avec le solvant d'extraction. Tous les extraits au dichlorométhane des différentes parties de notre essence ont une très faible capacité de piégeage des radicaux libres comme le témoigne les concentrations efficaces CE₅₀ élevées avec les radicaux DPPH et ABTS⁺. En revanche, tous les autres extraits ont présenté en générale

une bonne capacité d'inhibition des radicaux libres comme l'indique les valeurs de CE_{50} enregistrées. Les plus fortes valeurs d'activité antioxydante ont été enregistrées avec les extraits acétoniques et au mélange toluène/éthanol du bois de cœur et l'écorce de *C.edulis* qui se rapprochent des valeurs des activités antioxydantes de la catéchine et du BHT, utilisés comme témoin positifs et dont les valeurs de CE_{50} respectives sont de 3,0 et 4,1 avec le DPPH et 1,05 et 2,08% avec l'ABTS⁺. Pour les extraits acétone et toluène/éthanol du bois de cœur de *C.edulis*, les valeurs de concentrations efficaces (CE_{50}) sont respectivement de 8,4 et 6,6% avec le DPPH et 5,0 et 4,0 avec l'ABTS⁺. Avec ceux de l'écorce, les valeurs des concentrations efficaces (CE_{50}) sont de 9,6 et 10,1% avec le DPPH et 5,6 et 7,6% avec l'ABTS⁺. La bonne activité de ces extraits s'expliquerait par la teneur et la nature des composés phénoliques qu'ils renferment. En effet, le rôle crucial des composés phénoliques sur l'activité antioxydante des extraits n'est plus à démontrer (Kawamura et al, 2011). De plus toutes les analyses antérieures et particulièrement les dosages des composés phénoliques et l'analyse GC/MS de ces extractibles ont permis d'identifier des composés phénoliques comme l'acide gallique et l'acide ellagique, qui à l'état libre ou impliqués dans la structure de tannins hydrolysables sont réputés dans la littérature pour leur aptitude à éliminer les radicaux libres. Il est également bien connu que leur propriété d'inhibition des radicaux libres dépend des éléments constitutifs et du degré d'oligomérisation. (Rhouma-Martin, 2013). Ce qui suggère leur potentiel à ralentir le processus de dégradation du bois en éliminant les radicaux libres produits par les enzymes fongiques extracellulaires corroborant par la même occasion les résultats sur l'activité antifongique de ces extraits. De plus le criblage phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes dans ces extractibles, qui sont connus dans la littérature comme des antioxydants de haut niveau en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres tels que l'oxygène singulet, les radicaux libres superoxydes et les radicaux hydroxyles (Tremel et Šmejkal, 2016). Ils sont également connus pour chélater les oligo-éléments impliqués dans la production de radicaux libres et réguler positivement les défenses antioxydantes (Agati et al, 2012).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Il était question dans ce travail de thèse de valoriser le bois de *C. edulis*. Pour cela, la variabilité intra-arbre de la composition chimique de ses constituants pariétaux a été étudiée. Sa durabilité naturelle vis-à-vis des champignons et des termites a également été étudiée. Ses substances extractibles ont été caractérisées et analysées puis la possibilité de leurs valorisations potentielles comme sources de développement de produits antifongiques, anti-termites et antioxydantes a été explorée. Les résultats ont révélé, s'agissant de l'étude de la variabilité intra-arbre de la composition chimique (constituants pariétaux et extractibles), que globalement, seule la teneur en extractible varie considérablement radialement et axialement. En revanche celle de la composition chimique des constituants pariétaux est demeurée relativement faible, avec une légère diminution de la teneur de ces derniers vers le haut. Aucune différence significative de la composition chimique n'a été observée entre les différents rondins.

Les résultats sur la quantification des substances extractibles ont montré que la teneur en extraits varie avec la partie de l'essence étudiée, le solvant et la méthode d'extraction utilisée. Les taux d'extraits au niveau de l'écorce sont plus élevés que dans le duramen et l'aubier. L'analyse infrarouge des extraits a révélé la présence de composés comme les cires, les graisses et les terpènes dans les extraits au dichlorométhane de l'écorce, l'aubier et duramen de *C. edulis* caractérisés par les pics des vibrations d'élongation des CH₂ et CH₃ et le pic de la vibration l'élongation du groupe C=O présents dans ces composés. Dans les extraits acétone, toluène/éthanol (2/1,v/v) et aqueux, l'analyse infrarouge a indiqué la présence de composés phénoliques caractérisés par la forte bande d'absorption correspondant à la vibration d'élongation de la liaison -OH des structures aromatiques et aliphatiques. Les fortes bandes d'absorption caractéristiques des vibrations d'élongation des liaisons C=C du cycle aromatique, qui peuvent être attribuées à des composés aromatiques tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les lignanes ou d'autres comme les tanins. Les bandes d'absorption attribuables aux vibrations d'élongation d'étirement C-O-C trouvées dans des composés tels que les flavonoïdes. Les résultats du criblage phytochimique ont corroborés ceux obtenus lors des analyses infrarouges des extractibles en indiquant clairement la présence de plusieurs groupes de molécules comme les polyphénols, les flavonoïdes et les saponines dans les extraits acétoniques, au mélange toluène/éthanol (2/1,v/v) et aqueux des différentes parties de notre essence. Les alcaloïdes ont été détectés dans les extraits au mélange toluène/éthanol (2/1,v/v) et aqueux des différentes parties de *C. edulis* et dans l'extrait acétonique de l'écorce. Les stérols et terpènes ont été identifiés dans les extraits au dichlorométhane (sauf dans les extraits au

dichlorométhane du duramen) de l'écorce et l'aubier et mélange toluène/éthanol (2/1,v/v) et dans l'extrait acétonique de l'écorce.

Les résultats obtenus sur le dosage des phénols totaux, des tannins et les flavonoïdes ont révélé des teneurs plus ou moins importantes de ces classes de molécules qui varient pour les phénols totaux avec la partie de l'essence étudiée, le solvant et la méthode. Pour les tannins et les flavonoïdes, elle varie avec le solvant et la partie de l'essence étudiée également. Il ressort de ces résultats que les extraits acétonique renferment globalement les plus fortes teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes. L'analyse GC/MS des extractibles a permis d'identifier différents composés dans les extraits. Dans les extraits au dichlorométhane de l'écorce et de l'aubier, l'analyse GC/MS a permis d'identifier de nombreux acides tels que l'acide hexadécanoïque et l'acide trans-9-Octadécenoïque mais surtout le stigmastérol et le β -Sitostérol comme composés majoritaire de ces extraits. L'analyse des extraits au dichlorométhane du duramen n'a permis d'identifier majoritairement que des acides comme l'acide hexacosanoïque, l'acide tétracosanoïque et l'acide docosanoïque. Par contre l'analyses des extraits acétoniques et celui au mélange toluène/éthanol (2/1, v/v) des différentes parties de *C.edulis* a permis d'identifier une variété de composés comme des sucres. Les acides gras comme l'acide hexadécanoïque et l'acide stéarique, mais surtout des composés phénoliques comme l'acide gallique, l'acide ellagique comme composés majoritaires et de la catéchine bien qu'en faible quantité.

Le bois de *C.edulis* a montré une très bonne résistance vis-à-vis des champignons et des termites *Reticulitermes flavipes*. Avec les champignons après seize semaines d'exposition les pertes de masse de toutes les éprouvettes de bois de cœur non extraits de *C. edulis* sont inférieures à 2%, quel que soit le champignon utilisé contrairement à celle extraites dont les pertes de masse obtenues sont comprises entre 10,8 et 19,8% selon le champignon. Le bois de *C.edulis* est plus dégradé par les champignons de pourritures blanches que par les champignons de pourritures brunes. Avec les termites *Reticulitermes flavipes* après quatre semaines d'exposition, les pertes de masse de toutes les éprouvettes de bois de cœur non extraits de *C. edulis* sont inférieures à 1% contrairement à celles extraites 4,5%. Tous ces résultats confirment le rôle essentiel joué par les extractibles sur la durabilité naturelle de notre essence. Ces extraits ont indiqué des propriétés antifongiques intéressantes sur la croissance des différents champignons. En effet les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'effet des extraits sur les champignons ont montré que l'extrait au dichlorométhane de l'écorce de *C.edulis* a un effet fongistaque sur la croissance des champignons de pourritures brunes à 500 ppm et un effet fongicide à 1000 ppm. Avec les

champignons de pourritures blanches, ces extraits ont eu un effet fongistatique à 500 ppm et à 1000 ppm. En revanche les extraits acétonique, au mélange toluène/éthanol (2/1,v/v) et aqueux ont eu un effet fongistatique important à 500 ppm sur les champignons de pourritures brunes et un effet fongicide à 1000 ppm sur ces mêmes champignons. Avec les champignons de pourriture blanches, tous ces extraits ont eu un effet fongistatique à 500ppm et à 1000ppm. Il a également été constaté que l'effet des extraits sur la croissance des champignons augmentait avec la concentration. De plus, l'effet des extraits a été plus important sur les champignons de pourritures brunes que sur les pourritures blanches. Les résultats obtenus avec les standards d'acide gallique et d'acide ellagique ont corroborés ces résultats. Les résultats obtenus avec les termites ont montré que l'activité anti-termite varie avec la partie du bois étudiée, le solvant d'extraction et la concentration des extraits utilisés. En effet les plus faibles activités anti-termites ont été enregistrées avec les extraits d'aubier et du duramen de *C.edulis*. En revanche les plus fortes activités anti-termites ont été enregistrées avec les extraits au dichlorométhane, acétoniques et ceux au mélange toluène/éthanol (2/1,v/v) de l'écorce de notre essence avec des taux de survie de 30 ; 58,3 et 65% pour des pertes de masse de papier Whatman de 14,6 ; 22,1 et 28,9% à 500 ppm et des taux de survie de 1,7 ; 6,6 et 8,3% pour des pertes de masse de papier Whatman de 8,6 ;6,7 et 8,3% à 1000 ppm respectivement pour les extraits au dichlorométhane, acétoniques et ceux au mélange toluène/éthanol (2/1, v/v). Il a également été constaté que l'effet des extraits sur les termites augmente avec la concentration. S'agissant de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits, les résultats ont montré que tous les extraits pouvaient piéger les radicaux libres. Les plus fortes valeurs d'activité antioxydante ont été enregistrées avec les extraits acétoniques et au mélange toluène/éthanol (2/1,v/v) de l'écorce mais surtout avec le bois de cœur de *C.edulis* qui se rapprochent des valeurs des activités antioxydantes de la catéchine et du BHT, utilisés comme les témoins positifs. Ces extraits présentent un réel potentiel en tant qu'agents antioxydants.

Tous ces résultats permettent d'affirmer aujourd'hui que la valorisation des différents extraits du noisetier du Gabon comme source de développement d'agents antifongiques, anti-termites et antioxydants dans des domaines comme l'agroalimentaire, la cosmétique et bien d'autres permettraient non seulement une utilisation optimale de son bois mais également donneraient une forte valeur ajoutée à l'exploitation de son bois. Les extraits pouvant être obtenus à partir des connexes de la transformation du bois.

Les résultats obtenus lors de ce travail ont d'ores et déjà conduit à la rédaction d'un article et d'un proceeding lors de la conférence scientifique annuelle de IRG sur la protection du bois à Québec, au Canada en Mai 2019.

- ❖ **Bopenga Bopenga CSA, Dumarçay S, Edou Engonga P, Gérardin P (2020)** Relationships between chemical composition and decay durability of *Coula edulis Baill* as an alternative wood species in Gabon. Wood Science and Technology. <https://doi.org/10.1007/s00226-020-01158-5>. (Annexe).
- ❖ **Bopenga Bopenga CSA, Dumarçay S, Edou Engonga P, Gérardin P (2019)** *Coula edulis baill* an unknown wood species as an alternative to the main durable wood species used in Gabon. Paper prepared for the IRG50 Scientific Conference on Wood Protection, Quebec, Canada 12-16 May 2019. (Annexe).

Bien que les résultats obtenus pendant ce travail de thèse aient permis la rédaction de deux articles, dont un déjà publié et l'autre en soumission ainsi que la présentation d'un proceeding, il reste encore beaucoup de points à explorer dans cette étude.

PERSPECTIVES

Pour la suite de ces travaux, il serait intéressant de :

- ❖ Poursuivre avec l'étude des propriétés de durabilité naturelle du bois de *C.edulis* et de durabilité conférée par les extraits avec des essais de champs ;
- ❖ D'évaluer les propriétés antibactériennes et tyrosinases des extraits ;
- ❖ D'intensifier les techniques de caractérisations et d'analyses des extractibles avec notamment des analyses LC/MS, Maldi-tof-MS ;
- ❖ D'isoler les composés responsables des activités antifongiques, termiticides et antioxydantes des extraits en vue de leur valorisation comme agents antifongique, anti-termite et antioxydant en collaboration avec des industries et de confirmer l'origine des activités mesurées dans notre étude ;
- ❖ D'étudier plus en détail les possibilités offertes par des mélange acide gallique /acide ellagique pour la formulation de produits de traitement du bois ;
- ❖ Enfin étendre ce genre d'études sur d'autres essences tropicales, et celles du Gabon particulièrement, dans le but de leur vulgarisation mais aussi pour l'enrichissement des

données bibliographiques des essences tropicales afin d'être des outils d'aide à la prise de décisions des autorités.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adam J.G (1971). *Flore descriptive des Monts Nimba*. Muséum national d'histoire naturelle, Paris, France.

Adler E (1977). Lignin chemistry : Past, present and future. *Wood Sci. Technology* 11 : 169-218.

Adriaens E.L (1951). *Les Oléagineux du Congo Belge*. 2^{ème} édition. Ministère des Colonies, Bruxelles, Belgique.

Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci* 196: 67-76.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>.

Ageos (2016). Report on the state of satellite coverage of the Gabonese forest heritage.

Akinjogunla O.J., Yah C.S., Eghafona N.O., Ogbemudia F.O (2010). Antibacterial activity of leave extracts of *Nymphaea lotus* (*Nymphaeaceae*) on *Methicillin* resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Vancomycin* resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) isolated from clinical samples. *Annals of Biological Research* 1:174-184.

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 Roh Werkst* 62:286-290.

Altarejos J., Salido S., Perez-Bonilla M., Linares-Palomino P.J., Van Beek T.A., Nogueras M., Sanchez A (2005). Preliminary assay on the radical scavenging activity of the olive wood extracts. *Fetoterapia*, 76: 348-351.

Amarowicz R., Dykes G.A., Pegg R.B (2008). Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia*. 79(3): 217-219.

Amusant N., Moretti C., Richard B., Prost E., Nuzillard M., Thévenon M.F (2007) Chemical compounds from *Eperuafalcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). *Holz Roh Werkst* 65:23-28.

Andre'a L.B.D., Claudia Maranhão A., C Santos J., M Cunha F., M Conceição G., W Bieber L., S Nascimento M (2009). Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64 : 7-12.

Anouhe J.B.S., Bobelé Niamké F., Milcard F., Virieux D., Pirat J.L., Amissa Adima A., Kati-Coulibaly S., Amusant N (2018). The role of extractives in the natural durability of the heartwood of *Dicorynia guianensis* Amsh: new insights in antioxydant and antifungal properties. *Annals of Forest Science* (2018) 75:15. <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0691-0>

Antwi-Boasiako C., Barnett J.R., Pitman A.J (2010). Relationship between total extractive content and durability of three tropical hardwoods exposed to *Coriolus versicolor* (Linnaeus) Quelet. *J Indian Acad Wood Sci* 7:9-13.

Antwi-Boasiako C., Pitman A.J (2009) Influence of density on the durabilities of three Ghanaian timbers. *J Sci Technol* 29:34-45.

Arima H., Ashida H., Danno G (2002). Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66 (5), 1009-1014.

Arrabal C., Cortijo M., Fernandez de Simon B., Concepción Garcia-Vallejo M., Cadahia E (2002). *Pinus pinaster* Oleoresin in Plus Trees. *Holzforschung* 56, 261-266.

Awad, A.B., Toczek J., Fink C.S (2004). Phytosterols decrease prostaglandin release in culture P388D1/MAB macrophages/ Prostaglandins Leukot/ Essent. Fatty Acids (70): 511-520.

Ayres M.P., Clausen T.P., MacLean S.F., Redman A.M., Reichardt P.B (1997). Diversity of structure and anti-herbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 78 : 1696-1712.

Bamber R.K., Fuzakawa K (1985). Sapwood and heartwood : a review. *For. Prod. Abstract.* 8(9), 265-312.

Becker H., Scher J.M., Speakman J.B., Zapp J (2005). Bio-activity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*, *Fitoterapia* 76 : 580-584.

Bédounguidzi W.F., Candelier K., Edou Engonga P., Durmarçay S., Thévenon M.F., Gérardin P (2020). Anti-termite and anti-fungal bio-sourced wood preservation ingredients from *Dacryodes edulis* (G,Don) H.J. Lam resin.

Bendtsen B.A (1978). Properties of wood from improved and intensively managed trees. *Forest Prod. J.* 28: 61-72.

Benzie I.F.F., Strain J.J (1999). Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299: 15-27.

Bhat K.M., Thulasidas P.K., Maria Florence E.J., Jayaraman K (2005). Wood durability of home-garden teak against brown-rot and white-rot fungi. *Trees* 19, 654 - 660.

Blanchette R.A., Nilsson T., Daniel G., Abad A (1990). Biological degradation of Wood. In: Rowell, R M, Barbour, R J (Eds.), *Advances in Chemistry*, 225(6), 141-174 <http://dx.doi.org/10.1021/ba-1990-0225.ch006>.

Blaske V.U., Hertel H., Forschler B.T (2003). Repellent effects of isoborneol on subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in soils of different composition. *Household and Structural Insects* 96 :1267-1274.

Borges A., Ferreira C., Saavedra M.J., Simoes M (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist* 19:256-265.

Boué, S.M., Raina, A.K (2003). Effects of plant flavonoids on fecundity, survival, and feeding of the Formosan subterranean termite. *J. Chem. Ecol.* 29:2575–2584.

Bouslimi, B., Koubaa, A., Bergeron, Y (2014). Effects of biodegradation by brown-rot decay on selected wood properties in eastern white cedar (*Thuja occidentalis L.*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87(2014), 87-98.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28: 25-30.

Breza J., Dzurny O., Borowka A., Hanus T., Petrik R., Blane G., Chadha-Boreham H., Autet W (1998). Efficacy and acceptability of *Tadenan* (*Pygeum africanum* extract) in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH): A multicentre trial in central Europe. *Current Medical Research and Opinion* 14 (3), 127 - 139.

Broadhurst R.B., Jones W.T (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* 29, 788–94.

Bukola C.A.T., Kola A (2008). Antimicrobial activities of *Coula edulis*. *Res. J. Med. Plant*, 2: 86- 91.

Candelier K., Dumarçay S., Pétrissans A., Gérardin P., Pétrissans M (2013). Comparison of mechanical properties of heat-treated wood cured under nitrogen or vacuum. *Polym. Degrad. Stab.* 98:1762-1765.

Cao G.H., Alessio H.M., Cutler R.G (1993). Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for antioxydants. *Free Radical Biology and Medecine*, 14: 303-311.

Carrillo-Parra A., Rosales M., Wehenkel C., Foroughbakhch R., González H., Garza F (2012). Phenols and flavonoids concentration and fungistatic activity of wood and bark of five common tropical species. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15. 621–628.

Castillo L., Rossini C (2010). Bignoniaceae Metabolites as Semiochemicals. *Molecules*, 15: 7090-7105.

Catalano S., Ferretti M., Marsili A., Morelli I (1984). New constituents of *Prunus africana* bark extract. *Journal of Natural Products*, 47 (5) 910.

Celimene C.C., Micales J.A., Ferge L., Young R.A (1999). Efficacy of *Pinosylvins* against White-Rot and Brown-Rot Fungi. *Holzforschung* 53, 491–497.

Chang S.T., Wang S.Y., Wu C.L., Su Y.C., Kuo Y.H (1999). Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides hayata*) heartwood. *Holzforschung* 53:487-490.

Chen K., Ohmura W., Doi S., Aoyama M (2004). Termite feeding deterrent from Japanese larch wood. *Bioresour. Technol.* 95 : 129-134.

Cheumani Y.A.M (2009). Étude de la microstructure des composites bois/ciment par relaxométrie RMN du proton. Thèse de l'Université de Bordeaux 1 (France). 171 pp.

Cirad (2008). Technical sheet for *Coula edulis*. File n° 197. In : Gérard J, Guibal D, Beauchêne J, et al. Tropix 6.0. Technological characteristics of 245 tropical species. Montpellier, France : Cirad.

Claassen F.W., Van de Haar C., Van Beek T.A., Dorado J., Martinez-Inigo M. J., Sierra-Alvarez R (2000). Rapid Analysis of Apolar Low Molecular Weight Constituents in Wood Using High Pressure Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *Phytochemical Analysis* 11, 251–256.

Colling C (2002). Les champignons du bois. www.transdata.fr/bois/documents/champignons.

COMIFAC Les forêts du bassin du Congo - Etat des Forêts (2010) de Wasseige C., de Marcken P., Bayol N., HiolHiol F., Mayaux Ph., Desclée B., Nasi R., Billand A., Defourny P., Eba'a R (2012). (Eds) Office des publications de l'Union Européenne. Luxembourg. doi:[10.2788/48830](https://doi.org/10.2788/48830) 276 p. ISBN : 978-92-79-22717-2.

CTFT (1962). Les résultats des observations et des essais effectués au Centre Technique Forestier Tropical sur le *Coula* (*Coula edulis* Baill.-Olacacée). Information technique n°150, Nogent S/Marne, France.

Debell J.D., Morrell J.J., Gartner B.L (1999). Within-stem variation in tropolone content and decay resistance of second-growth western redcedar. *For.Sci.*45(2):101-107.

Derbyshire H., Miller, E.R (1981). The photodegradation of wood during solar irradiation. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 39(8), 341-350.

Diouf P.N., Delbarre N., Perrin D., Gérardin P., Rapin C., Jacquot J.P, Gelhaye E (2002). Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation. *Appl. Environ. Microbiol* 68:4377-4382.

Dirol D., Deglise X (2001). Mécanique et Ingénierie des Matériaux. Durabilité des bois. Hermes Sciences. Paris.

Dweck A (2002). Natural ingredients for colouring and styling. *International Journal of Cosmetic Science* 24, 287-302.

Eka N., Erdy S., Wasrin S., Maman T., Irnayuli R.S (2010). Antifungal activity of wood extract of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte against agarwood-inducing fungi, *fusarium solani*. *Journal of Forestry Research* 2:155-165.

EN 113 (1996): Wood preservatives determination of toxic values of wood preservatives against wood destroying basidiomycetes cultured on agar medium.

EN 117 (1990): Produit de préservation des bois - Détermination du seuil d'efficacité (*reticulitermes santonensis*) de Feytaud - (méthodes de laboratoire).

EN 350-1 (1996) : Durability and wood-bases products-Testing and classification of durability to biological agent of wood and wood-based materiels.

Ericksson K.E.L., Blanchette R.A., Ander P (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 407 p.

Escalente M.A., Santecchia C.B., Lopez S.N., Gattuso M.A., Ravelo A.G., Monache F.D, Sierra M.G., Zacchino S.A (2002). Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in citric risk. *J. Ethnopharmacol.* 82 :29-34.

Escoubas P., Lajide L., Mizutani J (1995). Termite antifeedant activity in *Afromomum melegueta*. *Phytochemistry* 40 :1097-1099.

Eslyn W.E., Bultman J.D., Jurd L (1981). Wood decay inhibition by tropical hardwood extractives and related compounds. *Phytopathology* 71:521-524.

Etheridge D.E (1962). Selective action of fungus-inhibitory properties of balsam fir heartwood. *Can. J. Bot.* 40:1459-1462.

Fagbohoun L (2014). Etude chimique de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels du benin dans le domaine artisanal. Thèse en cotutelle entre l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin) et l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France).

Feist W.C., Hon, D.N.S (1984). Chemistry of Weathering and Protection. in: *The Chemistry of Solid Wood*, Vol. 207, American Chemical Society, pp. 401-451.

Fengel D., Wegener G (1984). Wood chemistry, ultrastructure, reactions; p. 27-65.

Fernandez M.P., Watson P.A., Breuil C (2001). Gas chromatography – mass spectrometry method for the simultaneous determination of wood extractives compounds in quaking aspen. *Journal of Chromatography A*, 922: 225–233.

Fougerousse M (1960). Durabilité naturelle du bois. *Bois et Forêts des Tropiques.* 73, 43-56.

Fouquet D (2003). Agents de détérioration et de préservation du bois en milieu en tropical humide. *Revue Bois et Forêts des Tropiques*, 277(3):19-34.

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

Gochev V.K., Krastanov A.I (2007). Fungal laccases. *Bulg. J. Agric. Sci.* 13 (1) :75-83.

- Guilley E., Charpentier J.P., Ayadi N., Snakkers G., Nepveu G., Charrier B (2004).** Decay resistance against *Coriolus versicolor* in Sessile oak (*Quercus petraea Liebl.*): analysis of the between-tree variability and correlations with extractives, tree growth and other basic wood properties. *Wood Sci Technol* 38:539-554.
- Haluk J.P., Jodin P (1994).** Composition chimique du bois. Le bois matériau d'ingénierie. Edition ARBOLOR. 433 p: 53-88.
- Han D.H., Li R.H (2004).** Mechanisms of Cardiovascular Protection by Resveratrol. *Journal of Medicinal Food* 7 (3), 290 - 298.
- Harborne B.J, Williams A.C (2000).** Review in advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
- Haslam E (1998a).** Practical polyphenols, cambridge university press, cambridge.
- Hawley L.F., Fleck L.C., Richards C.A (1924).** The relation between durability and chemical composition in wood. *Ind. Eng. Chem.*, 16, 699-700.
- Hezari M., Lewis N. G., Croteau R (1995).** Purification and characterization of taxa 4(5), 11(12)-diene synthase from pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis, *Arch.Biochem.Biophys.*, 322, pp 437-444.
- Hill C (2006).** Wood Modifications: Chemical, Thermal, and Other Processes. John Wiley & Sons.
- Hillis W.E (1972).** Review article: formation and Properties of some Wood Extractives. *Phytochemistry* 11:1207-1218.
- Hillis W.E (1987).** Heartwood and tree exudates. Springer-verlag, Berlin, Germany. 268 pp.
- Hon D.N.S., Ifju, G (1978).** Measuring penetration of light into wood by detection of photo-induced free radicals. *Wood Science and Technology*, 11(2), 118-127.
- Hon D.N.S., Ifju, G., Feist, W.C (1980).** Characteristics of free radicals in wood. *Wood and fiber science*, 12(2), 121-130.
- Hooper L., Cassidy A (2006).** A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 1805-1813.

Houghton P., Raman A (1998). Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts Springer US ISBN 978-1-4615-5809.

Huang Z., Hashadi K., Makino R., Kawamura F., Kuniyoshi S., Ryuichiro K., Ohara S (2009). Evaluation of biological activities of extracts from 22 African tropical wood. *Journal of Wood Science* 55: 225-229.

Kalamouni E.C (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat soutenue à l'Université de Toulouse (France), pp 54-55.

Kalnins, M.A (1984). Photochemical degradation of acetylated, methylated, phenylhydrazinmodified, and ACC-treated wood. *Journal of Applied Polymer Science*, 29(1), 105-115.

Kandem D.P (1994). Fungal decay resistance of aspen blocks treated with heartwood extracts. *For. Prod. J.* 44 (1):30-32.

Kawamura F., Ohara S., Nishida A (2004). Antifungal activity of constituents from the heartwood of *Gmelina arborea*: Part 1. Sensitive antifungal assay against Basidiomycetes. *Holzforschung.* 58, 189-192.

Kawamura F., Ramle S., Sulaiman O., Hashim R., Ohara S (2011). Antioxidant and antifungal activities of extracts from 15 selected hardwood species of Malaysian timber. *Eur J Wood Prod* 69(2): 207–221. <https://doi.org/10.1007/s00107-010-0413-2>.

Kilic A., Niemz P (2012). Extractives in some tropical woods. *European Journal Wood and Wood Products*, 70(1-3): 79-83.

Kinjo J., Uemura H., Nohara T (1995). Novel Yellow Pigment from *Pterocarpus santalinus* : Biogenetic Hypothesis for Santalin Analogs. *Tetrahedron Letters*, 36 (31), 5599-5602.

Kirker G.T., Blodgett A.B., Arango R.A., Lebow P.K., Clausen C.A (2013). The role of extractives in naturally durable wood species. *International Biodeterioration & Biodegradation* 82: 53-58.

- Kleinhentz M., Jactel H., Menassieu P (1999).** Terpene attractant candidates of *Dioryctria sylvestrella* in maritime pine (*Pinus pinaster*) oleoresin, needles, liber and headspace samples. *Journal of Chemical Ecology* 25, 2741-2756.
- Kohen R., Beit-Yannai E., Berry E.M., Tirosh O (1999).** Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissue by cyclic voltammetry. *Methods in Enzymology*, 300: 285-296.
- Kokutse A.D., Stokes A., Bailleres H., Kokou K., Baudasse C (2006).** Decay resistance of Togolese teak (*Tectona grandis L.f*) heartwood and relationship with colour. *Trees* 20:219-223.
- Koshidjima T., Watanabe T., Azuma J (1984).** Existence of benzylated carbohydrate moiety in lignin-carbohydrate complex from pine wood, *Chem. Lett.*, pp. 1737-1740.
- Krasutsky P (2006).** Birch bark research and development. *Natural product reports* 23, 919-942.
- Krutul D (1992).** The effect of extractives substances soluble in the alcohol-benzene mixture and in alkalis on some hygroscopic properties of birch wood. *Forestry and Wood Technology*, 43: 93-99.
- Lajide L., Escoubas P., Mizutani J (1995).** Termite antifeedant activity in *Xylopia aethiopica*. *Phytochemistry* 40 :1105-1112.
- Lall N., Weiganand O., Hussein A.A., Meyer J.J.M (2006).** Antifungal activity of naphthoquinones and triterpenes isolated from the root bark of *Euclea natalensis*. *S. Afr. J. Bot.* 72:579–583.
- Lavoie J.M., Stevanovic T (2005).** Variation of Chemical Composition of the Lipophilic Extracts from Yellow Birch (*Betula alleghaniensis*) Foliage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4747-4756.
- Lee S.K., Lee H.J., Min H.Y., Park E.J., Lee K.M., Ahn Y.H., Cho Y.J., Pyee J.H (2005).** Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia*, 76(2): 258-260.
- Lercker G., Rodriguez-Estrada M (2000).** Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. *J Chrom. A* (881) : 105-129.
- Leyva A., Dimmel D.R., Pullman G.S (1998).** Teak extract as catalyst for the pulping of loblolly pine. *Tappi Journal*, 81 (5) 237-240.

Linderschmidt R., Trylka A., Goad M., Witschi H (1986). The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*, 38: 151-160.

Liswidowati B.H., Karina M., Syafii W., Suzuki S., Umezawa T., Shimada M (2001). Isolation of Syringaresinol from *Paraseranthes Falcataria* (L.) Nielsen. Departmental Bulletin Paper. Wood Research Institute, Kyoto University. <http://hdl.handle.net/2433/53137>.

Liu J (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 92–94.

Liu J., Meng C., Yan Y., Shan Y., Kan J., Jin C (2016). Structure, physical property and antioxidant activity of catechin grafted *Tremella fuciformis* polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 82:719-724.

Louis J., Léonard J (1948). Olacaceae. In : Robyns, W, Starner, P, eds. *Flore du Congo belge et du Ruanda-Urundi*. INEAC, Bruxelles, volume 1: 250-253.

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C (2005). Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. Collection Biologie 192 pages.

Maranhão C.A., Pinheiro I.O., Santana L.B.D.A., Oliveira L.S., Nascimento M.S., Bieber L.W (2013). Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 79: 9-13.

Martínez-Sotres C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga Quiñones G.J., Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J., Herrera-Bucio R (2012). Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *Int. Biodeterior. Biodegrad* 69:38-40.

Massanet G.M., Pando E., Rodriguez-Luis F., Zubia E (1989). Lignances-a review, *Fitoterapia* LX (1), pp. 3-35.

Mbambo B., Odhav B., Mohanlall V (2012). Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). *J. Med. Plants Res.* 6:5135–5141.

Mbang T (2004). Rôle des extractibles dans la durabilité naturelle de quatre essences camerounaises et potentialités d'utilisation en tant que matières actives de protection du bois. Rapport de stage au Cirad-Forêt de Montpellier (France), 30 pp.

Mburu F., Dumarçay S., Gérardin P (2007). Evidence of fungicidal and termicidal properties of *Prunus africana* heartwood extractives. *Holzforschung* 61:323-325.

Medzegue M.J (2003). Développement d'une méthode spectroscopique non destructive pour l'évaluation de la durabilité naturelle du bois et de la détermination de sa composition chimique. DEA Université Bordeaux 1.

Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84: 407-412.

Miranda I., Sousa V., Pereira H (2011). Wood properties of teak (*Tectona grandis*) from a mature unmanaged stand in East Timor. *J Wood Sci* 57:171-178.

Mishra T., Pal M., Kumar A., Rai D., Tewar S.K (2017). Termiticidal Activity of *Punica granatum* fruit rind fractions and its compounds against *Microcerotermes beelsoni*. *Ind. Crop. Prod.* 107:320–325.

Mohareb A., Sirmah P., Desharnais L., Dumarçay S., Pétrissans M., Gérardin P (2010). Effect of extractives on conferred and natural durability of *Cupressus lusitanica* heartwood. *Ann. For. Sci.* 67:504-510.

Monteiro J.M., Albuquerque U.P., Araujo E.L., Amorim E.L.C (2005). Tannins: from chemistry to ecology. *Quimica Nova* 28 :892-896.

Mori M., Aoyama M., Doi S., Kanetoshi A., Hayashi T (1997). Antifungal activity of bark extract of deciduous trees. *Holz als Roh und Werkstoff* 55:130–132.

Morimoto M., Fukumoto H., Hiratani M., Chavasiri W., Komai K (2006). Insect antifeedants, pterocarpan and pterocarpol, in heartwood of *Pterocarpus macrocarpus* Kruz. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:1864–1868.

Mounanga Koumbi T (2008). Tensioactifs antioxydants originaux pour la formulation de produits de préservation du bois. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I, 223 pp.

Mounguengui S., Saha Tchinda J.B., Kor Ndikontar M., Dumarçay S., Attéké C., Perrin D., Gelhaye E., Gérardin P (2016). Total phenolic and lignin contents, phytochemical screening, antioxidant and fungal inhibition properties of the heartwood extractives of ten Congo Basin tree species. *Annals of Forest Science* (2016) 73:287–296. DOI [10.1007/s13595-015-0514-5](https://doi.org/10.1007/s13595-015-0514-5)

Mounguengui W.S (2008). Caractérisation HPLC de marqueurs permettant de prévoir l'évolution de certaines propriétés macroscopiques du bois lors de différents processus de dégradation. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I (France). 229 pp.

Moupela C., Doucet J.L., Daïnou K., Meunier Q., Vermeulen C (2013). *Coula edulis* Baill dissemination attempts by seeding and air layering, and its domestications perspectives. *Bois et Forêts des Tropiques* 318:3-13.

Moupela C., Vermeulen C., Daïnou K., Doucet J.L (2010). African Hazel tree (*Coula edulis* Baill), a ignored forest non wood product. *Biotechnol.Agron.Soc.Environ* 5:451-461.

Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J (2001). Natural antioxydants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.

Murkies A.L., Wilcox G., Davis S.R (1998). Phytoestrogens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (2), 297-303.

Nascimento M.S., Santana A., Maranhão C.A., Oliveira L.S., Bieber L (2013). Phenolic Extractives and Natural Resistance of Wood. <http://dx.doi.org/10.5772/56358>.

Ndukwe N.A., Okiei W.O., Alo B.I (2012). Correlates of the yield of chemical pulp, lignin, and the extractive materials of tropical hardwoods. *Afr J Agric Res* 7:5518–5524.

Newman D.J., Cragg G.M (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*. 70: 461-477.

Neya B., Hakkou M., Pétrissans M., Gérardin P (2004). On the durability of *Burkea africana* heartwood: evidence of biocidal and hydrophobic properties responsible for durability. *Ann. For. Sci* 6:277–282.

Nguila I.G., Petrisans M., Lambert J., Ehrhardt J.J., Gérardin P (2006). XPS characterization of wood chemical composition after heat-treatment. *Surface and Interface Analysis*, 38(10): 1336-1342.

Niamké B.F., Amusant N., Charpentier J.P., Chaix G., Baissac Y., Boutahar N., Adima, A.A., Kati-Coulibaly S., 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.

Niamké F.B., Amusant N., Stien D., Chaix G., Lozano Y., Kadio A.A., Lemenager N., Goh D., Adima A.A., Kati-coulibaly S., Jay-allemand C (2012). 4'-5'-Dihydroxy-epiisocatalponol, a new naphthoquinone from *Tectona grandis L.f.* heartwood and fungicidal activity. International Biodeterioration and Biodegradation, 74: 93-98.

Norin T (1981). Wood extractives-their biological significance and their importance for the protection of wood and forest trees, Ekman-Days 1981, Int. Symp. Wood Pulping Chem.,6,pp. VI :1-VI :3.

Novriyanti E., Santosa E., Syafii W., Turjaman M., Sitepu IR (2010). Antifungal activity of wood extract of *Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte* against agarwood-inducing fungi, *fusarium solani*. J For Res 2:155–165.

Nzokou P., Wehner K., Kamdem D.P (2005). Natural durability of eight tropical hardwoods from Cameroon Journal of Tropical Forest Science 17:416-427.

Oberdorster E., Clay M.A., Cottam D.M., Wilmot F.A., Mclachlan J.A., Milner M.J. (2001). Common phytochemicals are ecdysteroid agonists and antagonists: a possible evolutionary link between vertebrate and invertebrate steroid hormones. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 77:229–238.

Obiang C.S., Ondo J.P., Atome G.R.N., Engonga L.C.O., Siawaya J.F.D., Emvo, EN (2016). Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial potential of stem barks of *Coula edulis Baill.* *Pseudospondias longifolia* Engl. and *Carapa klaineana* Pierre. From Gabon. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 6:557-563.

Ockels F.S., Eyles A., McPherson B.A., Wood D.L., Bonello P (2007). Phenolic chemistry of coast live oak response to *Phytophthora ramorum* infection. J. Chem. Ecol. 33:1721–1732.

Ohmura W., Doi S., Aoyama M (2000). Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. Journal of Wood Science 46, 149–153.

Ohsawa M., Kuroda Y., Katsuya K., Takei H (1992). Ability of fungi inhabiting larch trunks with butt-rot to utilize wood components in vitro. J. Jpn. For. Soc. 74(4):300-307.

Oliveira L.S., Santana A.L.B.D., Maranhão CA., Miranda R.C.M., Galvão de Lima V.L.A., Silva da S.I., Nascimento M.S., Bieber L (2010). Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 711-715.

Onuorah E.O (2000). The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. *Bioresour Technol* 75:171-173.

Onuorah E.O (2001). The efficacy of heartwood extractives of *Azelia Africana* and *Erythrophleum suaveolens* as wood preservatives. *J. Timber Dev. Assoc. India* 47 (1/2): 10-26.

Pandey K.K (2005a). A note on the influence of extractives on the photo-discoloration and photodegradation of wood. *Polymer Degradation and Stability*, 87(2), 375-379.

Pandey K.K (2005b). Study of the effect of photo-irradiation on the surface chemistry of wood. *Polymer Degradation and Stability*, 90(1), 9-20.

Panshin A.J., de Zeeuw C (1980). Textbook of wood technology. Fourth Edition, New York: McGraw-Hill Book Company.

Park I.K., Shin S.C (2005). Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 :4388-4392.

Pereira H (2007) Cork: Biology, Production and Users. Elsevier Science, ISBN 978-0-444 52967-1.

Pérez-Bonilla M., Salido S., Van deek T.A., Linares-Palomino P.J., Altarejos J., Nogueras M., Sanchez A (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea Europaea*) wood. *Journal of chromatography A*, 1112(1-2): 311-318.

Pietarinen S., Hemming J., Willfoer S., Vikstroem F., Holmbom B (2005). Wood Resin in Bigtooth and Quaking Aspen Wood end Knots, *J.Wood Chem.Technol.*, 52, pp. 27-39.

Pietarinen S., Willfor S., Ahotupa M., Hemming J., Holmbom B (2006). Knotwood and Bark Wood : Strong antioxidants from Waste Materials, *J.Wood Science*, 52, pp. 436-444.

Pietta P.G (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.

Pohjama P., Hemming J.E., Willfor S.M., Markhu R., Bjane R.H (2003). Phenolic extractives in *Salix Caprea* wood and Knots. *Phytochemistry*. 63(2):165-9. DOI: 10.1016/S0031 9422(03)00050-5.

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

Qa'dan F., Nahrstedt A, Schmidt M., Mansoor K (2010). Polyphenols from *Ginkgo biloba*. *Scientia Pharmaceutica*, 78: 897-907.

Ragon K.W., Nicholas D.D., Schultz T.P (2008). Termite effect of the non-biocidal antioxidant properties of the extractives (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 52 :47-54.

Raicht R.F., Cohen B.I., Fazzini E.P., Sarwal A.N., Takahashi M (1980). Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res.* (40): 403-405.

Raven P., Ray F.E., Susan E.E (2000). *Biologie végétale*. Editions De Boeck Université. 944 Pages.

Rhouma-Martin G (2013). Enzymatic oligomerization of flavonoids and evaluation of the biological activities of synthesized oligomers. Doctoral Thesis in Biological Sciences and Biotechnologies. University of Lorraine, 196 p.

Rizanti D.E., Darmawan W., George B., Merlin A., Dumarçay S., Chapuis H., Gérardin C., Gelhaye E., Raharivelomanana P., Kartika Sari R., Syafii W., Mohamed R., Gérardin P (2018). Comparison of teak wood properties according to forest management: short versus long rotation. *Ann For Sci* 75:39.

Roggenstein W (2011). Viscose fibres with new functional qualities. *Lenzinger Berichte* 89, 72-77.

Rosdiana N.A., Dumarçay S., Gérardin C., Chapuis H., Santiago-Medina F.J., Sari R.K., Syafii W., Gelhaye E., Raharivelomanana P., Mohammed R., Gérardin P (2017). Characterization of bark extractives of different industrial Indonesian wood samples for potential valorization. *Ind. Crop Prod* 108:121-127.

Roussel-Bousta C (2000). Utilisation de biomolécules à activité biocide élevée comme agents de préservation du bois. Applications à la rosine du tall-oil et aux tropolones naturelles. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré Nancy 1.

Rowell R (2012). Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites, Second Edition.

Rowell R.M., Pettersens R., Han J.S., Rowell J.S., Tshabalala M.A (2005). Cell wall chemistry, In: Handbook of wood chemistry and wood composites. Boca Raton London New York : Taylor & Francis 35:72.

Sablik P., Giagli K., Paril P., Baar J., Rademacher P (2016). Impact of extractive chemical compounds from durable wood species on fungal decay after impregnation of nondurable wood species. Eur J Wood Prod 74:231-236.

Saha Tchinda J.B., Abia D., Dumarçay S., Ndikontar K.M., Gérardin P., Noah Ngamveng J., Perrin D (2013). Antioxidant activities, total phenolic contents and chemical compositions of extracts from four Cameroonian woods: padouk (*Pterocarpus soyauxii* Taubb), tali (*Erythrophleum suaveolens*), moabi (*Baillonella toxisperma*), and movingui (*Distemonanthus benthamianus*). Ind. Crop. Prod. 41:71-77.

Saha Tchinda J.B., Ndikontar K.M., Fouda Belinga A.D., Mounguengui S., Njankouo J.M., Durmaçay S., Gérardin P (2018). Inhibition of fungi with wood extractives and natural durability of five Cameroonian wood species. Ind. Crops Prod. 123:183-191

Saha Tchinda J.B., Pétrissans A., Molina S., Ndikontar K.M., Mounguengui S., Dumarçay S., Gérardin P (2014). Study of the feasibility of a natural dye on cellulosic textile supports by red padouk (*Pterocarpus soyauxii*) and yellow movingui (*Distemonanthus benthamianus*) extracts. Ind. Crops Prod. 60:291-297.

Santana A.L.B.D., Maranhão C.A., Santos J.C., Cunha F.M., Conceição G.M., Bieber L.W., Nascimento M.S (2010). Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. International Biodeterioration & Biodegradation, 64: 7-12.

Scalbert A., Monties B., Janin G (1989). Tannins in wood : comparison of different estimation methods. Journal of Agricultural and wood Chemistry 35, 1324-1329.

Scheffer C.T., Cowling B.E (1966). Natural resistance of wood to microbial deterioration. Annual Review of Phytopathology. 4, 147-170.

Scheffer T.C., Cowling E (1966). Natural resistance of wood to microbial deterioration. *Ann. Rev. Phytopathol.* 4 : 147-170.

Scheffrahn R.H (1991). Allelochemical resistance of wood to termites. *Sociobiology* 19 : 257-282.

Schultz T.P., Harms W.B., Fisher T.H., McMurtrey K.D., Minn J., Nicholas D.D (1995). Durability of angiosperm heartwood: The importance of extractives. *Holzforschung*, 49(1): 29-34.

Schultz T.P., Nicholas D.D (2002). Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54:47-52.

Seppänen S.K., Syrjälä L., Von Weissenberg K., Teeri T.H., Paaajanen L., Pappinen, A (2004). Antifungal activity of stilbenes in vitro bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding Pinosylvin synthase. *Plant Cell Rep* 22:584-593.

Silva C.A., Monteiro M.B.B., Brazolin S., Lopez G.A.C., Richter A., Braga M.R (2007). Biodeterioration of brazilwood *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae) by rot fungi and termites. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 60: 285-292.

Simmonds M.S.J (2001). Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56 :245-252.

Simona P., Antonio F., Severina P., Brigida A., Piera U., Pietro M (2008). Antioxidant properties of sour cherries (*Prunus cerasus L.*) : Rôle of colorless phytochemicals from the methanolic extract of ripe fruits. *J.Agric.Food Chem* 56, 1928-1935.
<https://doi.org/10.1021/jf0734727>

Singh, A.P., Dawson, B.S.W (2003). The mechanism of failure of clear coated wooden boards as revealed by microscopy. *IAWA Journal*, 24(1), 1-11.

Sirmah P., Dumarçay S., Gérardin P (2009). Effect of Unusual amount of (-)-mesquitol of from the heartwood of *Prosopis juliflora*. *Natural Product Research*, 23: 183-189.

Sjostrom E (1993). *Wood Chemistry – Fundamentals and Applications*. 2. Ed., pp 51-108. San Diego, USA, Academic Press.

Skyba O., Douglas C.J., Mansfield S.D (2013). Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi. *Appl Environ Microbiol* 79:2560-2571.

Smith A.L., Campbell C.L., Walker D.B., Hanover J.W (1989). Extraction of decay resistance from black locust heartwood. *Holzforshung* 43:293-296.

Smith-Kielland I., Dornish J.M., Malterud K.E., Hvistendahl G., Romming C., Bockman O.C., Kolsaker P., Stenstrom Y., Nordal A (1996). Cytotoxic triterpenoides from the leaves of *Euphorbia pulcherrima*. *Planta Med.* (62): 322-325.

Song T., Pranovich A., Holmbom B (2012). Hot-water extraction of ground spruce wood of different particle size. *Bioresources* 7:4214-4225.

Srinivasan U., Ung T., Taylor A., Cooper P.A (1999). Natural durability and waterborne treatability of tamarack. *Forest Prod. J.* 49(1):82-87.

Stevanovic T (2011). Potentiel de développement lié aux extractibles forestiers du Quebec. Année internationale des forêts-forêts 2011. Université de Laval (Quebec). 53 p.

Stevanovic T., Perrin D (2009). Chimie du bois. Presses polytechniques et universitaires romandes, Nancy. 241 p.

Stewart A.P., Ripley P.H., Hoegedal P., Klein U (2003). Investigation of diverse reactions following the use of Econor in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26, 253.

Surowiec I., Nowik W., Trojanowicz M (2004). Identification of “insoluble” red dyewoods by high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) finger printing. *Journal of separation science* 27, 209-216.

Syafii W., Yashimoto T., Samejima, Masahiro (1988). The effet of lignin structure on decay resistant of some tropical woods. *Bulletin Tokyo University Forestry.* 80, 69-77.

Taga M.S., Miller E.E., Pratt D.E (1984). Chia seeds as a natural lipid antioxydants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61: 928-931.

Tahar Elaieb M., Ben Ayed S., Dumarçay S., De Freitas Homen De Faria B., Thévenon M.F., Gérardin P., Candelier K (2019). Natural durability of four *Tunisian Eucalyptus* spp. and their respective compositions in extractives. *Holzforschung* 2019; aop. <https://doi.org/10.1515/hf-2019-0090>.

Takamura K., Ito M (1977). Effects of metal ions and flavonoids on the oxidation of ascorbic acid, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, pp. 3218-3225.

Tascioglu C., Yalcin M., de Troya T., Sivrikaya H (2012). Termicidal properties of some wood and bark extracts used as wood preservatives. *BioResources* 7:2960–2969.

Tayeb., Ali H., Ezatollah A., Shokoofeh G., Mehdi T (2018). Cellulose Nanomaterials-Binding Properties and Applications: A Review. *Molecules* 23(10):1-24.

Taylor A.M., Gartner B.L., Morrell J.J (2002). Heartwood formation and natural durability-A review. *Wood Fiber Sci* 34:587-611.

Taylor A.M., Gartner B.L., Morrell J.J (2006). Effects of Heartwood Extractive fractions of *Thuja plicata* and *Chamaecyparis nootkatensis* on wood degradation by termites or fungi. *Journal of Wood Science*, 52: 147-153.

Tchatat, M., Ndoye O., Nasi R (1999). Produits forestiers Autres que le bois d’œuvre (PFAB): place dans l’aménagement durable des forêts denses humides d’Afrique Centrale. Série forafri 18, 102 p.

Téké H., Boesh H (2005). Le savoir de nos anciens. *Paroles de forêt*, 4,4.

Thévenon M.F., Roussel C., Haluk JP (2001). Possible durability transfer from durable to non durable wood species. The case study of teak wood. The International Research Group on Wood Preservation, 32nd Annual Meeting, Doc n° IRG/WP 01-10392. 6 p.

Thompson M., Williams C.R., Elliott G.E.P (1976). Stability of flavonoid complexes of copper (II) and flavonoid antioxidant activity, *Anal.Chim.Acta*, 85, pp. 375-381.

Thulasidas P.K., Bhat K.M (2007). Chemical extractive compounds determining the brown-rot decay resistance of teak wood. *Holz als Roh- und Werkstoff* 65 (2), 121-124.

Tirzitis G., Bartosz G (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57(1): 139-142. Online at www.actabp.pl.

Treml J., Šmejkal K (2016). Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals, comprehensive reviews. *Food Sci Food Saf* 15(4):720-738. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12204>.

Umezawa T (2001). Chemistry of extractives, in *Wood and Cellulosic Chemistry* ; 2nd ed., Hon D. N.-S. and Shiraishi N. eds, Marcel Dekker, New York. pp. 213-241.

Van Acker J., Militz H., Stevens M (1999). The Significance of Accelerated Laboratory Testing Methods Determining the Natural Durability of Wood. *Holzforschung* 53 (1999) 449-458. <https://doi.org/10.1515/HF.1999.075>

Venalainen M., Anni M., Saranpa H.P., Kainulainen P., Tiitta M., Velling P (2004). The concentration of phenolics in brown-rot decay resistant and susceptible Scots pine heartwood. *Wood Sciences and Technology*. 38, 109-118.

Venkata R.B., La S., Pardha S.M., Narashimha B (2012). Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatotium odoratum*. *Asian J Pharm Clin. Res.* ((2): 99-106.

Vernay M., Fouquet D (1997). Guide d'utilisation des bois de Guyane dans la construction. ISBN: 2-87614-268-6. CIRAD-Forêt.

Viegas Jr., C (2003). Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quimica Nova* 26 :390-400.

Vigor C., Vercauteren J., Montels J (2009). Natural substances in the «drug chain» first part introduction to pharmacognosy. University of Montpellier I, p 49.

Villiers J.F (1973). Icacinacées, Olacacées, Pentadiplandracées, Opiliacées, Octoknémacées. *In: Aubréville, A. & Leroy, J.F., eds. La flore du Gabon.* n° 20. Muséum National d'Histoire Naturel, Paris, France, 144-146.

Vivien J., Faure J.J (1996). *Fruitiers sauvages d'Afrique. Espèces du Cameroun.* Editions Nguila-Kerou, Clohars Carnoet, France.

Volkmer, T., Arietano, L., Plummer, C., Strautmann, J., Noël, M (2013). Loss of tensile strength in cellulose tissue on the surface of spruce (*Picea abies*) caused by natural photodegradation and delignification. *Polymer Degradation and Stability*, 98(6), 1118-1125.

Walker R.A., Sillans R (1995). *Les plantes utiles du Gabon.* Sépia, Libreville.

Wang Y., Lee K.W., Chan F.L., Chen S., Leung L.K (2006). The Red Wine Polyphenol Resveratrol Displays Bi-level Inhibition on Aromatase in Breast Cancer Cells. *Toxicological Sciences*. 92 (1), 71-77.

Ward R.S (1997). Lignanes, neolignanes and related compounds. Ward, Robert S. Lignans, neolignans and related compounds, Natural Product Reports, 14, pp. 43-74.

Watanabe Y., Mihara R., Mitsunaga T., Yoshimura T (2005). Termite repellent sesquiterpenoids from *Callitris glaucophylla* heartwood. Journal of Wood Science 51, 514-519.

White F (1983). Vegetation map of Africa. UNESCO, Paris, France.

Wilcox W.W (1969). Tolerance of *Polyporus amarus* to incense cedar heartwood extractives. Forest Products Laboratory, University of California, Berkeley, CA.15pp.

Willetner H., Peek R.D (1997). The natural durability story. IRG/WP 97-20119.

Williams R.S (2005). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites* CRC Press, Madison, United States.

Woyengo T.A., Ramprasath V.R., Jones P.J.H (2009). Anticancer effects of phytosterols. Eur. J. Clin. Nutr. (63) : 813-820.

Wu T.S., Lin FW (2001). Alkaloids of the wood of *Cryptocarya chinensis*. J Nat Prod 64:1404-1407.

Zabel R.A., Morrell J.J (1992). Wood Microbiology, Decay and its Prevention. Academic Press, Orlando, pp 476.

Zabka M., Pavela R (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. Chemosphere 93:1051-1056.

Zang H., Liua M., Hana S., Wei Y (2013). Optimizing the extraction of catechin from peanut red skin using response surface methodology and its antioxidant activity. IERI Procedia 5: 312-320.

Zhu W., Zhang Z (2014). Preparation and characterization of catechin-grafted chitosan with antioxidant and antidiabetic potential. Int. J. Biol. Macromol 70: 150:155.

RESUME : Cette étude a eu pour objectif général de valoriser la qualité du bois de *C. edulis* tout en étant à la recherche de nouveaux composés biocides valorisables dans des domaines comme l'agroalimentaire, la cosmétique, la préservation du bois etc... Pour cela, plusieurs expériences ont été réalisées. Les résultats de l'étude sur la variabilité intra-arbres de la composition chimique ont montré que seule la teneur en extractible varie considérablement radialement et axialement en revanche celle de la composition chimique est demeurée relativement constante, avec une légère diminution vers le haut. Aucune différence significative de la composition chimique n'a été observée entre les différents rondins. Les résultats sur la caractérisation et les différentes analyses des extractibles ont montré que la teneur en extractibles varie avec la partie de l'essence étudiée, le solvant et la méthode d'extraction utilisée. Les taux d'extractibles au niveau de l'écorce sont plus élevés que dans le duramen et l'aubier. Les acides gras comme l'acide hexadécanoïque et l'acide trans-9-Octadécenoïque et les composés terpéniques tels que le stigmastérol et le β -Sitostérol ont été identifiés comme composés majoritaires des extraits peu polaires. Les sucres et surtout les composés phénoliques tels que l'acide gallique et l'acide ellagique ont été identifiés comme composés majoritaires des extraits polaires. Le bois de *C.edulis* a montré une très bonne résistance vis-à-vis des champignons et des termites. L'extrait peu polaire de l'écorce et tous les extraits polaires ont montré des activités antifongiques intéressantes et plus importantes sur les champignons de pourritures brunes que sur les champignons de pourritures blanches. Les meilleures activités anti-termites ont été obtenues avec les extraits de l'écorce de *C.edulis*. Les meilleures activités antioxydantes ont été enregistrées avec les extraits polaires de l'écorce mais surtout avec celles du bois de cœur de *C.edulis* qui se rapprochent des valeurs des activités antioxydantes de la catéchine et du BHT, utilisés comme témoins positifs dans cette étude.

Mots clés : Noisetier du Gabon, extractibles, composition chimique, Antifongique, Anti-termite, Antioxydant, Durabilité naturelle

ABSTRACT : The general objective of this study was to enhance the quality of *C. edulis* wood while being on the lookout for new biocidal compounds that can be used in fields such as the food industry, cosmetics, wood preservation, etc... Several experiments have been carried out for this. The results of the study on the intra-tree variability of the chemical composition showed that only the extractive content varies considerably radially and axially, on the other hand that of the chemical composition remained relatively constant, with a slight decrease upwards. No significant difference in chemical composition was observed between the different logs. The results on the characterization and the various analyzes of extractives have shown that the extractives content varies with the part of the wood species studied, the solvent and the extraction method used. The extractives content in the bark are higher than in the heartwood and sapwood. Fatty acids such as hexadecanoic acid and trans-9-Octadecenoic acid and terpene compounds such as stigmasterol and β -Sitosterol have been identified as the majority of less polar extracts. Sugars and especially phenolic compounds such as gallic acid and ellagic acid have been identified as the majority of polar extracts. *C.edulis* wood has shown very good resistance to fungi and termites. The low-polar bark extract and all polar extracts have shown interesting and more important antifungal activities on brown rot fungi than on white rot fungi. The best anti-termite activities have been obtained with extracts from the bark of *C. edulis*. The best antioxidant activities were recorded with the polar extracts of the bark but especially with that of the heartwood of *C. edulis* which approximate the values of the antioxidant activities of catechin and BHT, used as positive controls in this study.

Keywords: Gabon hazel tree, Extractive, Chemical composition, Antifungal, Anti-termite, Antioxidant, Natural durability

ANNEXES

Relationships between chemical composition and decay durability of Coula edulis Baill as an alternative wood species in Gabon

C. S. A. Bopenga Bopenga, S. Dumarçay, P. Edou Engonga & P. Gérardin

Wood Science and Technology
Journal of the International Academy of
Wood Science

ISSN 0043-7719

Wood Sci Technol
DOI 10.1007/s00226-020-01158-5



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Relationships between chemical composition and decay durability of *Coula edulis* Baill as an alternative wood species in Gabon

C. S. A. Bopenga Bopenga¹ · S. Dumarçay¹ · P. Edou Engonga² · P. Gérardin¹

Received: 31 July 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The general objective of this work was to evaluate the quality of the little-known tropical woods of the Congo Basin, particularly *Coula edulis*, while looking for new biocidal products. The natural durability of the hazel tree of Gabon *Coula edulis* versus basidiomycete fungi was evaluated with native and extracted samples of heartwood against brown rot (*Rhodonia placenta* and *Coniophora puteana*) and white rot (*Trametes versicolor* and *Pycnoporus sanguineus*) fungi. The results showed that non-extracted samples were more durable. Fungal growth inhibition tests using different concentrations of extractives confirmed the fungicidal effects. Percentage of the different wood polymers and GC–MS analysis of wood extractives were carried out to examine correlations between durability and wood chemistry. Natural durability of *Coula edulis* could be explained by the unusually high lignin content and the presence of high amounts of polyphenols like gallic and ellagic acids and tannins. *Coula edulis* could therefore be a local alternative to help alleviate wood shortages in Gabon.

Introduction

The natural durability of wood is defined as its ability to resist biological degradation caused by fungi, insects and weathering without any chemical treatment (Rowell et al. 2005). In reality, only the heartwood of some species is durable, sapwood being in general easily degraded (Rowell et al. 2005). Although several factors like hydrophobicity, density, lignin and extractives contents have been reported to be involved in wood natural durability, most of the authors agree on the important role played by extractives

✉ P. Gérardin
philippe.gerardin@univ-lorraine.fr

¹ Inra, EA 4370 USC 1445 LERMAB, Faculty of Science and Technology, University of Lorraine, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

² Normal Superior School, LAPLUS, Multidisciplinary Laboratory of Sciences of Libreville, BP 17009, Libreville, Gabon

(Neya et al. 2004; Antwi-Boasiako and Pitman 2009; Oliveira et al. 2010; Skyba et al. 2013; Taylor et al. 2002). Extractives content varies widely in wood (Antwi-Boasiako et al. 2010; Kilic and Niemz 2012; Ndukwe et al. 2012). Extractives are low-molecular-weight substances found in the porous structure of wood, which are generally lipophilic or hydrophilic secondary metabolites that are not essential for tree growth. The content and composition of the extractive substances vary according to the wood samples, the part of the tree, its age, the location and the season of harvesting as well as the period and conditions of storage. Extractive substances are responsible for wood characteristics such as color, odor, natural durability and acoustic properties (Aloui et al. 2004). They protect wood from ultraviolet rays, pathogens and herbivores (Harborne and Williams 2000). They consist of several families of compounds such as waxes, fats, terpenoids, quinones and a large variety of phenolic compounds (simple phenols, flavonoids, lignans, stilbenes, tannins, etc.). Phenolic compounds are the most important class of extractives presenting antifungal, antioxidant and other properties that are potentially valuable (Hillis 1972). In addition, naturally durable wood species contain toxic compounds that are generally polyphenols such as tannins, flavonoids and stilbenes (Schultz and Nicholas 2002; Oliveira et al. 2010; Nascimento et al. 2013). Some species also have non-phenolic extractives such as quinones and terpenoids. For example, the molecules responsible for the natural durability of *Tectona grandis* consist of toxic quinones, which present strong antitermitic and fungicidal properties (Niamké et al. 2011, 2012). The toxicity of extractive substances correlates with their antioxidant activity (Schultz and Nicholas 2002; Amusant et al. 2007). The most important agents of wood biodegradation are fungi and termites (Onuorah 2000; Kokutse et al. 2006; Mburu et al. 2007; Antwi-Boasiako et al. 2010). However, while natural durability of most temperate wood species has been well documented (Aloui et al. 2004; Guilley et al. 2004; Kirker et al. 2013), less information is available on the natural durability of many Congo Basin wood species (Cirad 2008; Nzokou et al. 2005; Antwi-Boasiako and Pitman 2009; Antwi-Boasiako et al. 2010). The Congo Basin hosts an exceptional biodiversity for trees as well as for other flora and fauna. Only a few wood species are exploited because of their high market value (AGEOS 2016). The direct consequence of this selective exploitation is the over-utilization of certain wood species. Several lesser-known species are available in Gabon including the Gabonese hazel (*Coula edulis* Baill), whose wood is used by the local population for its longevity because of its resistance to fungi and insects, including termites. The wood is used in the construction of huts as poles or lintels (Moupela et al. 2010, 2013). The goal of this study was to better understand the reasons for the natural durability of this species including: (1) the effect of extractives on decay resistance, (2) the effect of extractives on the fungal growth inhibition and (3) the role of wood chemistry in relation to durability.

Experimental methods

Reagents

Concentrated sulfuric acid (95–97%), concentrated hydrochloric acid (37%), dichloromethane, acetone, absolute ethanol, toluene, methanol, BSTFA/1% TMCS, iron

perchloride, magnesium turn, chloroform and acetic anhydride were purchased from Sigma-Aldrich, Carlo Erba or Prolabo and used without further purification. Ultrapure water obtained from a PURELAB Option-Q equipment (Elga) was used. Mayer's reagent (potassium mercuric iodide solution), iron perchloride 10% solution in water and Shinoda reagent (magnesium turn in hydrochloric acid) were prepared in the laboratory from reagent-grade chemicals using previously described procedures (Akinjogunla et al. 2010). Malt extract and agar were purchased from Sigma-Aldrich.

Material

Heartwood of Gabon hazel (*C. edulis*) was obtained from a 50-cm-diameter log taken from between 1.50 and 2.50 m above the ground. The tree was harvested at the Ayémé primary forest in Gabon located in the Estuary province. Tree age was estimated between 50 and 75 years. $30 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$ heartwood blocks were cut in the longitudinal, radial and tangential directions, respectively. The blocks were randomly used for the different tests performed. Sawdust of *C. edulis* baill was prepared using a ball mill (Retsch SM 100), sieved ($\varnothing=0.160 \text{ mm}$) and stored in glass flasks after drying in an oven at $70 \text{ }^\circ\text{C}$ to avoid extractives degradation.

Extraction

10 g of finely ground, dried heartwood was successively Soxhlet extracted for 24 h with solvents of increasing polarity: dichloromethane, acetone, toluene–ethanol (2/1, v/v) and water. Each extraction was performed in triplicate. The extracts were concentrated using a rotary evaporator under vacuum, except for the aqueous extracts, which were lyophilized. The extracts were then dried in a desiccator under vacuum in the presence of P_2O_5 and weighed regularly until constant mass (m_e). The yield of extract was determined using Eq. 1:

$$\text{Yield of extract (\%)} = (m_e/m_s) \times 100 \quad (1)$$

where m_e is the mass of extract and m_s is the mass of sawdust used for extraction. The extracts were then recovered and stored in closed bottles in the dark (Neya et al. 2004; Mburu et al. 2007). Blocks of heartwood were extracted to evaluate the effect of extractives on wood decay durability. The blocks were Soxhlet extracted for three weeks using acetone–water (1/1, v/v), the apparatus being refueled when needed. A duration of three weeks was chosen to improve extraction, which is known to be more difficult on blocks due to a lower exchange surface compared to sawdust (Song et al. 2012). The blocks were then dried at $103 \text{ }^\circ\text{C}$ and weighed (m_1). Extraction yield was determined using Eq. 2:

$$\text{Yield of extraction (\%)} = [(m_0 - m_1)/m_0] \times 100 \quad (2)$$

where m_0 is the anhydrous mass of the blocks before extraction dried at $103 \text{ }^\circ\text{C}$ and m_1 is the anhydrous mass of the blocks dried at $103 \text{ }^\circ\text{C}$ after extraction.

Microorganisms

Two white rot fungi, *Trametes versicolor* (TV) ((L. ex Fr.) Pilat strain CTB 863 A) and *Pycnoporus sanguineus* (PS) ((L.: Fr.) Murrill, strain 1904), and two brown rot fungi, *Rhodonia placenta* (RP) ((Fries) Cooke sensu J. Eriksson, strain FPRL 280) and *Coniophora puteana* (CP) ((Fr.) Karst., strain BAM Ebw. 15), were used to assess wood durability and growth inhibition of extracts.

Decay durability tests

The fungi were grown on 4% malt extract agar in 9-cm-diameter Petri dishes. Each box was then covered and sealed with parafilm. Petri dishes were incubated at 22 °C and 70% relative humidity for 15 days to allow growth of the mycelium on media. Three 103 °C oven-dried and sterilized blocks of extracted (m_1) or non-extracted (m_0) heartwood of *C. edulis* were placed on small sterilized plastic grids in each Petri dish, sterilization being performed in an autoclave. Each experiment was repeated four times. Beech (*Fagus sylvatica*) wood was used as the virulence control for the white rot fungi, whereas pine sapwood (*Pinus sylvestris* L.) was used for the brown rot fungi. Extracted and non-extracted samples of *C. edulis* heartwood were also placed on sterile culture medium without fungal inoculation to evaluate mass losses due to diffusion of extractives. The Petri dishes were sealed with parafilm and incubated at 22 °C and 70% relative humidity for 16 weeks, according to European standard EN 113. At the end of the test, wood blocks were scraped clean of mycelium and weighed to obtain wet mass (m_2) for calculation of wood moisture at the end of the fungal test. The blocks were oven-dried for 48 h at 103 °C until constant mass (m_3). The mass loss (ML) caused by fungal attack and the moisture content (MC) were determined as follows:

$$ML (\%) = ((m_0 \text{ or } m_1) - m_3) / (m_0 \text{ or } m_1) \times 100 \quad (3)$$

$$MC (\%) = ((m_2 - m_3) / m_3) \times 100 \quad (4)$$

where m_0 is the initial dried mass of unextracted blocks, m_1 is the dried mass of extracted blocks before fungal exposure, m_2 is the mass of wet blocks after fungal exposure, and m_3 is the dried mass of blocks after fungal exposure.

Corrected mass loss was calculated as follows:

$$ML_{\text{corrected}} (\%) = ML (\%) - ML_{\text{diffusion}} (\%) \quad (5)$$

where $ML_{\text{diffusion}}$ is the mean of mass loss values obtained for diffusion tests.

Inhibition of fungal growth by extracts

Growth inhibition tests were performed according to the method of Chang et al. (1999) with a slight modification. 50 mg or 100 mg of the different extracts

solubilized in the minimum amount of ethanol (1 mL maximum) were added to 100 mL of sterile 4% malt extract agar solution in Erlenmeyer flasks; the resulting media contained 500 ppm or 1000 ppm of extracts, respectively. After cooling, 20 mL of media was poured in each plate. The media was inoculated at the center with a piece of agar cut from freshly grown mycelium of the different fungal strains. Each fungus and extract concentration were evaluated on three Petri dishes without extract and three Petri dishes with extracts. The dishes were incubated at 22 °C and 70% RH. Mycelial growth was assessed by measuring two perpendicular diameters of the colony daily until the mycelium completely colonized the surface of the control plates, after over approximately 10–15 days depending on the fungal strain. The data were used to plot growth curves over time.

Fourier transform infrared spectroscopy analysis

The dried extracts were analyzed by infrared spectroscopy using a Nicolet 6700 infrared spectrophotometer, Thermo Scientific with a Smart Orbit attenuated total reflectance (ATR) accessory. For analysis, a pressure applicator with a rotary knob was used to press the dry extract to confirm proper contact with the ATR diamond crystal. The infrared radiation of the spectrometer with a fixed angle of incidence of 45° was reflected through the crystal and entered the sample through an evanescent wave. The evaluation of the mid-IR region from 4000 to 400 cm⁻¹ allowed the characterization of the sample. The graphics were plotted using OMNIC software. Three spectra were collected for each sample to obtain representative spectra.

Phytochemical screening

The reagents used to perform the phytochemical screening of the extracts were prepared and used according to previously described protocols (Houghton and Raman 1998; Akinjogunla et al. 2010). For detection of alkaloids, 20 mg of extract and 10 mL diluted 10% sulfuric acid solution were added to a test tube and stirred for two minutes, and a few drops of Mayer's reagents were added. The appearance of a yellowish precipitate with Mayer's reagent was characteristic of the presence of alkaloids. For flavonoids, in a test tube, 2 mg of extract was dissolved in 2 mL of 95% ethanol with a few drops of hydrochloric acid and 0.5 g of magnesium ribbon. A pink cherry color of the solution indicated the presence of flavonoids. For the polyphenols, 2 mL of extract (1 g/L) was introduced with a drop of 10% iron perchloride aqueous solution in a test tube. The appearance of an intense blackish color showed the presence of phenols in the extracts. For the saponins, 25 mg of extract was mixed with 15 mL of distilled water in a test tube and the whole was heated in a water bath (30 °C) for 5 min. After cooling, 10 mL of this solution was introduced into a test tube and vigorously stirred for 10 s by vortexing. The presence of a persistent foam, 1 cm thick after shaking, indicated the presence of saponins. For the detection of sterols and terpenes, 20 mg of extract, 3 mL of chloroform, 10 drops of acetic anhydride and 2 drops

of concentrated sulfuric acid were introduced into a test tube. The appearance of a purple ring turning blue and then green indicated the presence of sterols and terpenes. All the tests were done in triplicate.

GC–MS analysis

GC–MS analysis was carried out with a stationary phase DB-5MS (95% dimethyl/5% diphenyl-polysiloxane; length: 30 m; internal diameter: 0.25 mm; film thickness: 0.25 μm) column using a Perkin Elmer Clarus 680 gas chromatograph, coupled to a Perkin Elmer Clarus SQ8 mass spectrometer, a set driven by the Turbo Mass software version 6.1 and having a NIST database (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) (2011 edition). Prior to the injection, the samples were derivatized to facilitate the detection of all compounds present. For this purpose, 1–2 mg of dry extract was solubilized with 50 μl of 1% BSTFA+TMCS in a 2-mL vial. This preparation was incubated for 120 min, vial closed, at 70 $^{\circ}\text{C}$ to allow the silylation reaction to take place. The BSTFA was evaporated, and then, the derivatized extractives were dissolved in 1 mL of ethyl acetate. 1 μL of this solution was injected at 250 $^{\circ}\text{C}$ inlet temperature in splitless mode. Helium was used as carrier gas. A typical temperature schedule was 80 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, heating at 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 190 $^{\circ}\text{C}$, followed by 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 280 $^{\circ}\text{C}$ and maintained at this temperature for 10 min, heated again at 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 300 $^{\circ}\text{C}$ and maintained at this temperature for 14 min. The heating schedule was slightly modified to improve the peak resolution for some samples, leading to different retention times for a compound. Helium flow of 1 mL min^{-1} was used as mobile phase. After this separation step, the compounds were transferred to the mass spectrometer by a transfer line heated at 250 $^{\circ}\text{C}$ and ionization was achieved by the electron impact method (70 eV ionization energy). The components were then identified on the basis of comparison of their mass spectra with the NIST library through the NIST MS Search 2.0 (2011). Identification was considered as relevant for the match and reverse match when coefficient values were above 900 out of 1000.

Chemical composition

All analyses were adapted from previous procedures with slight modifications (Rowell et al. 2005; Candelier et al. 2013) and performed in triplicate. Ten g of *C. edulis* sawdust was Soxhlet extracted successively with a mixture of toluene/ethanol (2/1, v/v) for 24 h, followed by ethanol for additional 24 h. The toluene–ethanol and ethanol extracts were mixed together and the solvent evaporated under vacuum using a rotary evaporator. The extracts were dried in a desiccator under vacuum in the presence of P_2O_5 and weighed regularly to constant mass. The extractives content was determined using Eq. 1 (see “Extraction” section). The sawdust was recovered and then oven-dried at 103 $^{\circ}\text{C}$ for 48 h prior to the determination of Klason lignin, cellulose, holocellulose and hemicelluloses contents.

Klason lignin content

The lignin fraction was obtained by removing the polysaccharides. 0.175 g of extractive-free sawdust dried at 103 °C was mixed in a centrifuge tube with 1.5 mL of sulfuric acid (72%) and stirred at 30 °C for 1 h. The tube was then placed in a 250 mL beaker and autoclaved for 90 min at 120 °C. After autoclaving, the mixture was diluted with 100 mL of distilled water and filtered through a Büchner funnel. Finally, the black Klason lignin residue was obtained by drying at 103 °C for 24 h, thus ensuring a stability of the mass. Lignin content was determined according to the following formula:

$$\text{Klason lignin content (\%)} = (\text{lignin dry mass (g)} / 0.175 \text{ g}) \times 100 \quad (6)$$

Cellulose content

The cellulose fraction was obtained by mixing 1 g of extractive-free sawdust with 40 mL of ethanol and 10 mL of nitric acid and refluxing for 3 h of hydrolysis at 100 °C. The mixture was filtered after each hour making sure to retain the insoluble part. After the third hour of hydrolysis, the mixture was filtered and rinsed thoroughly with distilled water and then with ethanol and dried at 70 °C for 72 h. The mass of the residual cellulose (white residue) obtained was weighed, and then, the cellulose content was calculated according to the following formula:

$$\text{Cellulose content (\%)} = (\text{cellulose dry mass} / 1) \times 100 \quad (7)$$

Holocellulose content

The holocellulose fraction was obtained by adding 80 mL of distilled water to 2 g of extractive-free sawdust, 0.5 mL of acetic acid and 1 g of sodium chlorite. The mixture was heated to 70 °C. After 1 h, 0.5 mL of acetic acid and 1 g of sodium chlorite were added by stirring. This operation was repeated each hour for 7–8 h (time required to degrade the lignin). The mixture was cooled and filtered on tared paper in a Büchner filter. The filtrate was washed with distilled water until the yellow color and chlorine dioxide odor were removed. The white residue (holocellulose) remaining on the filter paper was then washed with acetone and dried at 103 °C for 24 h. The holocellulose content was determined by the following formula:

$$\text{Holocellulose content (\%)} = (\text{holocellulose dry mass} / 2) \times 100 \quad (8)$$

Statistical analysis

XLSTAT 2019 was used, and the results were presented as the main values representing the mean of repetitions \pm standard deviations. For the tests of natural durability, a student test was carried out between the mass losses obtained with extracted and non-extracted blocks. Values were statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Extractives contents

The extractive yield varied with solvents (Table 1).

The yield was lowest with dichloromethane (1.1%), probably due to the limited amounts of nonpolar compounds in *C. edulis* heartwood. The highest extract content was obtained with acetone (8.5%). None of the solvents used removed all extractives because of their different solubilities. Previous studies suggest that the nonpolar solvents mainly extract oils, grease or terpenes, while polar solvents removed polyphenols such as lignans, stilbenes, flavonoids and tannins. The total yield of extractives reached 16.1%, which is similar to the extractives content of many tropical species (Huang et al. 2009; Mburu et al. 2007; Neya et al. 2004; Sablik et al. 2016; Saha Tchinda et al. 2013, 2014).

Natural resistance of wood blocks against fungal attack

To evaluate the effect of extractives on the natural durability, a total extraction of wood blocks has been achieved. Total extraction yield from sawdust was 16.1%, while total extraction yield from blocks extracted over 3 weeks with acetone/water was 12.9%. As expected, extraction was slightly less effective on blocks than sawdust; however, the values were similar. Results concerning white rot and brown rot decay durability of *C. edulis* extracted or not heartwood are presented in Table 2.

Mass losses of the virulence controls ranged from 48.9% for *T. versicolor* to 50.2% for *P. sanguineus* for beech and 40.6% for *R. placenta* and 48.5% for *C. puteana* for pine sapwood. To be valid, the European standard EN 113 (1996) requires

Table 1 Extractives recovered from *C. edulis* heartwood sawdust with solvents with increased polarity

Solvent	Yields (%) ^a
Dichloromethane	1.1 \pm 0.2
Acetone	8.5 \pm 0.2
Toluene/ethanol	2.9 \pm 0.4
Water	3.6 \pm 0.2
Total	16.1 \pm 1

^aValues represent means of three replicates \pm one standard deviation

Table 2 Corrected mass loss of *C. edulis* wood blocks after 16 weeks of exposure to different fungi and classification of the corresponding durability based on EN 350-1

Species	<i>Trametes versicolor</i>		<i>Pycnoporus sanguineus</i>		<i>Rhodonia placenta</i>		<i>Coniophora puteana</i>	
	ML _{corrected} (%) ^a	Durability ranking ^b	ML _{corrected} (%) ^a	Durability ranking ^b	ML _{corrected} (%) ^a	Durability ranking ^b	ML _{corrected} (%) ^a	Durability ranking ^b
Beech control	48.9 ± 3	-	50.2 ± 9.5	-	-	-	-	-
Pine control	-	-	-	-	40.6 ± 7.5	-	48.5 ± 8.3	-
<i>C. edulis</i>	1.3 ± 0.4	1 (x=0.02)	1.28 ± 0.9	1 (x=0.02)	0.4 ± 0.1	1 (x=0.01)	0.5 ± 0.1	1 (x=0.01)
Extracted <i>C. edulis</i>	19.8 ± 0.9	3 (x=0.40)	17.5 ± 0.9	3 (x=0.35)	10.8 ± 0.9	2 (x=0.26)	12.8 ± 0.3	2 (x=0.27)

^aValues represent means of three replicates ± one standard deviation^b1 = Very durable; 2 = durable; 3 = moderately durable; 4 = slightly durable; 5 = not durable

minimum WL of 30%. All fungi tested met this requirement. Mass losses of all non-extracted heartwood blocks of *C. edulis* were less than 2%, regardless of the fungus used indicating that this species is resistant to attack by white or brown rot. These results are comparable to those obtained by Nzokou et al. (2005) and Saha Tchinda et al. (2018) for Cameroonian wood species. Mass losses obtained on *C. edulis* wood blocks previously subjected to extraction confirmed that extractives were critical for durability since mass losses were between 10.8 and 19.8% depending on the fungus. Similar results were obtained by Mohareb et al. (2010), who found higher mass losses after the extraction of *Cupressus lusitanica*. Kirker et al. (2013), also showed the role of extractives in naturally durable wood species. EN 350-1 (1996) classifies natural durability into five categories according to the ratio (x) of the mass loss measured in a durable species and the mass loss measured in a non-durable species used in a virulence control:

- Very durable (class 1) if $x < 0.15$
- Durable (class 2) if $0.15 < x < 0.30$
- Moderately durable (class 3) if $0.30 < x < 0.60$
- Slightly durable (class 4) if $0.60 < x < 0.90$
- Not durable (class 5) if $0.90 < x$

Non-extracted wood blocks were very durable according to this standard, while extraction clearly reduced durability without suppressing it completely (Table 2). The natural durability of *C. edulis* can largely be attributed to the presence of extracts rich in phenolic and polyphenolic compounds as indicated by the high extraction yields obtained with acetone. Indeed, numerous studies evaluating the effect of extractives on the inhibition of fungal growth (Seppänen et al. 2004; Eslyn et al. 1981; Diouf et al. 2002; Carrillo-Parra et al. 2012) concluded that phenolic compounds and terpenes were strong inhibitors. Thus, the presence of phenolic compounds in the extracts might help to predict natural durability against fungal attack. Another important point for fungi to degrade wood is the moisture content (MC). According to the literature, the moisture content of wood must be higher than 30%, so that fungi cause total wood degradation (Blanchette et al. 1990), while Zabel and Morrell (1992) claimed that moisture contents between 40 and 80% were highly preferable. Average moisture contents of wood blocks after 16 weeks of exposure to a fungal attack are presented in Table 3.

The moisture content of the blocks ranged from 20.8 to 53.7%, indicating that conditions were generally suitable for wood degradation. The results also indicated that extracted wood absorbed more moisture indicating that the extractives influenced wood moisture content. Steric hindrance and hydrophobic character of extractives may explain the higher water content of extracted samples (Rizanti et al. 2018).

Inhibition of fungal growth by extracts

Fractions extracted with dichloromethane had lower antifungal properties as demonstrated by the weak inhibition of fungal development (Fig. 1).

Table 3 Average moisture content of wood blocks after 16 weeks of exposure to fungal attack

Samples	Moisture content (%) ^a			
	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Rhodonia placenta</i>	<i>Coniophora puteana</i>
Beech control	50.3 ± 10.7	51.3 ± 4.9	–	–
Pine control	–	–	49.0 ± 5.3	53.7 ± 6.7
<i>C. edulis</i>	27.4 ± 0.9	27.1 ± 1.1	20.8 ± 1.0	25.7 ± 1.8
Extracted <i>C. edulis</i>	45.0 ± 4.4	40.9 ± 3.6	32.7 ± 8.0	43.5 ± 7.7

^aValues represent means of three replicates ± one standard deviation

Acetone, toluene/ethanol and water extracts presented significant antifungal properties. Growth of brown rot fungi began only on the sixth day with *R. placenta* and on the eighth day for *C. puteana* at 500 ppm concentrations. The higher concentrations (1000 ppm) completely inhibited mycelial growth. *P. sanguineus* did not start growing until the fifth day at 500 ppm and the sixth day at 1000 ppm. *T. versicolor* growth at 500 ppm and 1000 ppm started on the third day. Acetone, toluene/ethanol and aqueous fractions inhibited growth of the brown rot fungi more than the white rot fungi. Oxidizing enzymes such as laccases and peroxidases excreted by white rot fungi may be capable of degrading phenolic compounds such as extractive substances. These results are consistent with those obtained by Rosdiana et al. (2017) concerning the characterization of antifungal properties of bark extracts of different Indonesian species and numerous other studies (Mori et al. 1997; Novriyanti et al. 2010; Martínez-Sotres et al. 2012). Inhibitory effects also increased with extract concentration used (Obiang et al. 2016). Preliminary GC–MS analysis (results presented below) indicated the presence of gallic acid and ellagic acid in acetone and toluene/ethanol extracts, which may help explain the durability and mycelium growth inhibition. Phenolic compounds are known to affect membranes of microorganisms leading to leakage of the cytoplasmic content (Borges et al. 2013). The mechanism of inhibition depends on the ability of phenolic functions to affect cell lipoprotein membranes, thereby causing the weakening of ionic cellular homeostasis that destroys the entire cell structure (Zabka and Pavela 2013).

FTIR analysis

FTIR analysis of the different extracts is presented in Fig. 2.

Infrared analysis of the dichloromethane extracts revealed the presence of compounds different from those contained in acetone, toluene/ethanol or water extracts. Peaks at 2913, 2849 and 1462 cm⁻¹ are characteristic of the CH₂ and CH₃ elongation vibrations present in compounds such as waxes, greases and terpenes. The peak at 1732 cm⁻¹ indicated the presence of carbonyl groups C=O present in fatty acids of waxes, fats and wood polymers. Analysis of acetone, toluene/ethanol and water extracts indicated the presence of phenolic compounds characterized by the strong absorption band at 3218 cm⁻¹ corresponding to the elongation vibration of the –OH

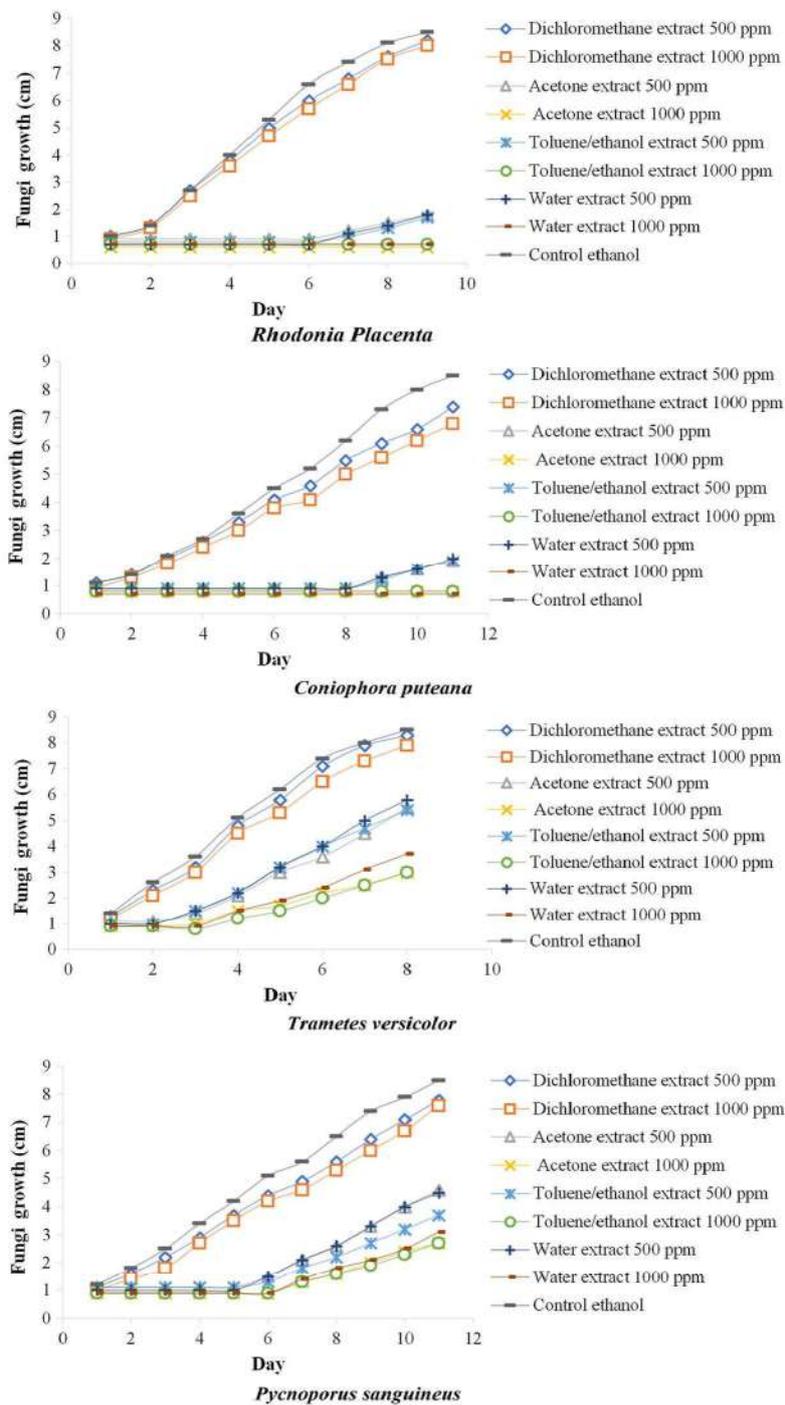


Fig. 1 Activity of extracts on the growth of the different fungi

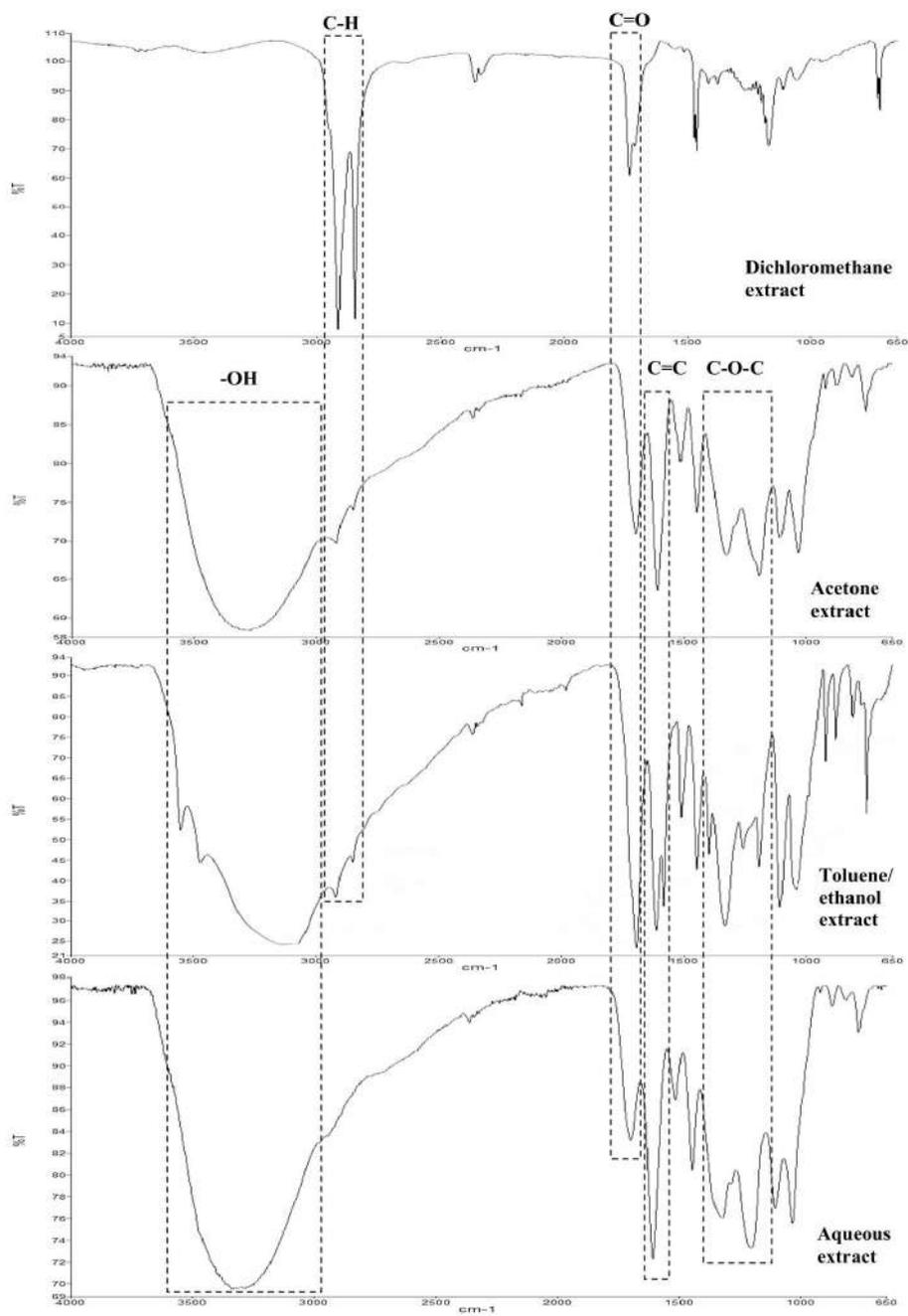


Fig. 2 FTIR analysis from *C. edulis* heartwood extracts

bond of the aromatic and aliphatic structures. The strong absorption bands at 1694, 1512 and 1445 cm^{-1} are characteristic of the elongation vibrations of C=C bonds of the aromatic ring, which can be attributed to aromatic compounds such as tannins, lignans, flavonoids or other phenolic compounds. Absorption bands at 1322 and 1191 cm^{-1} are ascribable to the C–O–C stretch elongation vibrations found in compounds such as flavonoids. These results corroborate the results obtained during fungal inhibition tests showing similar behaviors of acetone, toluene/ethanol and water extracts.

Phytochemical screening

Polyphenols, flavonoids and saponins were present in all fractions except in dichloromethane as evidenced by positive reactions with ferric chloride test for polyphenols, Shinoda test for flavonoids and aphrogenic power for saponins (Table 4). These phenolic compounds are known to have antioxidant, antibacterial and antifungal properties that may be responsible for the natural durability (Amusant et al. 2017). Alkaloids were present in toluene/ethanol and aqueous extracts (positive reaction with Mayer's reagent). Alkaloids have been identified as compounds with antifungal, antibacterial and antimicrobial activities in wood (Onuorah 2000; Wu and Lin 2001; Oliveira et al. 2010). Sterols and/or terpenes were present in small amounts only in the dichloromethane fraction, which reacted positively to the Liebermann–Burchard test. Previous studies on tropical woods (Mburu et al. 2007; Kilic and Niemz 2012) have also shown the presence of these compounds. These results are consistent with the ability of the extracts to inhibit fungal growth.

GC–MS analysis

GC–MS analysis of water extracts gave no exploitable results, even though FTIR analysis suggested spectra similar to those for acetone and toluene/ethanol (Fig. 2). Molecular weights of compounds contained in water were probably too high to allow

Table 4 Presence of collected extractives components in fractions extracted from the *C. edulis* heartwood sawdust

Active compounds	Test procedure	Extraction solvent ^a			
		Dichloromethane	Acetone	Toluene/ethanol	Water
Alkaloids	Mayer's reagent	–	–	+	+
Flavonoids	Shinoda test	–	+	+	+
Polyphenols	Iron(III) chloride	–	+	+	+
Saponins	Aphrogenic power	–	+	+	+
Sterols and terpenes	Liebermann–Burchard	+	–	–	–

+ / – = presence/absence of the active compounds

^aSolvent used to obtain the corresponding extracts

GC–MS analyses. GC–MS analysis of dichloromethane extracts indicated the presence of lipophilic compounds such as saturated or unsaturated fatty acids (Table 5).

Hexacosanoic acid was the major compound present in the dichloromethane extract. Gallic acid and ellagic acid were identified in the acetone and toluene/ethanol extracts. Gallic acid was the main product in the acetone extract, while ellagic acid predominated in the toluene/ethanol extracts (Fig. 3).

These phenolic compounds are known to have antifungal properties (Neya et al. 2004; Mburu et al. 2007; Saha Tchinda et al. 2018). The presence of these compounds could explain the natural resistance of *C. edulis* to fungal attack. Some of these compounds are also known to have numerous pharmacological properties such as antioxidant, antidiabetic, anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-mutagenic properties (Zhu and Zhang 2014; Liu et al. 2016; Zang et al. 2013). The GC–MS results support the phytochemical screening, FTIR analysis of the extracts obtained previously and the fungal growth inhibition tests.

Chemical composition

The extractives content obtained with the toluene–ethanol mixture (7.5%) was higher than that obtained with ethanol (4.6%) (Table 6).

The total extractable content (12.1%) was similar to that found by Miranda et al. (2011) on teak from East Timor and to previous values with sawdust subjected to successive extraction or block extraction. The particularly high lignin content (34.6%) in *C. edulis* is consistent with the higher lignin levels found in most tropical woods with very good natural durability. This is similar to the lignin content (32.2%) of East Timor teak (Miranda et al. 2011). Lignin is important for increasing timber durability, and elevated levels of lignin should enhance decay resistance (Poke et al. 2006; Van Geffen et al. 2010; Mounquengui et al. 2016).

Table 5 Compounds identified by GC–MS and their abundance relative to TIC

Solvent	Retention time (min)	Compound	Abundance (%)
Dichloromethane	22.64	Tetracosanoic acid	20
	25.31	Hexacosanoic acid	54
	27.68	Docosanoic acid	5
	29.68	Unknown	11
	33.74	Unknown	10
Acetone	16.09	Gallic acid	53
	20.31	Unknown	3
	21.38	Unknown	4
	22.73	Unknown	6
	24.46	Unknown	3
	28.22	Ellagic acid	30
Toluene/ethanol	16.09	Gallic acid	20
	28.29	Ellagic acid	80

TIC total ion current

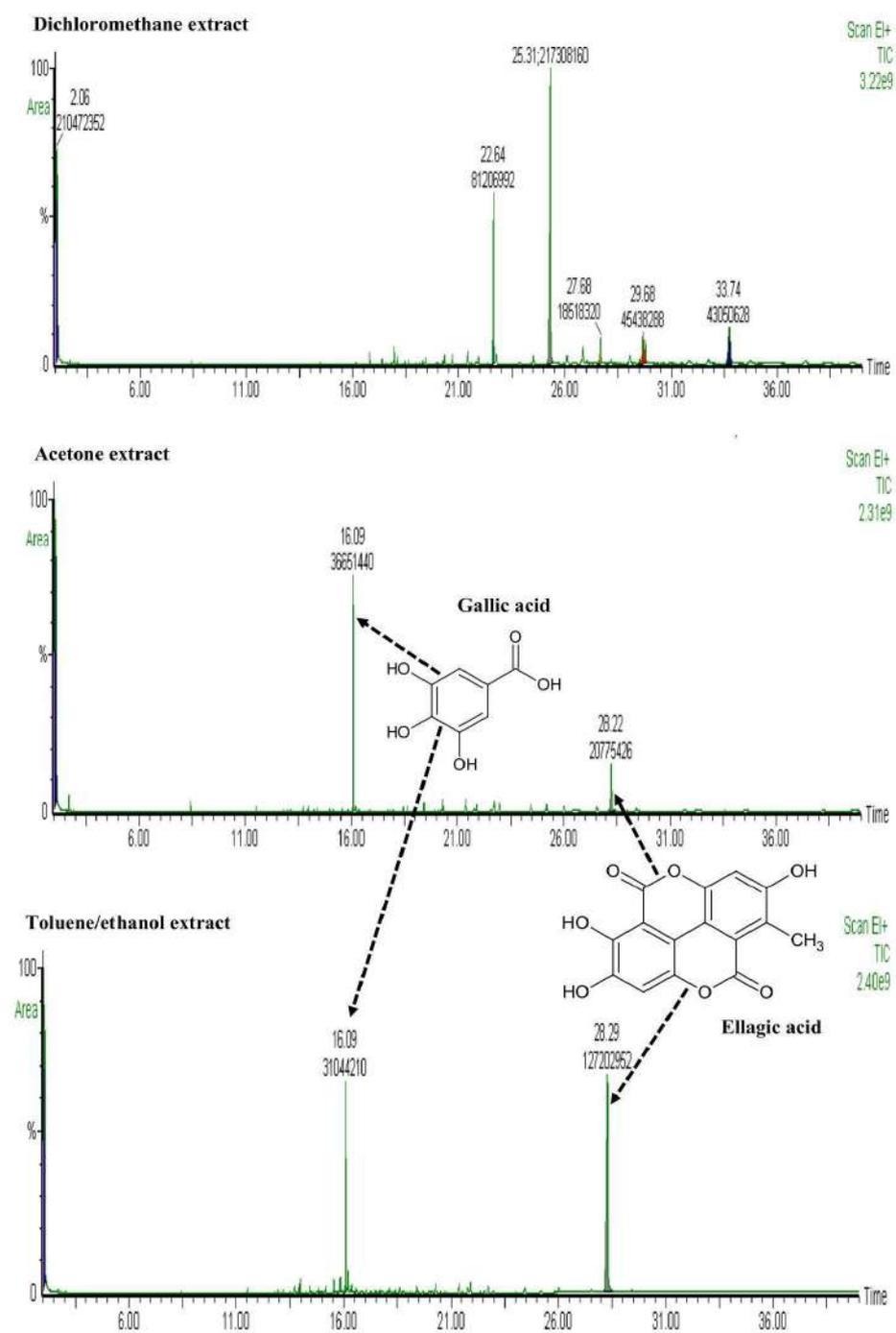


Fig. 3 GC-MS analysis from *C. edulis* heartwood sawdust extracts

Table 6 Chemical composition of heartwood of *Coula edulis*

Wood component	Content (%) ^c
Toluene/ethanol extractives	7.5 ± 0.1
Ethanol extractives	4.6 ± 0.2
Total extractives	12.1 ± 0.3
Klason lignin (% of wood)	34.6 ^a ± 0.4
Cellulose (% of wood)	46.9 ^a ± 0.6
Holocellulose (% of wood)	72.5 ^a ± 0.3
Hemicellulose	25.6 ^b ± 0.9

^aThe contents were obtained by independent experiments. Therefore, the sum of the values is different to 100%

^bHemicellulose content (%) = holocellulose content – cellulose content

^cValues represent means of three replicates ± one standard deviation

Conclusion

The effect of extractives on the natural durability of *C. edulis baill* was studied by means of Petri dish tests and decay tests on extracted or non-extracted heartwood blocks exposed to different brown rot and white rot fungi. Mass losses of extracted blocks were much greater than those measured on the non-extracted blocks, clearly indicating the effect of extractives on wood natural durability. This species can be classified as “very durable,” allowing utilization as construction wood for outdoor applications by local populations as an alternative to other wood species in Gabon. Growth inhibition tests have shown that most of the extracts exhibited important fungistatic effects against white rot and brown rot fungi at a concentration of 500 ppm and completely inhibited growth at 1000 ppm. GC–MS and FTIR analyses indicated the presence of polyphenolic compounds like gallic acid, ellagic acid and tannins, which may explain in great part the natural durability of this species. High lignin content of *C. edulis* wood was another important parameter to consider in order to explain the durability of this species.

Acknowledgements The authors first thank the National Agency of Grants and Internship of Gabon for the financial support through his chemistry thesis grant (Specialty Sciences of Wood and Fibers) on the person of Bopenga Bopenga Christ Stone Arnaud, and LERMAB is 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).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- AGEOS (2016) Report on the state of satellite coverage of the Gabonese forest heritage. Agence Gabonaise d'Etudes et d'Observations Spatiales/Gabonese Agency for Space Studies and Observations, Libreville
- Akinjogunla OJ, Yah CS, Eghafona NO, Ogbemudia FO (2010) Antibacterial activity of leave extracts of *Nymphaea lotus* (*Nymphaeaceae*) on *Methicillin* resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Vancomycin* resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) isolated from clinical samples. *Ann Biol Res* 1:174–184
- 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 Roh Werkst* 62:286–290
- Amusant N, Moretti C, Richard B, Prost E, Nuzillard M, Thévenon MF (2007) Chemical compounds from *Eperuafalcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). *Holz Roh Werkst* 65:23–28
- Antwi-Boasiako C, Barnett JR, Pitman AJ (2010) Relationship between total extractive content and durability of three tropical hardwoods exposed to *Coriolus versicolor* (Linnaeus) Quelet. *J Indian Acad Wood Sci* 7:9–13
- Antwi-Boasiako C, Pitman AJ (2009) Influence of density on the durabilities of three Ghanaian timbers. *J Sci Technol* 29:34–45
- Blanchette RA, Nilsson T, Daniel G, Abad A (1990) Biological degradation of Wood. In: Rowell RM, Barbour RJ (eds) *Advances in chemistry*, 225(6), 141–174. <https://dx.doi.org/10.1021/ba-1990-0225.ch006>
- Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simoes M (2013) Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist* 19:256–265
- Candelier K, Dumarçay S, Pétrissans A, Gérardin P, Pétrissans M (2013) Comparison of mechanical properties of heat-treated wood cured under nitrogen or vacuum. *Polym Degrad Stab* 98:1762–1765
- Carrillo-Parra A, Rosales M, Wehenkel C, Foroughbakhch R, González H, Garza F (2012) Phenols and flavonoids concentration and fungistatic activity of wood and bark of five common tropical species. *Trop Subtrop Agroecosyst* 15:621–628
- Chang ST, Wang SY, Wu CL, Su YC, Kuo YH (1999) Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwanian (*Taiwania cryptomerioides hayata*) heartwood. *Holz-forschung* 53:487–490
- Cirad (2008) Technical sheet for *Coula edulis*. File n° 197. In: Gérard J, Guibal D, Beauchêne J et al (eds) *Tropix 6.0*. Technological characteristics of 245 tropical species. Cirad, Montpellier
- Diouf PN, Delbarre N, Perrin D, Gérardin P, Rapin C, Jacquot JP, Gelhaye E (2002) Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation. *Appl Environ Microbiol* 68:4377–4382
- EN 113 (1996) Wood preservatives determination of toxic values of wood preservatives against wood destroying basidiomycetes cultured on agar medium
- EN 350-1 (1996) Durability and wood-bases products—testing and classification of durability to biological agent of wood and wood-based materials
- Esllyn WE, Bultman JD, Jurd L (1981) Wood decay inhibition by tropical hardwood extractives and related compounds. *Phytopathology* 71:521–524
- Guilley E, Charpentier JP, Ayadi N, Snackers G, Nepveu G, Charrier B (2004) Decay resistance against *Coriolus versicolor* in Sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.): analysis of the between-tree variability and correlations with extractives, tree growth and other basic wood properties. *Wood Sci Technol* 38:539–554
- Harborne BJ, Williams AC (2000) Review in advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* 55:481–504
- Hillis WE (1972) Formation and properties of some wood extractives. *Phytochemistry* 11:1207–1218
- Huang Z, Hashadi K, Makino R, Kawamura F, Kuniyoshi S, Ryuichiro K, Ohara S (2009) Evaluation of biological activities of extracts from 22 African tropical wood. *J Wood Sci* 55:225–229
- Houghton P, Raman A (1998) *Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts*. Springer, New York. ISBN 978-1-4615-5809-5
- Kilic A, Niemz P (2012) Extractives in some tropical woods. *Eur J Wood Prod* 70:79–83
- Kirker GT, Blodgett AB, Arango RA, Lebow PK, Clausen CA (2013) The role of extractives in naturally durable wood species. *Int Biodeterior Biodegradation* 82:53–58

- Kokutse AD, Stokes A, Bailleres H, Kokou K, Baudasse C (2006) Decay resistance of Togolese teak (*Tectona grandis* L.f) heartwood and relationship with colour. *Trees* 20:219–223
- Liu J, Meng C, Yan Y, Shan Y, Kan J, Jin C (2016) Structure, physical property and antioxidant activity of catechin grafted Tremella fuciformis polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 82:719–724
- Martínez-Sotres C, López-Albarrán P, Cruz-de-León J, García-Moreno T, Rutiaga Quiñones GJ, Vázquez-Marrufo G, Tamariz-Mascarúa J, Herrera-Bucio R (2012) Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *Int Biodeterior Biodegrad* 69:38–40
- Mburu F, Dumarçay S, Gérardin P (2007) Evidence of fungicidal and termicidal properties of *Prunus africana* heartwood extractives. *Holzforschung* 61:323–325
- Miranda I, Sousa V, Pereira H (2011) Wood properties of teak (*Tectona grandis*) from a mature unmanaged stand in East Timor. *J Wood Sci* 57:171–178
- Mohareb A, Sirmah P, Desharnais L, Dumarçay S, Pétrissans M, Gérardin P (2010) Effect of extractives on conferred and natural durability of *Cupressus lusitanica* heartwood. *Ann For Sci* 67:504–510
- Mounguengui S, Tchinda JBS, Ndikontar MK, Dumarçay S, Attéké C, Perrin D, Gelhaye E, Gérardin P (2016) Total phenolic and lignin contents, phytochemical screening, antioxidant and fungal inhibition properties of the heartwood extractives of ten Congo Basin tree species. *Ann For Sci* 73:287–296
- Mori M, Aoyama M, Doi S, Kanetoshi A, Hayashi T (1997) Antifungal activity of bark extract of deciduous trees. *Holz Roh Werkst* 55:130–132
- Moupela C, Vermeulen C, Daïnou K, Doucet JL (2010) African Hazel tree (*Coula edulis* Baill), a ignored forest non wood product. *Biotechnol Agron Soc Environ* 5:451–461
- Moupela C, Doucet JL, Daïnou K, Meunier Q, Vermeulen C (2013) *Coula edulis* Baill dissemination attempts by seeding and air layering, and its domestications perspectives. *Bois For Trop* 318:3–13
- Nascimento MS, Santana A, Maranhão CA, Oliveira LS, Bieber L (2013) Phenolic extractives and natural resistance of wood. In: Chamy R, Rosenkranz F (eds) Biodegradation—life of science. IntechOpen, Rijeka. doi:10.5772/56358.
- Ndukwe NA, Okiei WO, Alo BI (2012) Correlates of the yield of chemical pulp, lignin, and the extractive materials of tropical hardwoods. *Afr J Agric Res* 7:5518–5524
- Neya B, Hakkou M, Pétrissans M, Gérardin P (2004) On the durability of *Burkea africana* heartwood: evidence of biocidal and hydrophobic properties responsible for durability. *Ann For Sci* 6:277–282
- Niamké BF, Amusant N, Charpentier JP, Chaix G, Baissac Y, Boutahar N, Adima AA, Kati-Coulibaly S, 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
- Niamké BF, Amusant N, Stien D, Chaix G, Lozano Y, Kadio AA, Lemenager N, Goh D, Adima AA, Kati-coulibaly S, Jay-allemand C (2012) Dihydroxy-epiisocatalponol, a new naphthoquinone from *Tectona grandis* L.f. heartwood and fungicidal activity. *Int Biodeterior Biodegrad* 74:93–98
- Novriyanti E, Santosa E, Syafii W, Turjaman M, Sitepu IR (2010) Antifungal activity of wood extract of *Aquilaria crassna* Pierre ex *Lecomte* against agarwood-inducing fungi, fusarium solani. *J For Res* 2:155–165
- Nzokou P, Wehner K, Kamdem DP (2005) Natural durability of eight tropical hardwoods from Cameroon. *J Trop For Sci* 17:416–427
- Obiang CS, Ondo JP, Atome GRN, Engonga LCO, Siawaya JFD, Emvo EN (2016) Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial potential of stem barks of *Coula edulis* Baill. *Pseudospondias longifolia* Engl. and *Carapa klaineana* Pierre. From Gabon. *Asian Pac J Trop Dis* 6:557–563
- Oliveira LS, Santana LBDA, Maranhão AC et al (2010) Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. *Int Biodeterior Biodegrad* 64:711–715
- Onuorah EO (2000) The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. *Bioresour Technol* 75:171–173
- Poke FS, Potts BM, Vaillancourt RE, Raymond CA (2006) Genetic parameters for lignin, extractives and decay in *Eucalyptus globulus*. *Ann For Sci* 63:813–821
- Rizanti DE, Darmawan W, George B, Merlin A, Dumarçay S, Chapuis H, Gérardin C, Gelhaye E, Raharivelomanana P, Kartika Sari R, Syafii W, Mohamed R, Gérardin P (2018) Comparison of teak wood properties according to forest management: short versus long rotation. *Ann For Sci* 75:39
- Rosdiana NA, Dumarçay S, Gérardin C, Chapuis H, Santiago-Medina FJ, Sari RK, Syafii W, Gelhaye E, Raharivelomanana P, Mohammed R, Gérardin P (2017) Characterization of bark extractives of different industrial Indonesian wood samples for potential valorization. *Ind Crop Prod* 108:121–127

- Rowell RM (ed), Pettersens R, Han JS, Rowell JS, Tshabalala MA (2005) Cell wall chemistry, In: Handbook of wood chemistry and wood composites. Taylor & Francis, New York, pp 35–72
- Sablik P, Giagli K, Paril P, Baar J, Rademacher P (2016) Impact of extractive chemical compounds from durable wood species on fungal decay after impregnation of nondurable wood species. *Eur J Wood Prod* 74:231–236
- Saha Tchinda JB, Abia D, Dumarçay S, Ndikontar KM, Gérardin P, Noah NJ, Perrin D (2013) Antioxidant activities, total phenolic contents and chemical compositions of extracts from four Cameroonian woods: padouk (*Pterocarpus soyauxii* Taubb), tali (*Erythrophleum suaveolens*), moabi (*Bailonella toxisperma*), and movingui (*Distemonanthus benthamianus*). *Ind Crop Prod* 41:71–77
- Saha Tchinda JB, Pétrissans A, Molina S, Ndikontar KM, MOUNGUENGUI S, Dumarçay S, Gérardin P (2014) Study of the feasibility of a natural dye on cellulosic textile supports by red padouk (*Pterocarpus soyauxii*) and yellow movingui (*Distemonanthus benthamianus*) extracts. *Ind Crops Prod* 60:291–297
- Saha Tchinda JB, Ndikontar KM, Fouda Belinga AD, MOUNGUENGUI S, Njankouo JM, Dumarçay S, Gérardin P (2018) Inhibition of fungi with wood extractives and natural durability of five Cameroonian wood species. *Ind Crops Prod* 123:183–191
- Schultz TP, Nicholas DD (2002) Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54:47–52
- Seppänen SK, Syrjälä L, Von Weissenberg K, Teeri TH, Paajanen L, Pappinen A (2004) Antifungal activity of stilbenes in vitro bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding Pino-sylin synthase. *Plant Cell Rep* 22:584–593
- Skyba O, Douglas CJ, Mansfield SD (2013) Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi. *Appl Environ Microbiol* 79:2560–2571
- Song T, Pranovich A, Holmbom B (2012) Hot-water extraction of ground spruce wood of different particle size. *BioResources* 7:4214–4225
- Taylor AM, Gartner BL, Morrell JJ (2002) Heartwood formation and natural durability—a review. *Wood Fiber Sci* 34:587–611
- Van Geffen KG, Poorter L, Sass-Klaassen U, Van Logtestijn RSP, Cornelissen JHC (2010) The trait contribution to wood decomposition rates of 15 Neotropical tree species. *Ecology* 91:3686–3697
- Wu TS, Lin FW (2001) Alkaloids of the wood of *Cryptocarya chinensis*. *J Nat Prod* 64:1404–1407
- Zabel RA, Morrell JJ (1992) Wood microbiology, decay and its prevention. Academic Press, Orlando
- Zabka M, Pavela R (2013) Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 93:1051–1056
- Zang H, Liua M, Hana S, Wei Y (2013) Optimizing the extraction of catechin from peanut red skin using response surface methodology and its antioxidant activity. *IERI Procedia* 5:312–320
- Zhu W, Zhang Z (2014) Preparation and characterization of catechin-grafted chitosan with antioxidant and antidiabetic potential. *Int J Biol Macromol* 70(150):155

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

IRG/WP 17-60428

THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION

Guidelines for the preparation of an IRG document

NB

Please note that papers received after the deadline 1 March 2019 will be posted on the website (Compendium) but the opportunity to make an oral presentation will be at the discretion of the Scientific Programme Committee chair. These papers may be presented as posters at the meeting. Deadline for submitting extended abstract or short papers for poster presentations is 15 March 2019.

**IRG SECRETARIAT
Box 5604
SE-114 86 Stockholm
Sweden
www.irg-wp.com**

1

Note: This page will not be printed as part of the IRG-WP document.

Dear author of the IRG document!

Allocation of the documents to different sections is one of the most challenging tasks for the Scientific Programme Committee (SPC). In order to prepare good programme for the upcoming conference, we would like to ask you for assistance. Please tick, the most appropriate Working Party, where your document fits most. SPC will try to consider your opinion.

Section 1. Biology	WP 1.1. Soft rot, bacteria, bluestain and moulds	<input type="checkbox"/>
	WP 1.2. Basidiomycetes	<input type="checkbox"/>
	WP 1.3. Insect biology and testing	<input type="checkbox"/>
	WP 1.4. Natural durability	X
	WP 1.5. Marine	<input type="checkbox"/>
	WP 1.6. Cultural Artefact Protection	<input type="checkbox"/>
Section 2. Test Methodology and Assessment	WP 2.1. Prediction of service life	<input type="checkbox"/>
	WP 2.2. Microbial test methodology	<input type="checkbox"/>
	WP 2.3. Chemical/physical analysis	<input type="checkbox"/>
	WP 2.4. International Standardisation	<input type="checkbox"/>
Section 3. Wood Protecting Chemicals	WP 3.1. Inorganic preservatives	<input type="checkbox"/>
	WP 3.2. Organic preservatives	<input type="checkbox"/>
	WP 3.3. Performance - lab & field tests	<input type="checkbox"/>
	WP 3.4. Fire retardants	<input type="checkbox"/>
Section 4. Processes and Properties	WP 4.1. Chemical wood modification	<input type="checkbox"/>
	WP 4.2. Wood composites, WPCs and Engineered wood products	<input type="checkbox"/>
	WP 4.3. Treating processes & treatability of timber	<input type="checkbox"/>
	WP 4.4. Coatings, hydrophobic treatments and surface aspects	<input type="checkbox"/>
	WP 4.5. Thermal wood modification	<input type="checkbox"/>
	WP 4.6. Fire protection	<input type="checkbox"/>
	WP 4.7. Protection by design	<input type="checkbox"/>
Section 5. Sustainability and Environment	WP 5.1. Environment	<input type="checkbox"/>
	WP 5.2. Sustainability	<input type="checkbox"/>

This document is intended for full oral or short presentation combined with a poster?

- X My contribution is intended for full oral presentation (15 min.+ Question time)
 My contribution is intended for short oral (3 min., 1-3 slides) + poster presentation
 My contribution is intended for poster presentation only

**This document will most probably be presented by: BOPENGA BOPENGA Christ Stone A
 iniestabopenga@gmail.com**

This paper will be listed as part of the proceedings according to Thomson-Reuters index system

THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION

Section Y

VVVVVVVVVV

***Coula edulis baill* an unknown wood species as an alternative to the main durable wood species used in Gabon**

Bopenga Bopenga C. S. A.¹, Dumarçay S.¹, Edou Engonga P.², Gérardin P.¹

¹ Université de Lorraine, INRA, EA 4370 USC 1445 LERMAB, Faculté des Sciences et Technologie, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

²LAPLUS, Multidisciplinary Laboratory of Sciences of Libreville, BP 17009 Normal Superior School, Gabon

Christ-stone-arnaud.bopenga-bopenga@univ-lorraine.fr ; philippe.gerardin@univ-lorraine.fr

Paper prepared for the IRG50 Scientific Conference on Wood Protection
Quebec, Canada
12 – 16 May 2019

Disclaimer

The opinions expressed in this document are those of the author(s) and are not necessarily the opinions or policy of the IRG Organization.

IRG SECRETARIAT
Box 5604
SE-114 86 Stockholm
Sweden
www.irg-wp.c

***Coula edulis baill* an unknown wood species as an alternative to the main durable wood species used in Gabon**

Bopenga Bopenga C. S. A.¹, Dumarçay S.¹, Edou Engonga P.², Gérardin P.¹

¹ Université de Lorraine, INRA, EA 4370 USC 1445 LERMAB, Faculté des Sciences et Technologie, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

²LAPLUS, Multidisciplinary Laboratory of Sciences of Libreville, BP 17009 Normal Superior School, Gabon

Christ-stone-arnaud.bopenga-bopenga@univ-lorraine.fr ; philippe.gerardin@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

The Congo Basin hosts an exceptional biodiversity of trees, flora and fauna. However, the immense natural heritage of the forests in this area is increasingly threatened by many anthropogenic factors, due to selective exploitation of certain wood species. In Gabon, whose ecosystem is representative of this area, the forest represents nearly 80% of the national territory. Only a minority of wood species is exploited because of their high market value (Ageos, 2015). The direct consequences of this selective exploitation are the decrease of the disponibility and even the eventual disappearance of certain wood species associated to the fast-growing international tropical timber markets. This is the case for kevazingo, which is classified as an endangered species and therefore prohibited from exploitation. In addition to these main exploited species, several less known species are available in Gabon. This is the case of the Gabonese hazelnut tree (*Coula edulis baill*), whose wood is used by local populations for its longevity because of its resistance to fungi, insects and more particularly termites. It is used to make forge coal and is used in the construction of huts such as posts and lintels (Moupela C *et al*, 2010-2013). In this context, it seemed interesting to study more in detail this species, having for the moment been the subject of little scientific investigations. The aim of this study was to investigate the natural durability of *Coula edulis* and the reasons of this latter one based on wood chemical composition. For this purpose, durability tests were carried out in *Petri* dishes on native and extracted samples of heartwood towards brown rot (*Poria placenta* and *Coniophora puteana*) and white rot (*Coriolus versicolor* and *Pycnoporus sanguineus*) fungi showing that unextracted samples presented higher durability to fungi. Fungal growth inhibition tests carried out with different concentrations of extractives confirmed their important fungicidal effects. Percentage of the different wood polymers and chemical composition of wood extractives were evaluated to find correlation between durability and wood chemistry. Results indicated that natural durability of *Coula edulis* could be explained by several reasons like the high density and hydrophobicity of its wood as well as its high lignin and extractives contents. Chemical analysis performed on extractives by GC-MS indicated the presence of gallic acid, quercetin and tannins.

Keywords: *Coula edulis baill*, Durability, Gabonese hazelnut, Chemical composition, Antifungal.

1. INTRODUCTION

The uses of wood throughout the ages tell the story of man. Used by man since time immemorial, its use has influenced the evolution of civilizations. There is a long list of arguments in favor of wood as a building material. Natural, renewable, biodegradable: wood is the ecomaterial par excellence. It can be used indoors or outdoors as a packaging, plywood and panel. As for its qualities, they are both aesthetic and technical. It becomes unavoidable. For all these applications, the wood must have good natural resistance to insect and fungus attack, as

well as good dimensional stability and good weather resistance (Ali *et al*, 2011). The natural resistance of wood to fungus or decomposition by insects is defined as its ability to resist biological degradation and contribute to the natural durability of wood. In reality, only the heartwood (heartwood) of some species is durable; sapwood in general in all tree species is relatively unsustainable. Although there are several controversies about the roles of hydrophobic properties, density, and the natural durability of wood (Neya *et al*, 2004, Antwi-Boasiako and Pitman 2009, Oliveira *et al*, 2010; Skyba *et al*, 2010-2013). Nevertheless, the authors all agree on the role played by the structure of lignin but especially that of extractables on the natural durability of wood. Extractable content varies widely in wood (Antwi-Boasiako *et al*, 2010; Kilic and Niemz 2012; Ndukwe *et al*, 2012). Extractables are low molecular weight substances found in the porous structure of wood. These are generally lipophilic or hydrophilic secondary metabolites, that is, compounds that are not essential for tree growth. The content and composition of the extractive substances vary according to the wood samples, the part of the tree, its age, the geographical location of the harvest, the season of the harvest as well as the period and storage conditions. Extractive substances are responsible for wood characteristics such as color, odor, natural durability and acoustic properties (Aloui *et al*, 2004). They protect wood from ultraviolet rays, pathogens and herbivores (Harborne and Williams, 2000). They consist of several families of compounds such as terpenoids, waxes and fats and phenolic compounds. Phenolic compounds are the most important class of compounds that, in previous studies, possessed antifungal, antioxidant, and other properties that are potentially valuable. In addition, in naturally sustainable woods there are toxic compounds that are generally polyphenols such as tannins, flavonoids and stilbenes (Schultz and Nicholas, 2002; Oliveira *et al*, 2010; Nascimento *et al*, 2013). Some species also have non-phenolic extractives such as quinones and terpenoids. For example, the molecules responsible for the natural durability of *Tectona grandis* consist of toxic quinones, which have fungicidal properties (Niamké *et al*, 2011-2012). Polyphenols can also be used as an antioxidant and used for food preservation to replace products such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). It has also been reported that the toxicity of extractive substances correlates with their antioxidant activity (Schultz and Nicholas 2002, Amusant *et al*, 2007). It should be noted that the most potent agents involved in wood biodegradation are fungi and termites (Onuorah 2000, Kokutse *et al*, 2006, Mburu *et al*, 2007, Antwi-Boasiako *et al* 2010). Most studies on naturally sustainable wood in temperate zones are well documented (Aloui *et al*, 2004; Guilley *et al*, 2004; Kirker *et al*, 2013), but there is very little information on the natural Congo Basin forest in general and Gabon in particular (CIRAD 2008, Nzokou *et al*, 2005, Antwi-Boasiako and Pitman 2009, Antwi-Boasiako *et al*, 2010) despite huge foreign exchange earnings and growing potential creating wealth in this sector. The Congo Basin hosts an exceptional biodiversity for trees as well as for flora and fauna. However, the immense natural heritage of forests in this area is increasingly threatened by many anthropogenic factors, at the head of which is the selective exploitation of certain wood species. In Gabon, whose ecosystem is representative of this zone, the forest heritage represents nearly 80% of the national territory. Only a minority of wood species is exploited because of their high market value (Ageos, 2015). The direct consequences of this selective exploitation are the rarefaction, or even the eventual disappearance of certain wood species. This is the case of kevazingo, classified as an endangered species and therefore prohibited to exploitation. In addition to these main exploited species, several less known species are available in Gabon. This is the case of the Gabonese hazel (*Coula edulis baill*), whose wood is used by the local populations for its longevity because of its resistance to fungi, insects and more particularly to termites. Its wood is used in the construction of huts as poles or lintels (Moupela C *et al*, 2010-2013). In this context, to better understand the reasons for the natural durability of this species, it seemed interesting to study it in more detail, having for the moment been the subject of few scientific studies. For this we have: (i) Study the effect of extractibles on natural durability. (ii) Study the effect of extractable inhibition on the growth of brown and white rot fungi. (iii)

Characterize and analyze the extractables. The general objective of this work is to promote the quality of the little known tropical woods of the Congo Basin, particularly Gabon as *Coula edulis baill*, while looking for new biocidal products in the fields (wood preservation, cosmetics, etc. ...).

2. Experimental methods

2.1. Reagents

Concentrated sulfuric acid (95-97%), concentrated hydrochloric acid (37%), dichloromethane, acetone, absolute ethanol, toluene, methanol, BSTFA/1% TMCS, iron perchloride, magnesium turn, chloroform, acetic anhydride were purchased from Sigma-Aldrich, Carlo Erba or Prolabo and used without further purification. Ultrapure water obtained from a PURELAB Option-Q equipment (Elga) was used. Mayer's reagent (potassium mercuric iodide solution), Bouchardat reagent (2% iodine in a 4% solution of potassium iodide), iron perchloride 10% solution in water and Shinoda reagent (magnesium turn in hydrochloric acid) were prepared in laboratory from reagent-grade chemicals using literature procedures. Malt extract for microbiology and agar were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Material

All the experiments were carried out on the heartwood of Gabon hazel (*Coula edulis baill*) from a 50 cm log of the trunk taken between 1.50 and 2.50 m above the ground. The tree was harvested at the Ayémé primary forest in Gabon located in the estuary province. Tree age has been estimated between 50 and 75 years. $30 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$ heartwood blocks were manufactured in the longitudinal, radial and tangential directions, respectively. As needed, the blocks were randomly used for the different tests performed. The sawdust of *C. edulis baill* obtained from the sizing of the test blocks was crushed into a fine powder using a ball mill (Retsch SM 100), sieved ($\text{Ø} = 0.160\text{mm}$) and stored in glass flasks after drying in an oven at $70 \text{ }^\circ\text{C}$ to avoid extractives degradation.

2.3. Extraction

10 g of finely ground dried heartwood was successively Soxhlet extracted for 24 hours with solvents of increasing polarity: dichloromethane, acetone, toluene-ethanol (2/1, v/v) and water. Each extraction was triplicated. After extraction, the solvent is removed using a rotary evaporator under vacuum, except for the aqueous extracts which have been lyophilized. The extracts are then dried in a desiccator under vacuum in the presence of P_2O_5 and weighed regularly until constant mass (m_e). The yield of extract is determined using equation 1:

$$\text{Yield of extract (\%)} = [(m_e) / m_s] \times 100 \quad (1)$$

Where m_e is the mass of extract and m_s the mass of sawdust used for extraction. The extracts are then recovered and stored in closed bottles in the dark (Neya *et al*, 2004, Mburu *et al*, 2007). Blocks of heartwood were extracted to evaluate effect of extractives on wood decay durability. The blocks were Soxhlet extracted for three weeks using acetone-water (1/1, v/v). The blocks were then dried at $103 \text{ }^\circ\text{C}$ and weighed (m_1). The yield of extraction is determined using equation 2.

$$\text{Yield of extraction (\%)} = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100 \quad (2)$$

Where m_0 is the anhydrous mass of the blocks before extraction dried at 103°C and m_1 the anhydrous mass of the blocks dried at 103°C after extraction

2.4. Micro-organisms

Two white rot *Coriolus versicolor* (CV) ((Linneus) L. Quélet strain CTB 863 A) and *Pycnoporus sanguineus* (PS) ((L.: Fr.) Murrill, 1904) and two brown rot *Poria placenta* (PP) ((Fries) Cooke sensu J. Eriksson, strain FPRL 280) and *Coniophora puteana* (CP) ((Schumacher ex Fries) Karsten, strain BAM Ebw. 15) were used for wood durability and growth inhibition tests.

2.5. Decay durability tests

The agar medium was prepared by adding to a glass bottle 40 g of malt extract and 30 g of agar in 1 L of water. The agar solution is sterilized in an autoclave at 120 °C for 25 minutes. After sterilization and cooling at about 40 °C, the agar medium is poured into 9 cm Petri dishes and left for jellification (about 1 to 2 hours) under the horizontal laminar flow hood in order to avoid contaminations. After solidification of the media, Petri dishes are inoculated near a flame in their centers with a piece of freshly grown mycelium of the different fungal strains. The manipulations are carried out using a stainless steel spatula constantly passed under the flame of a Bunsen burner. Each box is then covered and sealed with parafilm. Petri dishes are stored in a climatic chamber at 22 °C and 70% relative humidity for 15 days to allow growth of the mycelium at the surface of the media. After full colonization of the surface by the mycelium, 3 dried blocks of extracted (m_1) or not (m_0) heartwood of *C. eduli baill* were placed on small sterilized plastic grids in each Petri dishes. Each experiment was repeated four times. Beech (*fagus sylvatica*) wood was used as virulence control for white rot fungi and pine sapwood (*Pinus sylvestris linnaeus*) for brown rot fungi. Extracted and unextracted samples of *C. eduli baill* heartwood were also placed on sterile culture medium without fungal inoculation to evaluate mass losses due to diffusion of extractives. The Petri dishes are sealed with parafilm and incubated in a climatic chamber at 22°C and 70% relative humidity for 16 weeks. At the end of the test, wood blocks were removed from the Petri dishes, the adherent mycelium removed gently and the wood blocks immediately weighed to obtain wet mass (m_2) for calculation of wood moisture at the end of the fungal test. The blocks were finally dried for 48 hours at 103 °C until constant mass (m_3). The mass loss (ML) caused by fungal attack and the moisture content (MC) are determined as follows:

$$\text{ML (\%)} = ((m_0 \text{ or } m_1) - m_3) / (m_0 \text{ or } m_1) \times 100 \quad (3)$$

$$\text{MC (\%)} = ((m_2 - m_3) / m_3) \times 100 \quad (4)$$

where m_0 is the initial dried mass of unextracted blocks, m_1 the dried mass of extracted blocks before fungal exposure, m_2 the mass of wet blocks after fungal exposure and m_3 the dried mass of blocks after fungal exposure

Corrected mass loss was calculated as follows:

$$\text{ML}_{\text{corrected}} (\%) = \text{ML} (\%) - \text{ML}_{\text{diffusion}} (\%) \quad (5)$$

Where $\text{ML}_{\text{diffusion}}$ is the mean of mass loss values obtained for diffusion tests.

2.6. Inhibition of fungal growth by extracts

Growth inhibition tests were performed according to the method of Chang *et al.* (1999) with a slight modification. The agar media were prepared in 100 mL Erlenmeyer flasks by adding 4 g of malt and 2 g of agar to 96 g of water. Erlenmeyer containing agar solutions were closed by carded cotton wrapped in an aluminum foil and sterilized in an autoclave at 120 °C for 25 minutes. 50 mg or 100 mg of the different extracts solubilized in the minimum amount of ethanol (1 mL maximum) were mixed under laminar flow hood with malt agar media directly in each Erlenmeyer after sterilization to obtain culture media containing 500 ppm or 1000 ppm of

extracts respectively. After cooling to about 40 °C, the content of each Erlenmeyer flask containing the different extract concentrations was poured in 9 cm diameter Petri dishes near a flame to obtain 5 Petri Dishes containing approximately 20 mL of malt agar implemented or not with extracts. The media are left standing under the hood for jellification. After solidification, the culture media were inoculated in their centers with a piece of freshly grown mycelium of the different fungal strains. For each fungus and each concentration, 3 Petri dishes without extract and 3 Petri dishes with extracts were prepared. The dishes were incubated at 22 °C and at 70% RH in a Binder KBF 115 climatic chamber. Mycelium growth was assessed by measuring two perpendicular diameters of the colony in the dishes daily until the mycelium have completely colonized the surface of the control plates, approximately 10 to 15 days depending on the fungal strain. The test is then stopped and the results presented as growth curves according to time.

2.7. Fourier transformed infrared spectroscopy analysis

Extracts were analyzed by FTIR ATR spectroscopy using a Nicolet 6700 infrared spectrophotometer Thermo-Scientific Computer-linked and controlled by OMNIC software.

2.8. Phytochemical Screening

The reagents used to carry out the phytochemical screening of the extractables were prepared and used according to the protocols described in the literature (Vigor *et al.*, 2009; Akinjogunla *et al.*, 2010). 10% iron perchloride was used for the detection of polyphenols; Mayer and Bouchardat reagents for the detection of alkaloids; the turn of magnesium (shinoda reaction) for the detection of flavonoids and the Liebermann-Buchard reagent for the detection of sterols and terpenes. For the detection of saponins (Uddin *et al.* 2011) the foaming test was carried out. These are standard tests in phytochemistry and pharmacology.

2.9. GC–MS analysis

The GC-MS analysis was carried out using a Perkin Elmer Clarus 680 gas chromatograph, coupled to a Perkin Elmer Clarus SQ8 mass spectrometer, a set driven by the Turbo Mass v software. 6.1 and having a NIST database (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) (2011 edition). Before injection, the samples are derived to facilitate the detection of all compounds present. For this purpose, 1 to 2 mg of extractables are solubilized with 50 µl of 1% BSTFA + TMSCL (a silylating agent) in a 2 ml pillbox. This preparation will be placed for 120 minutes, pill closed, in an oven at 70 °C, to allow the reaction of the bypass agent on the extractables. The pillbox is then opened to let the BSTFA evaporate. 1 mL of ethyl acetate is finally added to the pill pillar to solubilize the silyl extractables, then 1 µL of the latter solution is injected in splitless mode in the GC, via an injector heated to 250 °C. The chromatographic separation is carried out with a stationary phase DB-5MS (95% dimethyl- / diphenyl-polysiloxane / 5%; length: 30m; internal diameter: 0.25mm; film thickness: 0.25µm) with a temperature program of oven of 40 min, comprising a 2 min. Bearing at 80 °C., a rise at 10 °C. min-1 up to 190 °C., a rise at 15 °C. min-1 up to 280 °C., maintained temperature then for 10 min and finally a last plateau at 300 °C reached at 10 °C.min-1 and maintained 14 min and a mobile phase consisting of Helium at 1 mL / min. After separation, the compounds are sent to the mass spectrometer via a transfer line thermostated at 250 °C. and then ionized at 70 °C. The source and transfer line temperatures were 180 and 250 °C respectively. The detection was carried out in scanning mode: $m/z = 45$ at $m/z = 700$. The detector was deactivated during the first 2 minutes. The compounds were identified by comparison with the spectra of the NIST mass spectral database.

3. Results and Discussion

3.1. Extractives contents

3.1.1. Extraction of sawdust

Extraction was carried out using solvents of increasing polarity to investigate the quantities of the different types of extractives. The results are shown in Table 1.

Table 1. Extract of *C. edulis* heartwood sawdust according to solvent polarity

Solvent	Yields (%)
Dichloromethane	1.1 ± 0,2
Acetone	8.5 ± 0,2
Toluene/ethanol	2.9 ± 0,4
Water	3.6 ± 0,2
Total	16.1 ± 1

It can be seen from Table 1 that the extract yield varies from one solvent to another. These results are in agreement with the literature. The yield obtained with dichloromethane (1.1%) is the lowest. This is probably due to the presence of low amounts of non-polar compounds in *C. edulis* heartwood and the low polarity of dichloromethane not allowing extraction of more polar compounds. The highest extract content was obtained with acetone (8.5%). Note that none of the solvents used is able to extract all extractives alone because of their different solubility, some compounds being hydrophilic other lipophilic. According to literature, non-polar solvents mainly extracted apolar substances (oils, grease, terpenes), while polar solvents solubilize polar compounds such as polyphenols (lignans, stilbenes, flavonoids, tannins...). The successive extraction, which combines apolar and polar solvents, makes it possible to classify the extractives into different fractions according to their solubility, while the total of extractives content gives an idea of the overall amount of extractives. The total yield of extractives reached 16.1%, which is in agreement with the extractives content present in tropical species (Huang *et al*, 2009, Mburu *et al*, 2007, Neya *et al*, 2004, Sablik *et al*, 2016, Saha Tchinda *et al*, 2013, 2014). Heartwood is the non-living part of the tree that usually contains large amounts of extractives. Many authors have shown that the natural durability of wood is due to the quantity and chemical composition of extractive substances suggesting that that extractives present in *C. edulis* may be involved in wood durability (Haupt *et al*, 2003, Nascimento *et al*, 2013, Jebrane *et al*, 2014).

3.1.2. Extraction of wood blocks

To evaluate effect of extractives on wood durability, *C. edulis* wood blocks were extracted with Soxhlet using a mixture of acetone and water (v/v) in order to remove all types of compounds independently of their solubility in organic solvent or water. A duration of three weeks was chosen to improve extraction, which is known to be more difficult on blocks due to a lower exchange surface compared to sawdust (Song *et al*, 2012). Indeed, evaluation of the effect of extractives can be envisaged, only if total extraction of wood blocks is achieved. After successive extraction, the total extraction yield was estimated to 16.1 % on sawdust. The average total extraction yield of the blocks extracted during 3 weeks with acetone/water was measured to 12.9%. As expected, extraction was slightly less effective on wood blocks than on the sawdust, however the two values are of the same order of size allowing to envisage the effect of extractives on wood durability tests.

3.2. Natural resistance of wood blocks against fungal attack

Results concerning white rot and brown rot decay durability of *C. edulis* extracted or not heartwood are presented in table 2.

Table 2. Corrected mass loss of *C. edulis* wood blocks after 16 weeks exposure to different fungi

Sample	ML _{corrected} (%)			
	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Poria placenta</i>	<i>Coniophora puteana</i>
Beech control	48.9 ± 3	50.2 ± 9.5	-	-
Pine control	-	-	40.6 ± 7.5	48.5 ± 8.3
<i>C. edulis</i>	1.3 ± 0.4	1.28 ± 0.9	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Extracted <i>C. edulis</i>	19.8 ± 0.9	17.5 ± 0.9	10.8 ± 0.9	12.8 ± 0.3

It appears from this table that after 16 weeks of exposure, the mass losses of the virulence controls ranged from 48.9 % for *Coriolus versicolor* to 50.2 for *Pycnoporus sanguineus* for beech and 40.6 for *Poria placenta* and 48.5 for *Coniophora puteana* for pine sapwood. To be valid, the weight losses of control samples must be greater than 30% according to the European standard EN 113, indicating that virulence of all fungi tested can be validated. Table 2 also shows that mass losses of all non-extracted heartwood blocks of *C. edulis* are inferior to 2%, regardless of the fungi used. It can therefore be said that this species presents a good resistance to fungal attack (white or brown rot). These results are comparable to those obtained by Nzokou *et al.* (2005) and Saha Tchinda *et al.* (2018), who worked on the natural durability of Cameroonian wood species. Many factors could explain the durability of the studied species including its density, lignin content, presence of inorganic compounds like silica, presence of extractive compounds such as phenolic compounds, and many other like age, geographical area... Of all the listed factors, many authors agree with the importance of extractive content to explain wood natural durability. Mass losses obtained on *C. edulis* wood blocks previously subjected to extraction confirm this hypothesis. Indeed, all mass loss recorded on *C. edulis* blocks subjected to previous extraction are comprised between 10.8 and 19.8% depending of the nature of the fungus used indicating without ambiguity the importance of extractives on natural durability. Similar results were obtained by Mohareb *et al.* (2010), who found that after the extraction of *Cupressus lusitanica* wood blocks, weight losses become much greater than for non-extracted samples. Our results are also similar with those of Kirker *et al.* (2013) showing the the role of extractives in durability of naturally durable wood species. According to EN 350-1 (1994), natural durability of a wood species may be classified into five different categories according to the ratio (x) corresponding to the mean mass loss of the studied species on the mean mass loss of non-durable wood species used as virulence control.

- Very Durable (class 1) if $x < 0.15$
- Durable (class 2) if $0.15 < x < 0.30$
- Moderately Durable (class 3) if $0.30 < x < 0.60$
- Weakly Durable (class 4) if $0.60 < x < 0.90$
- Non Durable (class 5) if $0.90 < x$

The values of the corrected mass losses obtained made it possible to classify the natural durability of the species studied according to EN350-11994 compared to the fungi used. The results are shown in Table 3 below

Table 3. Classification of durability based on EN 350-1

Sample	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Poria placenta</i>	<i>Coniophora puteana</i>
<i>C. edulis</i>	1 (x=0.02)	1 (x=0.02)	1 (x=0.01)	1 (x=0.01)
Extracted <i>C. edulis</i>	3 (x=0.40)	3 (x=0.35)	2 (x=0.27)	2 (x=0.26)

Table 3 shows that the wood blocks not extracted were very durable according to this standard. After extraction the results clearly showed that durability of *C. edulis* decreased. When the extractives are removed, the wood generally becomes more vulnerable to fungal attack. The natural durability of *C. edulis* can largely be attributed to the presence of extracts rich in phenolic and polyphenolic compounds due to the high yield of extraction obtained with acetone. Indeed, numerous studies evaluating effect of extractives on the inhibition of fungal growth (Seppänen *et al*, 2004; Eslyn *et al*, 1981; Diouf *et al*, 2002; Carrillo-Parra *et al*, 2012) concluded that phenolic compounds and terpenes presented very high inhibitory activity. Thus, the potential presence of phenolic compounds in the extracts could justify its natural durability against fungal attacks. Another important point for fungi to degrade wood is the moisture content (MC). According to the literature, the moisture content of wood must be greater than 20% in temperate zones and 30% in tropical zones, so that fungi cause total wood degradation (Blanchette *et al*, 1990). If the moisture content of the wood is below this level, the weight loss data cannot be exploited. The moisture content of the wood blocks was therefore evaluated at the end of fungal exposure after 16 weeks. The results of the moisture content are shown in Table 4.

Table 4. Moisture content of wood blocks after 16 weeks of exposure to a fungal attack

Samples	Moisture content (%)			
	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Poria placenta</i>	<i>Coniophora puteana</i>
Beech control	50.3 ± 10.7	51.3 ± 4.9	-	-
Pine control	-	-	49.0 ± 5.3	53.7 ± 6.7
<i>C. edulis</i>	27.4 ± 0.9	27.1 ± 1.1	20.8 ± 1.0	25.7 ± 1.8
Extracted <i>C. edulis</i>	45.0 ± 4.4	40.9 ± 3.6	32.7 ± 8.0	43.5 ± 7.7

Table 4 shows that after 16 weeks of exposure to 70% humidity at 22 °C, the moisture content of the blocks ranges from 20.8 to 53.7, indicating suitable condition for wood degradation. It also shows that after extraction the wood absorbs more moisture. This shows that the extractives content therefore influences the moisture content of the wood. Steric hindrance and hydrophobic character of extractives may explain the higher water content of extracted samples corroborating similar effect observed on teak (Rizanti *et al*, 2018).

3.3. Inhibition of fungal growth by extracts

Evaluation of fungal growth inhibition of the different extracts was evaluated at two concentrations, 500ppm and 1000ppm, to evaluate which one of the different extracts were involved in natural durability. The results obtained with the different fungi are presented in the figures below in the form of growth curves according to incubation time (figure 1).

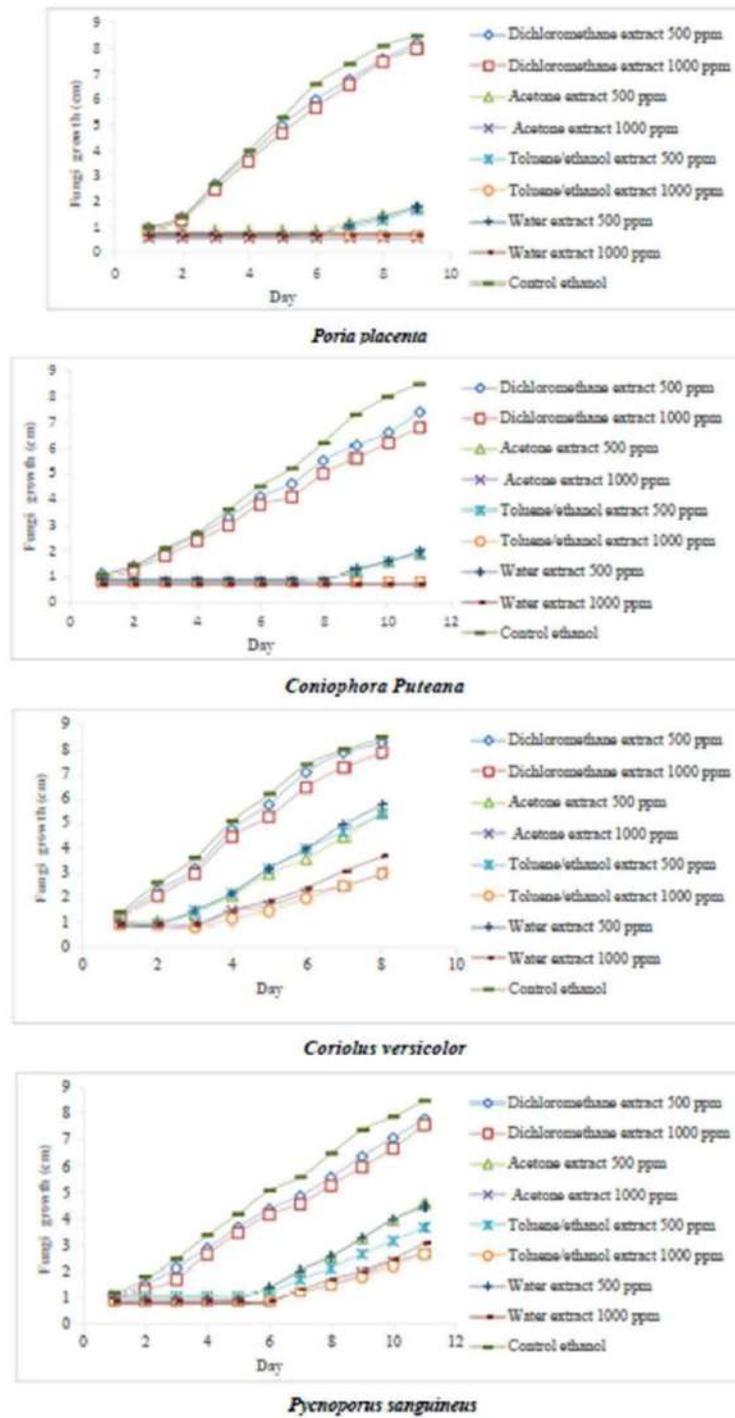


Figure 1. Activity of extracts on the growth of the different fungi.

In all these figures, it is apparent that growth kinetics depend of the fungal strain used. Some fungi grow faster than others when comparing growth of fungi in control dishes. Moreover, it also appears that the fractions extracted with dichloromethane had low antifungal properties as demonstrated by the weak inhibition of fungal development. Whatever the concentration used, dichloromethane extracts have almost no effect on the growth of the fungi studied. On the other hand, acetone, toluene/ethanol and water extracts presented significant antifungal properties. For brown rot fungi, fungal growth began only on the sixth day with *Poria placenta* and on the eighth day with *Coniophora puteana* at 500 ppm concentrations. With concentrations of 1000 ppm, the total inhibition of mycelium growth was observed. For white rot fungi, the growth of *Pycnoporus sanguineus* did not start until the fifth day at 500 ppm and the sixth day at 1000 ppm. With *Coriolus versicolor*, growth at 500 ppm and 1000 ppm started from the third day. It is noted that the acetone, toluene/ethanol and aqueous fractions inhibited more fungal growth of the brown rot fungi than that of the white rot fungi. This behaviour may be explained by the presence of oxidizing enzymes such as laccases and peroxidases excreted by white rot fungi capable of degrading carbohydrates, lignin and other phenolic compounds such as extractive substances. These results are consistent with those obtained by Rosdiana *et al.* (2017) concerning the characterization of antifungal properties of bark extracts of different Indonesian species and numerous other studies reported in the literature (Mori *et al.*, 1997; Novriyanti *et al.*, 2010; Martinez-Sotres *et al.*, 2012). It is also observed that the inhibitory effect increases with the concentration of extract used (Obiang, C S *et al.*, 2016). Preliminary GC-MS analysis (results presented latter) indicated the presence of gallic acid and quercetin in acetone and toluene/ethanol extracts, which may explain the durability and mycelium growth inhibition. These phenolic compounds, according to the literature, are known to affect the membrane of microorganisms which modifies the hydrophobic character of the cell and thus modifies the leakage of the cytoplasmic content (Borges *et al.*, 2013). According to Zabka and Pavela (2013), the mechanism of inhibition depends on the ability of phenolic functions to affect cell lipoprotein membranes, thereby causing the weakening of ionic cellular homeostasis that destroys the entire cell structure.

3.4. Fourier transformed infrared spectroscopy analysis

Infrared analysis of the different extracts was performed to gain deeper insight on the chemical composition of these latter one in relation with their effects on wood durability. FTIR spectra of the different extracts are shown in the figure 2.

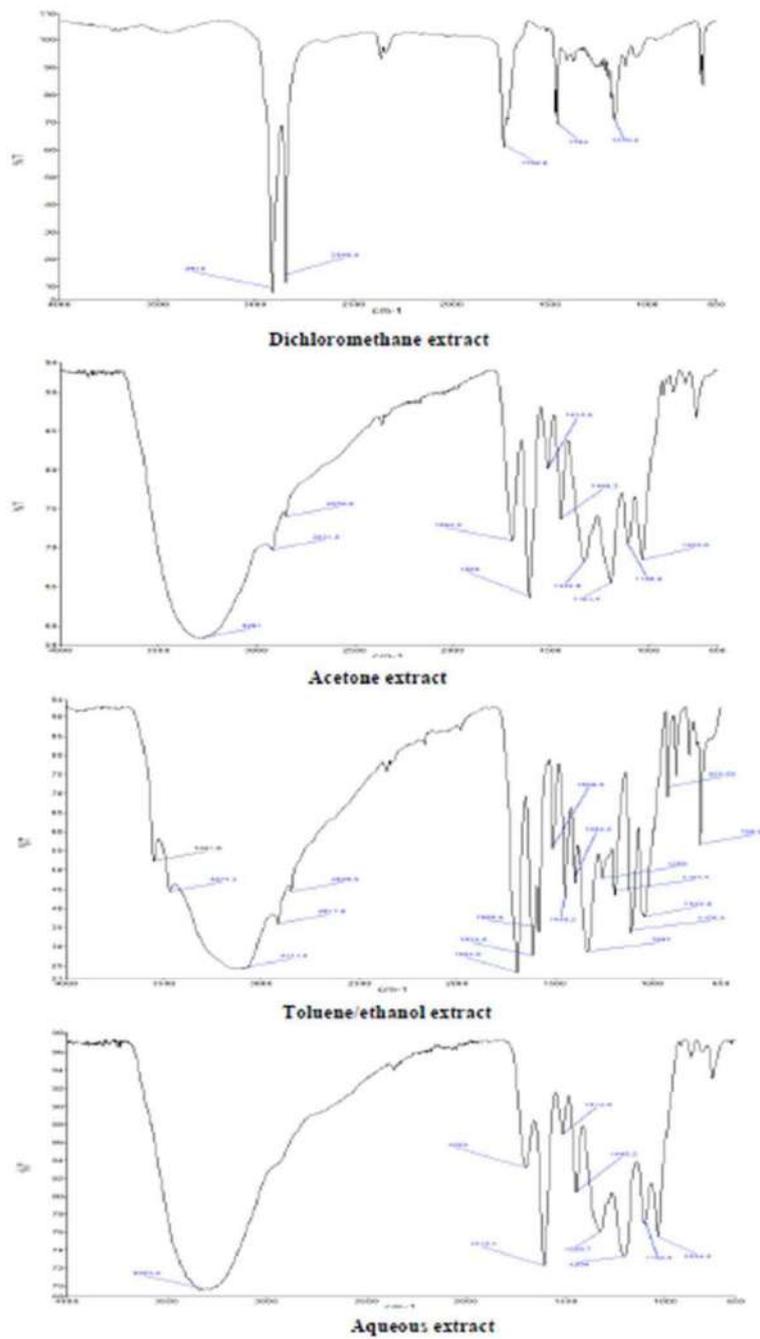


Figure 2. FTIR analysis of the different extracts.

As expected from literature data, the infrared analysis of the dichloromethane extracts revealed the presence of compounds different from those contained in acetone, toluene/ethanol or water extracts. Peaks at 2913, 2849 and 1462 cm^{-1} are characteristics of the CH_2 and CH_3 elongation vibrations present in compounds such as waxes, greases and terpenes. The peak at 1732 cm^{-1} indicated the presence of carbonyl groups $\text{C}=\text{O}$ present in fatty acids of waxes and fats. Analysis of acetone, toluene/ethanol and water extracts indicated the presence of phenolic compounds characterized by the strong absorption band 3218 cm^{-1} corresponding to the elongation vibration of the $-\text{OH}$ bond of the aromatic and aliphatic structures. The strong absorption bands at 1694; 1512 and 1445 cm^{-1} are characteristic of the elongation vibrations of $\text{C}=\text{C}$ bonds of the aromatic ring, which can be attributed to aromatic compounds such as tannins, lignans, flavonoids or other phenolic compounds. Absorption bands at 1322 and 1191 cm^{-1} are ascribable for the $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ stretch elongation vibrations found in compounds such as flavonoids. These results corroborate the results obtained during fungi growth inhibition tests concerning the quite similar behaviour of acetone, toluene/ethanol and water extracts. In parallel and to confirm the results obtained during FTIR, a phytochemical screening was carried out in order to identify the major chemical families (polyphenols, saponins, flavonoids, sterols, terpenes and alkaloids) present in the different extracts (Uddin *et al.*, 2011).

3.5. Phytochemical Screening

The results obtained from the phytochemical screening of the different extracts obtained from the the heartwood of *C. edulis baill* are given in the table 5.

Table 5. Phytochemical screening of different fractions of sawdust extract from the heartwood of *C. edulis baill*

Active compounds	Identification procedure	Extract	Result of the test
alkaloids	Mayer. Bouchardât	Dichloromethane	-
		Acetone	-
		Toluene/ethanol	+++
		Water	+++
flavonoids	Shinoda test	Dichloromethane	-
		Acetone	+++
		Toluene/ethanol	+++
		Water	+++
polyphenols	Iron (III) chloride	Dichloromethane	-
		Acetone	+++
		Toluene/ethanol	+++
		Water	+++
saponins	Aphrogenic power	Dichloromethane	-
		Acetone	+++
		Toluene/ethanol	+++
		Water	+++
Sterols and terpenes	Liebermann-Bouchard	Dichloromethane	++
		Acetone	-
		Toluene/ethanol	-
		Water	-

The tests for each extracted fraction were made in triplicate.

Coloring: +++: very intense; ++: moderately intense; +: not very intense; -: absence.

These are standard tests performed in phytochemistry and pharmacology.

Table 5 shows that polyphenols, flavonoids and saponins were present in all fractions except in dichloromethane as evidenced by positive reactions with ferric chloride test for polyphenols, Shinoda test for flavonoids and aphrogenic power for saponins. These phenolic compounds are known in the literature for having many properties such as antioxidant, antibacterial and antifungal properties that may be responsible for natural durability (Amusant *et al.*, 2017). Alkaloids were present in toluene/ethanol and aqueous extracts (positive reaction with Mayer's and Bouchardat reagent). Alkaloids have been identified in the literature as compounds with antifungal, antibacterial and antimicrobial activities on wood (Onuorah, 2000; Wu and Lin, 2001; Oliveira *et al.*, 2010). Sterols and/or terpenes were present in small amounts only in the dichloromethane fraction which reacted positively to the Liebermann-Bouchard test. Previous studies of tropical woods (Mburu *et al.*, 2007. Kilic and Niemz, 2012) have already indicated the presence of all these different compounds. These results are not only in agreement with the literature, but corroborate the results obtained previously.

3.6. GC-MS analysis

The results of the GC-MS analysis of dichloromethane, acetone and toluene/ethanol extracts are presented in the figure 3. It should be noted that the analysis of water extract gave no exploitable results even if FTIR analysis indicated quite similar spectra than acetone and toluene/ethanol. Molecular weights of compounds contained in water were probably too high to allow GC-MS analyses.

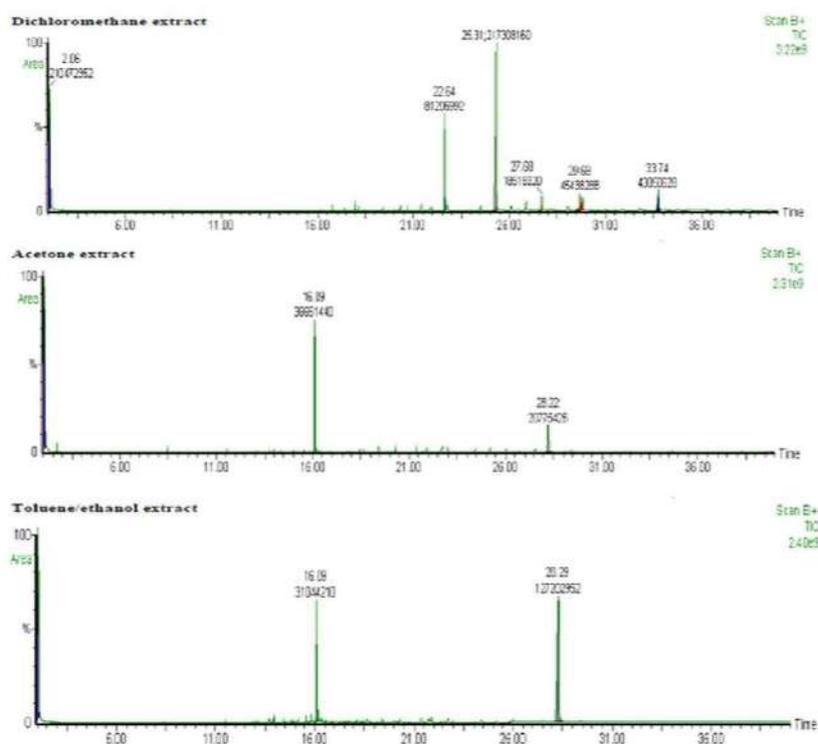


Figure 3. GC-MS analysis of the different extract.

Identification of the different peaks was performed on the basis of their mass spectra by comparison with the NIST library. Main chemical identified are presented in Table 6.

Table 6. Compounds identified by GC-MS and their relative abundance relative to TIC

Solvent	Retention time (min)	Compound	Abundance(%)
Dichloromethane	22.641	Tetracosanoic acid	20
	25.308	Hexacosanoic acid	54
	27.683	Docosanoic acid	5
	29.679	Unknown	11
	33.741	Unknown	11
Acetone	16.094	Gallic acid	53
	20.306	Unknown	3
	21.381	Unknown	4
	22.727	Unknown	6
	24.457	Unknown	3
	28.224	Quercetin	30
Toluene/ethanol	16.089	Gallic acid	20
	28.289	Quercetin	80

GC/MS analysis indicates the presence of lipophilic compounds such as saturated or unsaturated fatty acids. Hexacosanoic acid was the major compound present in the dichloromethane extract. In general, these compounds could explain the different properties of extracts found in our study. Gallic acid and quercetin have been identified in the acetone and toluene/ethanol extracts. Gallic acid was the main product in the acetone extract, while quercetin predominated in the toluene/ethanol extracts. These phenolic compounds are described in the literature to present antifungal properties (Gérardin *et al.*, 2004; Neya *et al.*, 2004; Mburu *et al.*, 2007; Saha Tchinda *et al.*, 2018). These compounds could explain the good natural durability of *C. edulis baill* to fungal attacks. In addition, these compounds are also known to have numerous pharmacological properties such as antioxidant, antidiabetic, anti-cancer, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-mutagenic properties (Zhu and Zhang, 2014; Liu *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2013). These results are in agreement with the results of the phytochemical screening and FTIR analysis of the extracts obtained previously and corroborate the results obtained on fungal growth inhibition tests.

4. Conclusions

To study the effect of extractives on the natural durability of *C. edulis baill* we carried out tests in Petri dish on extracted and not extracted blocks of the heartwood of this species against fungal attacks of brown and white mold fungi. The tests showed that the mass losses on the extracted blocks were greater than on the non-extracted blocks. In addition, mass losses of blocks in general were greater with white rot fungi than with brown rot fungi. All blocks not extracted from *C. edulis baill* after 16 weeks exposure to fungal attacks had mass losses less than 2%. This species with its very good natural durability can claim a place of first choice among the lot of species already exploitable in the sub-regions and in Gabon in particular. It can be used in the field of construction indoors and outdoors. On the other hand, the analysis of extracts of *C. edulis baill* has shown that it contains a variety of compounds with interesting properties. Growth inhibition tests have shown that at concentrations of 500 and 1000 ppm the acetone extracts, toluene / ethanol and aqueous fungistatic had an important effect on the growth of fungi of white

rot fungi. On the brown rot fungi at 500 ppm these extracts had a fungistatic effect on fungal growth and an inhibitory effect at 1000 ppm. These excerpts present real potential for their valuations as a source for antifungal product development for many industries for wood preservation and many others.

Acknowledgements

The authors first thank the National Agency of Grants and Internship of Gabon for the financial support through his chemistry thesis grant (Specialty Sciences of Wood and Fibers) on the person of Bopenga Bopenga Christ Stone Arnaud and IRG for the allocation of a Ron Cockcroft Award (RCA) allowing participation to the meeting. LERMAB is 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).

References

- Akinjogunla, O J, Yah, C S, Eghafona, N O, Ogbemudia, F O, (2010). Antibacterial activity of leave extracts of *Nymphaea lotus* (*Nymphaeaceae*) on *Methicillin* resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Vancomycin* resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) isolated from clinical samples. *Annals of Biological Research*. 1(2): 174-184.
- Ali, C A, Júnior, U E, Råberg, U, Terziev, N, (2011). Comparative natural durability of five wood samples from Mozambique. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65. 768–776.
- 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 Roh Werkst* 62:286–290.
- Amusant, N, Moretti, C, Richard, B, Prost, E, Nuzillard, M, Thevenon, M F, (2007). Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). *Holz RohWerkst* 65:23–28.
- Antwi-Boasiako, C, Barnett, J R, Pitman, A J, (2010). Relationship between total extractive content and durability of three tropical hardwoods exposed to *Coriolus versicolor* (*Linnaeus*) Quelet. *J Indian Acad Wood Sci* 7:9–13.
- Antwi-Boasiako, C, Pitman, A J, (2009). Influence of density on the durabilities of three Ghanaian timbers. *J Sci Technol* 29:34–45.
- Blanchette, R A, Nilsson, T, Daniel, G, Abad, A, (1990). Biological degradation of Wood. In: Rowell, R M, Barbour, R J (Eds.), *Advances in Chemistry Series*, 225th edition. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/ba-1990-0225.ch006>.
- Borges, A, Ferreira, C, Saavedra, M J, Simoes, M, (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist.* 19. 256–265. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>.
- Carrillo-Parra, A, Rosales, M, Wehenkel, C, Foroughbakhch, R, González, H, Garza, F, (2012). Phenols and flavonoids concentration and fungistatic activity of wood and bark of five common tropical species. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15. 621–628.
- Chang, S T, Wang, S Y, Wu, C L, Su, Y C, Kuo, Y H, (1999). Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides hayata*) heartwood. *Holzforschung* 53, 487–490.

- Cirad, 2008. Fiche technique de *Coula edulis*. Fiche n°197. In : Gérard, J, Guibal D, Beauchêne, J, et al. *Tropix 6.0. Caractéristiques technologiques de 245 essences tropicales*. Montpellier, France : Cirad.
- Diouf, P N, Delbarre, N, Perrin, D, Gérardin, P, Rapin, C, Jacquot, J P, Gelhaye, E, (2002). Influence of tropolone on *poria placenta* wood degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68. 4377–4382.
- Esllyn, W E, Bultman, J D, Jurd, L, (1981). Wood decay inhibition by tropical hardwood extractives and related compounds. *Phytopathology* 71. 521–524.
- Guilley, E, Charpentier, J P, Ayadi, N, Snackers, G, Nepveu, G, Charrier, B, (2004). Decay resistance against *Coriolus versicolor* in Sessile oak (*Quercuspetraea* Liebl.): analysis of the between-tree variability and correlations with extractives, tree growth and other basic wood properties. *Wood Sci Technol* 38:539–554.
- Harborne, B J, Williams, A C, (2000). Review in advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* 55. 481–504.
- Haupt, M, Leithoff, H, Meier, D, Puls, J, Richter, H G, Faix, O, (2003). Heartwood extractives and natural durability of plantation-grown teakwood (*Tectona grandis* L.) – a case study. *Holz als Roh-und Werkstoff* 61. 473–474. Consulted 2018/06/05. <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>.
- Huang, Z, Hashadi, K, Makino, R, Kawamura, F, Kuniyoshi, S, Ryuichiro, K, Ohara, S., (2009). Evaluation of biological activities of extracts from 22 African tropical wood.
- Jebrane, M, Pockrandt, M, Terziev, N, (2014). Natural durability of selected larch and Scots pine heartwoods in laboratory and field tests. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 91. 88–96.
- Kilic, A, Niemz, P, (2012). Extractives in some tropical woods. *European Journal Wood and Wood Products.* 70(1-3): 79-83.
- Kirker, G T, Blodgett, A B, Arango, R A, Lebow, P K, Clausen, C A, (2013). The role of extractives in naturally durable wood species. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 82. 53–58. Maldas.
- Kokutsc, A D, Stokes, A, Baillercs, H, Kokou, K, Baudassc, C, (2006). Decay resistance of Togolese teak (*Tectona grandis* L.f) heartwood and relationship with colour. *Trees* 20:219–223.
- Martínez-Sotres, C, López-Albarrán, P, Cruz-de-León, J, García-Moreno, T, Rutiaga Quiñones, G J, Vázquez-Marrufo, G, Tamariz-Mascarúa, J, Herrera-Bucio, R, (2012). Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 69. 38–40.
- Mburu, F, Dumarçay, S, Gérardin, P, (2007). Evidence of fungicidal and termicidal properties of *Pronus africana* heartwood extractives. *Holzforschung* 61:323–325.
- Mohareb, A, Sirmah, P, Desharnais, L, Dumarçay, S, Pétrissans, M, Gérardin, P, (2010). Effect of extractives on conferred and natural durability of *Cupressus lusitanica* heartwood. *Ann. For. Sci.* 67 (504) 7 pp.

- Mori, M, Aoyama, M, Doi, S, Kanetoshi, A, Hayashi, T, (1997). Antifungal activity of bark extract of deciduous trees. *HolzalsRoh und Werkstoff* 55. 130–132.
- Moupela, C, *et al*, (2010). Le noisetier d'Afrique (*Coula edulis Baill*) un produit forestier non ligneux méconnu. *Biotechnol.Agron.Soc.Environ.* 5(3) : 451-461.
- Moupela, C, *et al*, (2013). Essais de propagation par semis et marcottage aérien de *coula edulis Baill* et perspectives pour sa domestication. *Bois et Forêts des Tropiques*. N°318(4): 3-13.
- Nascimento, M S, Santana, A, Maranhão, C A, Oliveira, L S, Bieber, L, (2013). Phenolic Extractives and Natural Resistance of Wood. <http://dx.doi.org/10.5772/56358>.
- Ndukwe, N A, Okiei, W O, Alo, B I, (2012). Correlates of the yield of chemical pulp. lignin and the extractive materials of tropical hardwoods. *Afr J Agric Res* 7:5518–5524.
- Neya, B, Hakkou, M, Pétrissans, M, Gérardin, P, (2004). On the durability of *Burkea africana* heartwood: evidence of biocidal and hydrophobic properties responsible for durability. *Ann. For. Sci.* 61, 277–282.
- Nguila, I G, Petrisans, M, Lambert, J, Ehrhardt, J J, Gérardin, P, (2006). XPS characterization of wood chemical composition after heart-treatment. *Surface and Interface Analysis.* 38(10): 1336-1342.
- Niamké, B F, Amusant, N, Charpentier, J P, Chaix, G, Baissac, Y, Boutahar, N, Adima, A A, Kati-Coulibaly, S, 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.
- Niamké, B F, Amusant, N, Stien, D, Chaix, G, Lozano, Y, Kadio, A A, Lemenager, N, Goh, D, Adima, A A, Kati-coulibaly, S, Jay-allemand, C, (2012). Dihydroxy-epiisocatalponol, a new naphthoquinone from *Tectona grandis* L.f. heartwood and fungicidal activity. *Int Biodeterior Biodegrad* 74:93–98.
- Nzokou, P, Wehner, K, Kamdem, D P, (2005). Natural durability of eight tropical hardwoods from Cameroon *Journal of Tropical Forest Science.* 17(3): 416-427.
- Obiang, C S, Ondo, J P, Atome, G R N, Engonga, L C O, Siawaya, J F D, Emvo, E N, (2016). Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial potential of stem barks of *Coula edulis* Baill. *Pseudospondias longifolia* Engl. and *Carapa klaineana* Pierre. From Gabon. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 6(7): 557-563.
- Oliveira, L S, Santana, L B D A, Maranhão, A C *et al*, (2010). Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. *Int Biodeterior Biodegrad* 64:711–715.
- Onuorah, E O, (2000). The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. *Bioresour Technol* 75:171–173.
- Rosdiana, N A, Dumarçay, S, Gérardin, C, Chapuis, H, Santiago-Medina, F J, Sari, R K, Syafii, W, Gelhaye, E, Raharivelomanana, P, Mohammed, R, Gérardin, P, (2017). Characterization of bark extractives of different industrial Indonesian wood samples for potential valorization. *Ind. Crop Prod.* 108. 121–127.

- Sablik, P, Giagli, K, Paril, P, Baar, J, Rademacher, P, (2016). Impact of extractive chemical compounds from durable wood samples on fungal decay after impregnation of non durable wood samples. *Eur. J. Wood Wood Prod.* 74. 231–236.
- Saha Tchinda, J B, Abia, D, Dumarçay, S, Ndikontar, K M, Gérardin, P, Noah, Ngamveng, J, Perrin, D, (2013). Antioxidant activities, total phenolic contents and chemical compositions of extracts from four Cameroonian woods: padouk.
- Saha Tchinda, J B, et al, (2018). *Industrial Crops & Products* 123: 183–191.
- Saha Tchinda, J B, Pétrissans, A, Molina, S, Ndikontar, K M, MOUNGUENGUI, S, Dumarçay, S, Gérardin, P, (2014). Study of the feasibility of a natural dye on cellulosic textile supports by red padouk (*Pterocarpus soyauxii*) and yellow movingui (*Distemonanthus benthamianus*) extracts. *Ind. Crops Prod.* 60. 291–297.
- Schultz, T P, Nicholas, D D, (2002). Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54:47–52.
- Seppänen, S K, Syrjälä, L, Von Weissenberg, K, Teeri, T H, Paajanen, L, Pappinen, A, (2004). Antifungal activity of stilbenes in vitro bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding Pinosylvin synthase. *Plant Cell Rep.* 22. 584–593.
- Sirmah, P, Iaych k, Poaty, B, Dumarçay, S, Gerardin, P, (2009). Effect of extractives on durability of *Prosopis juliflora* heartwood. International Research Group on Wood Production. Doc. n°: IRG/WP 09-30518. 18pp.
- Sirmah, P, Dumarçay, S, Gérardin, P, (2009). Effect of Unusual amount of (-)-mesquitol of from the heartwood of *Prosopis juliflora*. *Natural Product Research.* 23: 183-189.
- Skyba, O, Douglas, C J, Mansfield, S D, (2013). Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi. *Appl Environ Microbiol* 79:2560–2571.
- Song, T, Pranovich, A, Holmbom, B, (2012). Hot-water extraction of ground spruce wood of different particle size. *Bioresources* 7. 4214–4225.
- Uddin, G, Rauf, A, Siddiqui, S B, Shah, Q S, (2011). Preliminary comparative phytochemical screening of *Diospyros lotus* Stewart. *Middle-East J Sci Res* 10:78–81.
- Vigor, C, Vercauteren, J, Montels, J, (2009). Les substances naturelles dans « la chaîne du médicament », première partie initiation à la pharmacognosie. Université de Montpellier I, 49 p.
- Wu TS, Lin FW (2001) Alkaloids of the wood of *Cryptocarya chinensis*. *J Nat Prod* 64:1404–1407.
- Zabka, M, Pavela, R, (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 93. 1051–1056.
- Zhu, W, Zhang, Z, (2014). Preparation and characterization of catechin-grafted chitosan with antioxidant and antidiabetic potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 70. 150–155.

Index: Variabilité intra-arbre de la composition chimique (moyenne trois essais \pm écart-type) des différents compartiments en bois sur la section transversale à partir des rondins : M, DI, DM, DE, TZ, AU.

Niveau du rondin	Echantillon	Extractible(%)	Lignine(%)	Cellulose(%)	Holocellulose(%)
Base	M	5,0	33,1 \pm 0,8	45,4 \pm 1,2	72 \pm 1,1
	DI	5,8	33,4 \pm 0,4	46,5 \pm 0,9	71,6 \pm 0,8
	DM	6,7	34,6 \pm 0,4	46,9 \pm 0,6	72,0 \pm 1,2
	DE	11,5	36,6 \pm 0,8	43,8 \pm 1	70,8 \pm 1,5
	ZT	6,0	36 \pm 0,1	37,3 \pm 0,7	65 \pm 1
	AU	4,8	35,1 \pm 0,4	37,1 \pm 0,9	65,8 \pm 1,1
Milieu	M	4,8	34,6 \pm 0,4	46 \pm 0,5	67,2 \pm 1,1
	DI	6,0	36,6 \pm 0,8	42,7 \pm 0,7	65,3 \pm 0,1
	DM	9,4	36,6 \pm 0,1	41,2 \pm 0,2	64,8 \pm 0,7
	DE	20,5	35,1 \pm 0,4	41,3 \pm 0,1	66,2 \pm 1,9
	ZT	10,8	32,9 \pm 0,4	41 \pm 0,2	65,8 \pm 0,9
	AU	7,9	32,3 \pm 0,4	37,5 \pm 0,6	65,3 \pm 0,7
Haut	M	3,9	34,3 \pm 0,8	44,4 \pm 0,5	66,5 \pm 0,8
	DI	4,9	33,4 \pm 1,2	45 \pm 0,4	65,4 \pm 0,4
	DM	5,2	32,6 \pm 0,8	44,5 \pm 0,4	66,3 \pm 0,4
	DE	10,4	32,6 \pm 0,8	44,9 \pm 0,2	66,2 \pm 0,3
	ZT	7,6	32,9 \pm 0,4	39 \pm 0,3	65,9 \pm 0,9
	AU	3,8	34,3 \pm 0,1	37 \pm 0,6	65,9 \pm 0,3

AU: aubier; ZT: zone de transition; DE: duramen externe; DM: duramen médian; DI: duramen interne; M: Moelle.

VALORISATIONS POTENTIELLES DES SUBSTANCES EXTRACTIBLES ET ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE EN RELATION AVEC LA DURABILITE NATURELLE DU NOISETIER DU GABON : *COULA EDULIS BAILL.*

RESUME : Cette étude a eu pour objectif général de valoriser la qualité du bois de *C. edulis* tout en étant à la recherche de nouveaux composés biocides valorisables dans des domaines comme l'agroalimentaire, la cosmétique, la préservation du bois etc... Pour cela, plusieurs expériences ont été réalisées. Les résultats de l'étude sur la variabilité intra-arbres de la composition chimique ont montré que seule la teneur en extractible varie considérablement radialement et axialement en revanche celle de la composition chimique est demeurée relativement constante, avec une légère diminution vers le haut. Aucune différence significative de la composition chimique n'a été observée entre les différents rondins. Les résultats sur la caractérisation et les différentes analyses des extractibles ont montré que la teneur en extractibles varie avec la partie de l'essence étudiée, le solvant et la méthode d'extraction utilisée. Les taux d'extractibles au niveau de l'écorce sont plus élevés que dans le duramen et l'aubier. Les acides gras comme l'acide hexadécanoïque et l'acide trans-9-Octadécenoïque et les composés terpéniques tels que le stigmastérol et le β -Sitostérol ont été identifiés comme composés majoritaires des extraits peu polaires. Les sucres et surtout les composés phénoliques tels que l'acide gallique et l'acide ellagique ont été identifiés comme composés majoritaires des extraits polaires. Le bois de *C.edulis* a montré une très bonne résistance vis-à-vis des champignons et des termites. L'extrait peu polaire de l'écorce et tous les extraits polaires ont montré des activités antifongiques intéressantes et plus importantes sur les champignons de pourritures brunes que sur les champignons de pourritures blanches. Les meilleures activités anti-termites ont été obtenues avec les extraits de l'écorce de *C.edulis*. Les meilleures activités antioxydantes ont été enregistrées avec les extraits polaires de l'écorce mais surtout avec celles du bois de cœur de *C.edulis* qui se rapprochent des valeurs des activités antioxydantes de la catéchine et du BHT, utilisés comme témoins positifs dans cette étude.

Mots clés : Noisetier du Gabon, extractibles, composition chimique, Antifongique, Anti-termite, Antioxydant, Durabilité naturelle

POTENTIAL VALORIZATIONS OF EXTRACTIBLE SUBSTANCES AND STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION IN RELATION TO THE NATURAL DURABILITY OF GABON HAZEL: *COULA EDULIS BAILL.*

ABSTRACT : The general objective of this study was to enhance the quality of *C. edulis* wood while being on the lookout for new biocidal compounds that can be used in fields such as the food industry, cosmetics, wood preservation, etc... Several experiments have been carried out for this. The results of the study on the intra-tree variability of the chemical composition showed that only the extractive content varies considerably radially and axially, on the other hand that of the chemical composition remained relatively constant, with a slight decrease upwards. No significant difference in chemical composition was observed between the different logs. The results on the characterization and the various analyzes of extractives have shown that the extractives content varies with the part of the wood species studied, the solvent and the extraction method used. The extractives content in the bark are higher than in the heartwood and sapwood. Fatty acids such as hexadecanoic acid and trans-9-Octadecenoic acid and terpene compounds such as stigmasterol and β -Sitosterol have been identified as the majority of less polar extracts. Sugars and especially phenolic compounds such as gallic acid and ellagic acid have been identified as the majority of polar extracts. *C.edulis* wood has shown very good resistance to fungi and termites. The low-polar bark extract and all polar extracts have shown interesting and more important antifungal activities on brown rot fungi than on white rot fungi. The best anti-termite activities have been obtained with extracts from the bark of *C. edulis*. The best antioxidant activities were recorded with the polar extracts of the bark but especially with that of the heartwood of *C. edulis* which approximate the values of the antioxidant activities of catechin and BHT, used as positive controls in this study.

Keywords: Gabon hazel tree, Extractive, Chemical composition, Antifungal, Anti-termite, Antioxidant, Natural durability