

EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules d'intérêt dans les écorces d'arbres

Avec le soutien
du Plan de relance
de la Wallonie

Rédaction :

valbiom

Avec le soutien de
la



AVANT-PROPOS

Au travers de l'Arrêté du Gouvernement wallon du 5 mai 2022 octroyant une subvention à l'asbl Valbiom dans le cadre de la mesure 9 relative à l'économie biosourcée dans le cadre de Circular Wallonia, la Wallonie confie à Valbiom la mission de valoriser, par l'**extraction, des molécules d'intérêt présentes dans les écorces** constituant des coproduits de la transformation industrielle du bois en Wallonie.

Le présent rapport décrit les activités et résultats obtenus durant le projet et portant sur une période du 5 mai 2022 au 30 septembre 2023.

LES MISSIONS DE VALBIOM

Valbiom est un acteur wallon de référence pour une société fondée sur l'utilisation durable des ressources naturelles. L'asbl stimule et facilite la mise en œuvre d'initiatives intégrées de production de biomasse et de sa transformation en énergies et matériaux.

Ses axes stratégiques

- ▶ Stimuler l'échange d'expertise entre les professionnels du secteur.
- ▶ Inspirer, conseiller et outiller les autorités publiques.
- ▶ Accompagner des porteurs de projet de la conception à l'aboutissement.
- ▶ Être le centre de ressources informationnelles de référence du secteur.
- ▶ Initier de nouvelles collaborations opportunes entre des acteurs complémentaires.
- ▶ Identifier et stimuler les nouveaux débouchés porteurs pour le secteur primaire.
- ▶ Sensibiliser à une citoyenneté biosourcée.

valbiom

Valbiom asbl info@valbiom.be 081/84 58 87

TOUS NOS OUTILS SUR **WWW.VALBIOM.BE**

ExtraForWal

**Extraction et
valorisation
des molécules
d'intérêt dans
les écorces
d'arbres**

EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules
d'intérêt dans les écorces d'arbres

Introduction générale	5
Mise en contexte Extractibles du bois Intérêts et marchés	8
Les gisements d'écorces en Wallonie	14
Obtention des extraits d'écorces et identification de molécules d'intérêts	21
Valorisation des extraits Propriétés biochimiques	50
Conclusions et perspectives	70
Annexes	73

EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules
d'intérêt dans les écorces d'arbres

Introduction générale

Introduction générale

Ce rapport est un résumé du projet Extraforwal qui a pour but, à travers l'extraction de molécules d'intérêt présentes dans les coproduits de la transformation industrielle du bois, de valoriser cette filière. En effet, les coproduits du bois comme les écorces ne présentent à l'heure actuelle qu'un faible intérêt économique. Celles-ci sont majoritairement utilisées pour de la combustion de biomasse ou comme paillage dans les parcs et jardins.

La mission de Valbiom est d'explorer le potentiel de ces écorces en termes de contenance en molécules d'intérêt pour d'autres secteurs. En effet, s'il s'avère que les écorces d'arbres sont riches en certains types de molécules avec des propriétés exploitables (pour les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques, nutraceutiques par exemple), la valorisation de ces coproduits en serait fortement augmentée.

Le rapport est construit en 5 grandes parties.

La première partie servira de mise en contexte de cette étude et visera à répondre aux questions suivantes :

- Pourquoi s'intéresser aux extractibles ?
- Quels secteurs sont intéressés par ces extractibles ?

Ensuite nous analyserons le gisement potentiel d'écorces en Wallonie. Nous répondrons ainsi à la question :

- Quel est le volume d'écorces disponibles en Wallonie ?

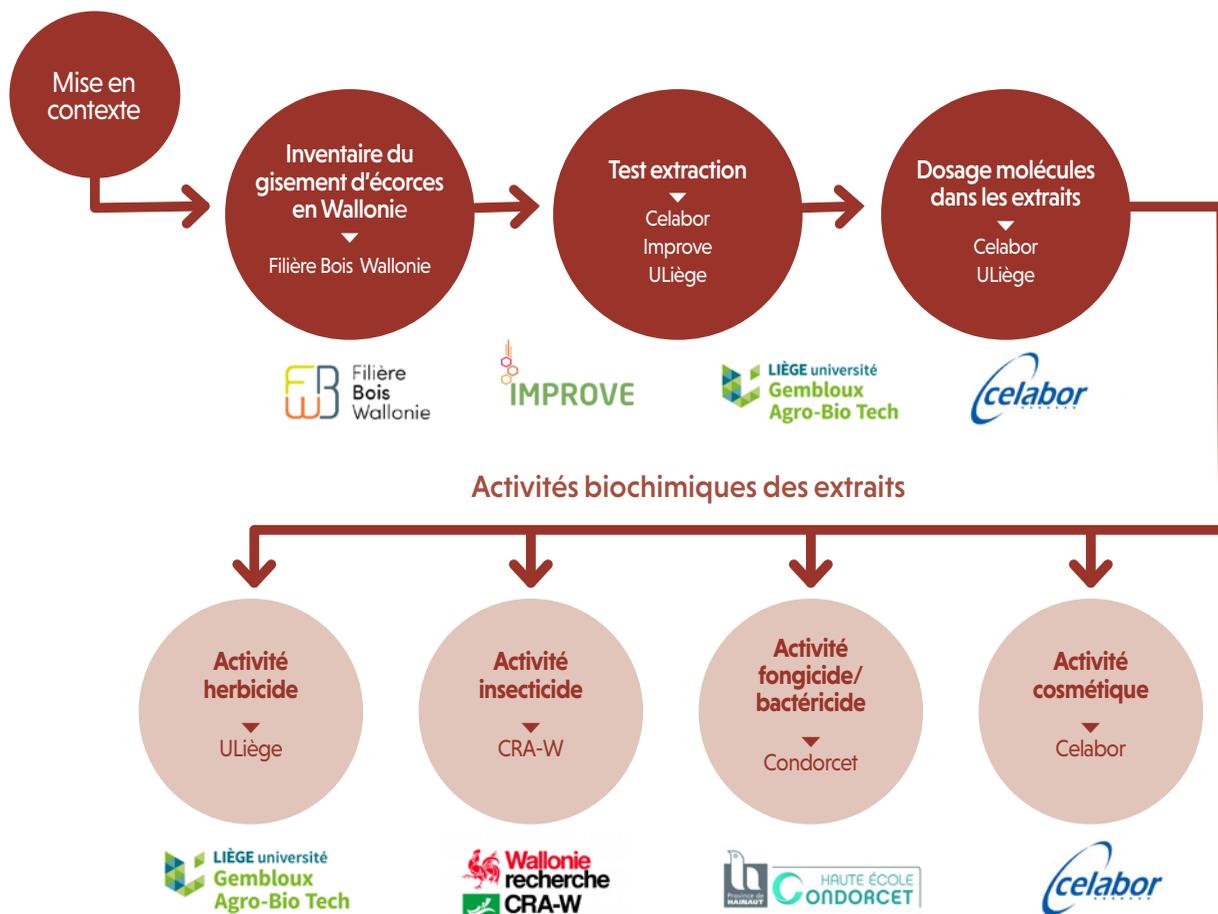
Dans un troisième temps, nous nous intéresserons aux méthodes d'extractions ainsi qu'aux molécules présentes dans les écorces. Cette partie est cruciale pour la suite de notre étude, car elle répondra à deux questions :

- Quelle méthode d'extraction permet d'extraire, si possible de manière économiquement avantageuse, la plus grande quantité de molécules d'intérêt ?
- Quelles sont ces molécules d'intérêt que nous retrouvons dans les écorces et en quelle quantité ?

Enfin, une fois les molécules présentes dans les écorces identifiées, nous regarderons de plus près leur potentiel pour les secteurs de la cosmétique, de la nutraceutique et du biocontrôle. Nous répondrons ainsi à la question :

- Dans quels secteurs ces molécules pourraient-elles être valorisées ?

Schéma général et acteurs impliqués



EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules
d'intérêt dans les écorces d'arbres

Partie 1

Mise en contexte -
extractibles du bois

INTÉRÊTS ET MARCHÉS

Pourquoi s'intéresser aux extractibles ?

Que sont les extractibles du bois ?

Les « extractibles du bois » sont des composés à faible poids moléculaire qui peuvent être extraits facilement à l'aide de solvants organiques ou aqueux. Ils diffèrent des constituants structurels du bois tels que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine qui nécessitent des méthodes d'isolement plus rigoureuses. Ces « extractibles » regroupent divers composés, principalement des métabolites secondaires non essentiels à la croissance de l'arbre, mais qui ont d'autres rôles importants. Ils sont présents dans les compartiments de l'arbre avec des concentrations variables en fonction de facteurs comme l'âge, les conditions de croissance, etc.

Ces composés contribuent à différentes caractéristiques du bois comme sa durabilité, sa couleur, son odeur, son comportement face à l'humidité et même certaines propriétés physiques et mécaniques. Bien que la plupart ne soient pas chimiquement liés aux parois cellulaires, certains le sont, tels que les tannins condensés. La gamme des molécules considérées comme « extractibles » est large, allant des composés phénoliques et terpéniques aux graisses et cires.

Parfois, la définition d'extractibles englobe même les composés inorganiques présents dans les cendres après la combustion du bois, bien que ce ne soient pas réellement des « extractibles ».

Extractibles : une opportunité de chimie du bois en Wallonie

Un contexte propice

En Wallonie, l'établissement d'une chimie lourde issue du bioraffinage du bois est improbable due à la structure de la filière bois, les prix et les contraintes d'approvisionnement. Une chimie basée sur la valorisation de la cellulose, hémicelluloses et lignine pourrait se développer si l'unique usine de pâte à papier chimique wallonne réorientait partiellement ses activités. Cependant, le développement potentiel réside dans une chimie du bois pour des marchés de niche et produits à haute valeur ajoutée, en se concentrant sur les extractibles forestiers. Ces composés sont abondants dans les coproduits moins valorisés de l'industrie du bois, comme les écorces, les nœuds, les feuilles et les aiguilles.

La Wallonie possède des compétences solides dans l'extraction, mais la purification et la fonctionnalisation des extraits pour des molécules spécifiques sont coûteuses et adaptées aux molécules à haute valeur ajoutée. Voilà pourquoi un fort intérêt est porté sur les opportunités de valorisation d'extraits bruts, composés de mélanges de molécules.

Cette filière peut s'intégrer harmonieusement dans la filière bois sans détourner les flux de coproduits de leurs usages actuels, en ajoutant des étapes bénéfiques aux processus existants. Par exemple, l'extraction d'écorces, qui contiennent des quantités élevées d'extractibles, pourrait se faire entre l'écorçage et la valorisation énergétique, ajoutant une valeur à ce coproduit généré par l'industrie du bois.

Quels extractibles d'intérêts retrouver dans les coproduits de la 1^{re} transformation du bois wallonne?

Bien que le terme « extractible » englobe diverses molécules, des recherches et projets en cours ont identifié les extractibles valorisables dans les essences transformées par l'industrie du bois en Wallonie.

Une étude québécoise a mis l'accent sur les terpènes et les polyphénols.

Les terpènes, abondants dans les résines, présentent des activités biologiques variées et thérapeutiques (antibactérien, insecticide, etc.). Certains terpènes ont des applications pharmaceutiques, comme le paclitaxel.

Les polyphénols, présents chez les plantes, ont une solubilité dans l'eau et les solvants polaires, les rendant facilement extractibles à faible coût. Ils trouvent des

applications en cosmétique, agroalimentaire, teintures, tannage et adhésifs. Parmi eux, les tannins sont notables.

Des équipes françaises étudient le potentiel en extractibles, y compris les écorces, dans le Grand Est. Valbiom suit ce projet avec intérêt.

Quels secteurs sont intéressés par ces extractibles?

Les propriétés impactantes du bois dues à ses extractibles influent sur sa valorisation, mais une fois extraites, ces molécules intéressent également la chimie de spécialité. Des domaines tels que la cosmétique, la nutraceutique et la pharmaceutique sont attirés par les molécules naturelles en réponse à la demande croissante de produits d'origine naturelle. Par exemple, le marché européen des cosmétiques enregistre une croissance annuelle de 6 à 7 % pour les produits « naturels »¹.

D'autres marchés, comme l'agro-alimentaire, les tensioactifs, les produits de préservation du bois, les phytosanitaires (insecticides, fongicides) ainsi que les colles, résines et mousses isolantes, montrent également de l'intérêt pour les extractibles en divers produits et volumes.

Bien que ce document ne vise pas à présenter une étude exhaustive, le projet français « Extractibles forestiers de l'Est » (ExtraFor_Est)² a récemment réalisé une étude dans ce domaine. Certains éléments de cette étude sont accessibles publiquement et sont examinés ci-dessous.

1. <https://www.cbi.eu/market-information/natural-ingredients-cosmetics/what-demand>

2. https://www6.inrae.fr/extraforest/content/download/4044/38573/version/1/file/2020_1013_IAR_%25c3%25a9tude_march%25c3%25a9s_pr%25c3%25a9sentation.pdf

Des produits déjà existants

Il ressort de cette étude française que des produits à base d'extraits forestiers sont déjà commercialisés sur des marchés à faible volume et faibles barrières réglementaires. De même, un intérêt est présent sur des marchés de plus gros volumes mais aussi avec des barrières réglementaires plus importantes.

Il existe également quelques produits qui ont nécessité un fort investissement afin de passer les barrières réglementaires et obtenir les autorisations nécessaires. Les barrières réglementaires ne sont donc pas nécessairement un obstacle infranchissable. Elles peuvent être levées, moyennant un coût, lorsque les bénéfices espérés sur le produit et/ou marché concerné le justifient.

Diverses techniques d'extraction disponibles

La plupart des produits commercialisés actuellement (ou en développement) sont basés sur des techniques d'extraction conventionnelles, telles que l'extraction solide-liquide avec des solvants (eau, éthanol). Des méthodes bien établies comme la macération, la décoction, l'infusion ou la percolation sont utilisées à grande échelle industrielle.

D'autres méthodes, appelées techniques d'extraction intensifiée, améliorent les rendements et la productivité des techniques conventionnelles en utilisant des procédés différents. Les techniques telles que l'extraction assistée par micro-ondes, les ultrasons ou l'extraction enzymatique visent à réduire les temps d'extraction, la consommation de solvant et/ou d'énergie. Elles permettent parfois d'extraire

des molécules impossibles à obtenir avec les méthodes classiques. Ces technologies font l'objet de recherches continues. Cependant, leur efficacité doit être évaluée en termes de coûts par rapport aux méthodes traditionnelles, ainsi que leur conformité avec les réglementations en vigueur pour déterminer leur pertinence en fonction des produits et des marchés ciblés.

Les marchés d'intérêt

Les pistes de valorisation des extraits issus d'écorces sont nombreuses, allant des secteurs impliquant de faibles volumes pour une très haute valeur ajoutée (pharmaceutique, cosmétique) aux secteurs orientés vers de la production de masse et à valeur ajoutée nettement moindre (colles et adhésifs). Les contraintes sont évidemment fort différentes entre ces secteurs, tant d'un point de vue technique qu'économique ou réglementaire. Ces contraintes doivent être surmontables pour l'extrait concerné.

Parmi les potentiels marchés d'intérêt pour la valorisation de ces extraits, citons :

- Les cosmétiques : principes actifs, conservateurs (antioxydant, antimicrobien)
- L'alimentation humaine : nutraceutique (compléments alimentaires), conservateurs (antioxydant, antimicrobien, antifongique), arômes et colorants
- L'alimentation animale : additifs
- L'agriculture : biostimulant, biocontrôle.

Marché des cosmétiques

Le marché des cosmétiques recherche des extraits naturels à haute valeur ajoutée. Des produits basés sur les essences wallonnes sont déjà commercialisés, utilisés comme principes actifs ou agents conservateurs, à des valeurs variant de 20 à 1000 €/kg. La demande croissante pour des produits naturels motive ce développement, ainsi que la recherche d'alternatives aux molécules synthétiques (conservateurs). Cependant, des contraintes réglementaires chinoises et la couleur peu adaptée à certains produits peuvent entraver leur utilisation.

Marché nutraceutique et alimentation humaine

Les extraits forestiers sont principalement destinés aux compléments alimentaires, recherchant des alternatives aux conservateurs synthétiques. La compétition est intense, surtout dans le secteur nutraceutique, avec des prix autour de 150 à 200 €/kg. Les utilisations cosmétiques et conservatrices sont également présentes à des prix similaires (20 à 30 €/kg).

Marché de l'alimentation animale

Les extraits forestiers servent d'additifs alternatifs aux antibiotiques et antioxydants dans l'alimentation animale. Les tanins de châtaignier et le Pycnogenol (écorce de pin) sont commercialisés à des prix de 1 à 10 €/kg. La complexité et le coût de la mise sur le marché sont des obstacles. Hormis les tanins de châtaignier et le Pycnogenol, peu d'autres extraits de bois sont utilisés dans l'alimentation animale. Des projets, comme BarkCure en Norvège, se sont concentrés sur les tannins d'écorce de pin contre les

parasites. Un projet impliquant Borregaard vise à valoriser les sous-produits d'épicéa pour l'alimentation animale, la pharmaceutique, les cosmétiques et les pesticides biologiques.

Marché agronomique - biostimulant et biocontrôle

Le marché des produits phytosanitaires cherche des alternatives aux molécules synthétiques, avec un équilibre entre coût et efficacité. Les extraits naturels répondent à ces besoins en remplaçant les molécules interdites. Ils peuvent aussi aider dans les problèmes de stress hydrique et de qualité des sols, notamment pour les biostimulants. Les produits biostimulants à base d'extraits de plantes sont peu développés, seuls quelques-uns sont commercialisés, dont les tanins issus d'extraits forestiers.

Des produits contenant des extraits de bois de châtaignier et de mélèze sont en cours d'autorisation. Une spin-off wallonne a débuté en 2021 les démarches pour homologuer un herbicide à base d'huiles essentielles.

Les produits de biocontrôle et de biostimulants ont des prix en dessous de 10 €/kg, nécessitant une rentabilité par la quantité. Deux marchés se distinguent : l'agriculture professionnelle et le secteur « Home and Garden » pour particuliers, plus petit et réglementé mais à plus grande valeur ajoutée. Les coûts et les délais d'homologation doivent être considérés. Néanmoins, ce secteur cherche des substances actives et des adjuvants, offrant des opportunités pour la valorisation d'extraits forestiers.

Les contraintes spécifiques des marchés à haute valeur ajoutée

La valorisation des extraits se réalise principalement dans les secteurs à haute valeur ajoutée comme la cosmétique, le nutraceutique et le pharmaceutique, en exploitant le ratio prix d'achat/volume d'extrait avantageux. Les projets d'extraction de petite taille sont plus faisables pour alimenter des acteurs spécifiques. Cependant, chaque secteur a des exigences et contraintes spécifiques: cosmétique < nutraceutique < pharmaceutique.

Traçabilité

La traçabilité des extraits est cruciale, mais elle est plus complexe pour le bois que pour l'agriculture. Des solutions comme l'utilisation des garanties d'origine forestière (PEFC, FSC) et des étiquettes RFID sont explorées pour améliorer la traçabilité des coproduits.

Réglementation

Dans les secteurs cosmétiques et nutraceutiques, des contraintes réglementaires s'appliquent aux extraits végétaux en termes de matière première. Les listes d'ingrédients existent (ex: extrait d'écorce de hêtre *Fagus sylvatica*); si un ingrédient n'est pas répertorié, des démarches d'autorisation sont nécessaires, mais elles peuvent être longues et coûteuses. L'intérêt de l'extrait détermine si ces démarches seront entreprises.



EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules
d'intérêt dans les écorces d'arbres

Partie 2

Les gisements d'écorces en Wallonie

Introduction

L'objectif de cette section est de quantifier le gisement d'écorces mobilisables en vue d'en extraire des molécules d'intérêt. Cette partie du rapport a été rédigée avec l'aide de Filière Bois Wallonie afin d'estimer le gisement mobilisable d'écorces. Opérationnelle depuis le 1^{er} avril 2023, « Filière Bois Wallonie » est née de la fusion entre Ressources Naturelles Développement et l'Office économique wallon du bois. Hout Info Bois, en tant que partenaire méthodologique, a également contribué à l'étude.

Méthodologie

Les trois essences sélectionnées pour l'analyse sont l'épicéa, le douglas et le chêne. Les données initiales proviennent du rapport scierie de 2021 de Hout Info Bois, permettant une première estimation.

Pour plus de précision, des entretiens ont été menés avec les scieurs pour obtenir des données réelles sur la production, les prix, l'utilisation et la saisonnalité. Une enquête a été réalisée auprès de l'ensemble des scieries en Wallonie, en se concentrant sur celles équipées d'écorceuses pour garantir la pureté des échantillons d'écorce. Parmi les scieries de résineux, onze sur trente disposent d'écorceuses (mais seulement dix ont répondu à notre sollicitation), représentant plus de 90 % du volume total de résineux sciés en Belgique. Pour les scieries de feuillus et mixtes, six sur trente-et-une écorcent leurs grumes, représentant 33 000 m³ sur 72 000 m³ de feuillus sciés annuellement. En raison du faible nombre d'observations, une hypothèse de distribution normale a été adoptée pour les caractéristiques mesurées.

Résultats par essence

Chêne

Ce paragraphe présente les résultats spécifiques pour l'essence de chêne, en utilisant des données quantitatives. Selon le rapport « État du secteur du sciage en Belgique » réalisé par Hout Info Bois en 2021, le gisement théorique d'écorces de chêne a été estimé à 2 835 tonnes par an. En utilisant une estimation moyenne de la masse volumique des écorces humides à environ 370 kg/m³, le gisement équivaut à environ 7 655 mètres cubes apparents (MAP).

Cela se base sur le volume de bois scié annoncé par les scieries multiplié par les taux d'écorce théoriques spécifiques à chaque essence. Cependant, la réalité diffère en raison de la perte d'information lors de l'agrégation des données et de divers facteurs tels que les conditions d'exploitation et la variabilité génétique.

Parmi les scieries mixtes et de feuillus, seules six écorcent les grumes avant le sciage. Dans les autres établissements, les écorces sont mélangées aux autres produits connexes lors de la découpe ce qui génère une forte hétérogénéité bois-écorces. Une de ces six scieries ne transforme pas de chêne et est donc exclue de cette étude.

Cette hétérogénéité bois-écorces pourrait causer des difficultés lors du traitement du produit brut duquel il faudrait séparer les écorces afin d'extraire les molécules d'intérêts.

Deux cas sont à envisager au niveau de l'homogénéité des lots : soit l'hétérogénéité au niveau des essences a peu

d'impact sur l'extraction de molécules, soit l'homogénéité complète de la matière première est primordiale, que ce soit au niveau des essences ou du mélange bois-écorces.

Dans le premier cas, trois scieries sont en mesure de fournir des lots d'écorces de chêne et deux ne sont pas aptes à séparer les différentes essences – soit par manque de place de stockage soit pour des raisons techniques (alternance d'essences de densité variable afin de devoir changer moins fréquemment les lames). **Les cinq scieries seraient donc éligibles dans ce cas de figure.**

Le chêne représenterait la grande majorité du volume avec un volume de 3.150 MAP sur un volume mobilisable d'écorces de feuillus de 3.770 MAP. Trois scieries utilisent des écorceuses à fraise, ce qui augmente la part de bois dans les écorces et augmente l'hétérogénéité bois-écorce du produit.

Actuellement, l'industrie des espaces verts et les générateurs biomasse utilisent ce gisement d'écorces. Pour diriger une partie des écorces vers l'industrie d'extraction du bois, le prix d'achat doit dépasser les prix actuels. Ce prix varie selon les essences sciées, la localisation du client, la concurrence et les négociations, et est spécifique à chaque scierie.

Sur base des données issues des scieries, une régression linéaire a permis d'estimer la part du volume du gisement mobilisable qui peut être détournée en fonction du prix d'achat :

$$\text{Volume en MAP} = 722,43 + 293,88 * \text{Prix MAP}$$

Courbe offre chêne mélangé



Figure 2.1. Évolution de la quantité d'écorces de chêne mélangé disponibles en fonction du prix

Soulignons l'incertitude élevée des coefficients de l'équation en raison du faible nombre d'observations. Les prix de l'énergie lors des rencontres peuvent affecter les résultats. Le développement du projet peut augmenter les participants et les volumes disponibles, influençant les prix.

De plus, si le projet se développe et s'il génère une plus-value conséquente pour les scieurs, il est envisageable que d'autres scieries investissent dans des écorceuses, ce qui augmenterait le volume total disponible.

Si l'homogénéité des essences importe, seules trois scieries peuvent fournir des écorces de chêne homogènes, soit environ 1 060 m³. La courbe d'offre peut être estimée :

$$\text{Volume en MAP} = 802,62 + 31,22 * \text{Prix MAP}$$

Les gisements d'écorces en Wallonie

Courbe offre chêne pur

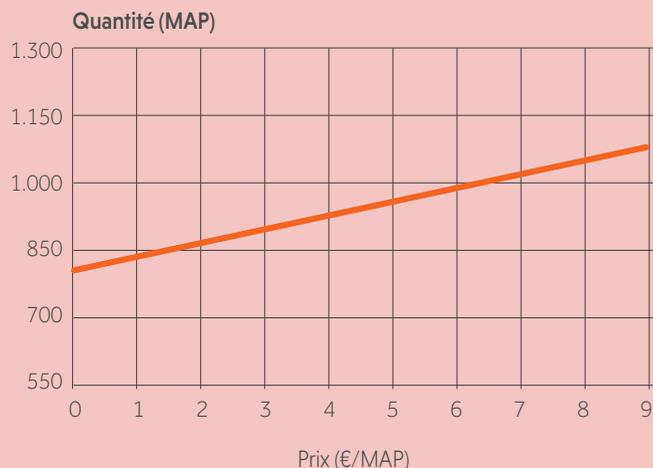


Figure 2.2. Évolution de la quantité d'écorces de chêne pur disponibles en fonction du prix

Épicéa

Le gisement théorique étudié n'est pas limité uniquement à l'épicéa mais regroupe l'ensemble des résineux (épicéa – mélèze – douglas – pin). Le total est de 121.550 tonnes soit 328.513 mètres cubes apparents – en supposant une masse volumique identique à celle du chêne, soit 370 kg/MAP.

Parmi les scieries de résineux présentes sur le territoire wallon, onze d'entre elles disposent d'une écorceuse et rentrent dans le cadre de cette étude. Plusieurs scieries n'ont pas souhaité fournir des informations sur le prix de vente. Ces prix ont donc été extrapolés sur base des données fournies, ce qui peut engendrer un léger biais. Il faut cependant souligner que les dix scieries ayant participé à l'étude représentent la majeure partie de la production wallonne – près de 90%.

Six scieries sont aptes à fournir des lots d'écorces d'épicéa pur. Le volume total est de 247.384 m³. Comme

précédemment, il est intéressant d'estimer le volume mobilisable en fonction du prix de vente. En se basant sur les réponses des scieurs, on peut estimer la courbe d'offre telle que :

$$\text{Volume en MAP} = - 184.181,78 + 36.271,82 * \text{Prix MAP}$$

Courbe offre épicéa pur

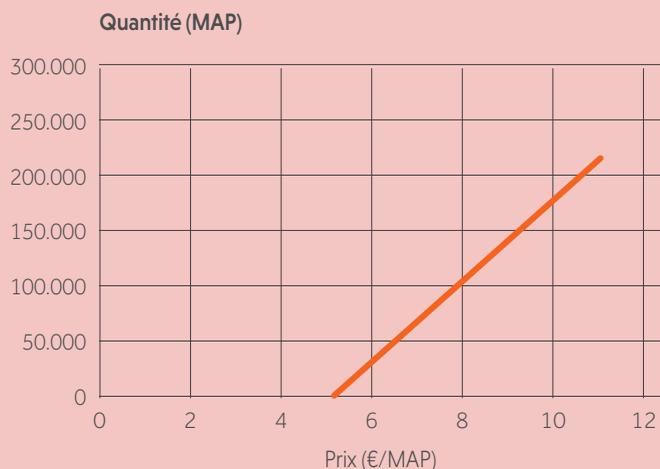


Figure 2.3. Évolution de la quantité d'écorces d'épicéa pur disponibles en fonction du prix

Dû à des tailles de production très variables et un échantillon très limité, les écart-types des coefficients sont très élevés et les coefficients peuvent être sujets à des variations importantes d'une année à l'autre.

Douglas

Seules trois scieries sont aptes à fournir des lots d'écorces de douglas purs dont deux qui n'ont pas souhaité donner d'informations sur le prix de vente. Il est donc impossible d'extrapoler les données manquantes dans ce cas mais le volume mobilisable total est de 53.180 MAP.

Les gisements d'écorces en Wallonie

Comme l'écorce de douglas est très prisée pour son utilisation dans les parc et jardin, son prix est supérieur au prix de ventes des deux essences précédentes. Il faudra déboursier entre 25 et 30 euros du mètre cube apparent pour pouvoir être compétitif.

Mélange épicéas (douglas - pins - mélèzes)

Toutes les scieries ayant répondu à l'enquête utilisent la même méthode d'écorçage, il n'y a donc pas de problème d'hétérogénéité à ce niveau-là. Cependant, les petites unités ne peuvent séparer les écorces des différentes essences, souvent par manque de place et parce qu'un produit séparé par espèce, à ce jour, n'a pas d'intérêt. Le volume du gisement mobilisable est de 329.144 MAP ce qui est plus élevé que l'estimation théorique. Cela peut s'expliquer par un coefficient de foisonnement variable en fonction de la saison. De plus, les scieurs n'ont pas d'intérêt pour les écorces dû à leur faible valorisation et n'ont pas de mesures précises de leur production.

La différence importante entre la nature, l'utilisation des écorces de douglas et celles des écorces des autres résineux crée deux sous-groupes non homogènes. En réalisant une régression linéaire sur ces deux ensembles, les valeurs du premier groupe seront sous-estimées alors que celles du second seront surestimées. Cependant, comme ils sont distincts, la courbe d'offre peut être estimée de la sorte :

À partir de 12 €/MAP, il est possible d'acquérir toutes les écorces actuellement utilisées en tant que biomasse –

principalement de l'épicéa ou des mélanges de résineux. Cependant, cela ne sera pas suffisant pour pouvoir détourner les écorces à destination des parcs et jardins. Cet écart de prix explique la constance dans la courbe d'offre.

Volume en m³ =

- 184.181,78+36.271,82*Prix MAP

Si Prix < 12€/MAP

251.080

Si 12€/m³ < Prix < 30€/MAP

329.144

Si 30€/MAP < Prix)

Courbe offre résineux

Quantité (MAP)

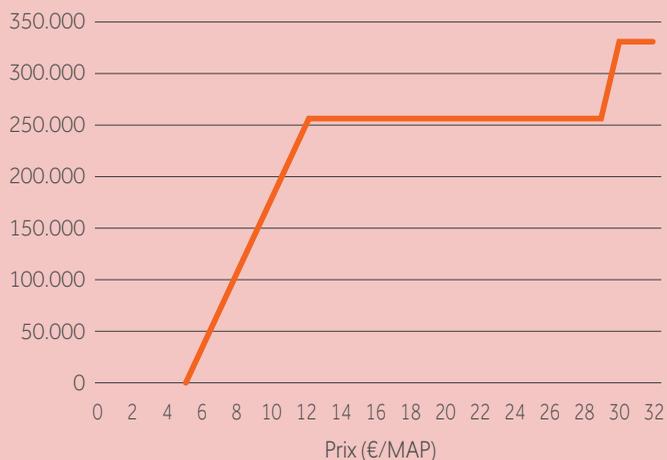


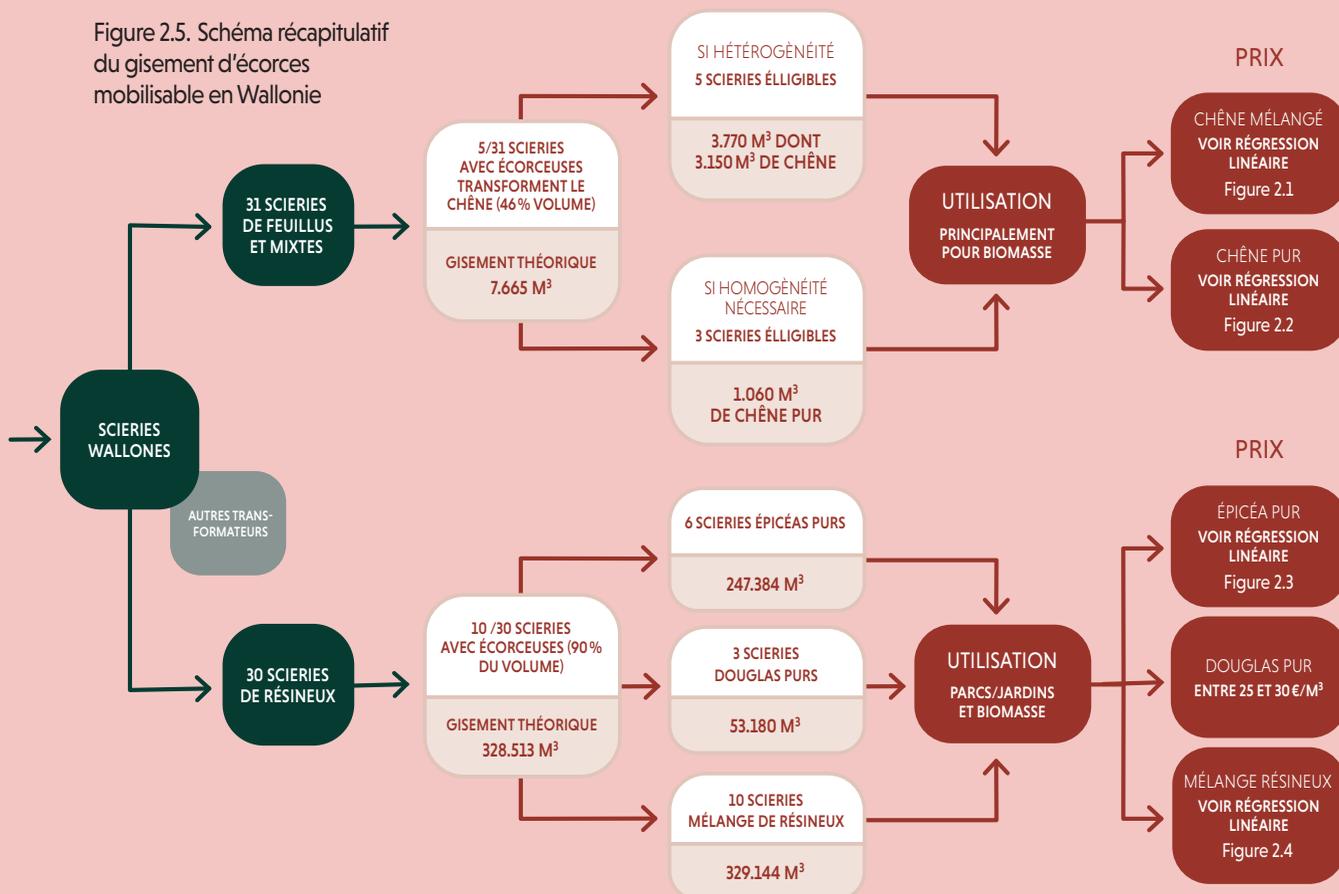
Figure 2.4. Évolution de la quantité d'écorces de résineux disponibles en fonction du prix

Synthèse

Tableau 2.1. Synthèse des gisements théoriques et réels des différentes essences d'écorces

	Gisement théorique (MAP)	Gisement mobilisable (MAP)
Chêne pur	7.665	1.060
Feuillus	-	3.770
Épicéa	-	247.384
Douglas	-	53.180
Mélange résineux	328.513	329.144

Figure 2.5. Schéma récapitulatif du gisement d'écorces mobilisable en Wallonie



Discussion et conclusion

Utilisation actuelle

Il y a actuellement deux options pour valoriser les écorces. Premièrement, elles peuvent être utilisées comme combustible dans une chaudière à biomasse. Avec un taux d'humidité pouvant atteindre 40 % voire 50 %, et la production considérable de cendres (environ 5 % de la masse totale), les écorces ont une faible qualité comme combustible, ce qui se traduit par un prix de vente inférieur à d'autres combustibles bois. Deuxièmement, elles sont utilisées dans les parcs et jardins, soit en paillage (notamment le pin et le douglas pour leur aspect esthétique), soit en compost.

Le gisement d'écorces de résineux est convoité par les deux industries. Les parcs et jardins en utilisent 192 872 MAP, tandis que 136 612 MAP sont utilisés comme biomasse. En ce qui concerne les feuillus, seule une scierie vend 800 MAP à l'industrie du jardinage, et les 8 000 MAP restants sont vendus comme combustible.

Utilisation des résidus

Dans le cadre de cette étude, il est essentiel de tenir compte de l'état biochimique des résidus post-extraction, celui-ci influençant leur utilisation ultérieure des résidus (biométhanisation). Pour cela, il est nécessaire de définir une méthode d'extraction. Sans connaître le processus et les implications sur les résidus – que ce soit en termes de taille, d'humidité ou bien de composition chimique – il est impossible de savoir si les résidus peuvent avoir les débouchés actuels des écorces brutes.

Saisonnalité

La question de la saisonnalité de la production et l'approvisionnement a été abordée avec les scieurs mais en dehors des périodes de grand froid durant lesquelles il est impossible de scier, la production reste stable tout au long de l'année.

Globalement nous pouvons donc conclure qu'il existe un gisement d'écorces potentiellement intéressant en Wallonie (634.538 m³). Mais celui-ci est fonction du prix de vente des écorces. Les parties suivantes de ce rapport nous permettront d'y voir plus clair sur le potentiel de ces écorces en termes d'extraction de molécules d'intérêts.

EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules
d'intérêt dans les écorces d'arbres

Partie 3

Obtention des extraits d'écorces et identification de molécules d'intérêts

La mission confiée au Celabor avait pour but de tester, valider et optimiser des méthodes d'extraction, ainsi que les prétraitements nécessaires, adaptés à des écorces générées dans les conditions d'une scierie par un équipement industriel d'écorçage. Dans un second temps, les molécules extraites ont été identifiées et quantifiées. Pour finir, des tests à l'échelle semi-pilote ont été effectués. Ces tests ont été complétés par une autre batterie de tests réalisés par Improve afin d'optimiser les étapes de prétraitement à une échelle plus importante. Le laboratoire de Chimie des Molécules Naturelles de l'ULiège a été chargé de valider les tests d'extraction et de quantification.

Comme déjà mentionné, l'ensemble des tests sont effectués sur les 3 espèces les plus présentes en Wallonie : l'épicéa, le douglas et le chêne.

Récolte d'échantillons d'écorces

Afin de pouvoir réaliser les tests d'extraction, une certaine quantité d'échantillons d'écorces ont dû être récoltés par Valbiom, avec le soutien et la collaboration précieuse de Hout Info Bois, auprès de scieries wallonnes. L'échantillonnage a été réalisé en janvier 2023, sur des écorces d'épicéa, de douglas et de chêne (sessile ou pédonculé) écorcées le plus récemment possible. Le laps de temps entre l'abattage de la grume et son écorçage n'était hélas pas maîtrisable, celui-ci dépendant des stocks et commandes des scieries.

Les 3 échantillons (de douglas, d'épicéa, et de chêne) ont été prélevés dans 3 scieries différentes, entre le 12 et le 19 janvier 2023. L'abattage des grumes datait de octobre/novembre 2022 pour le chêne et le douglas, et de décembre 2022 pour l'épicéa. Tous les tests d'extraction ont été réalisés à partir de ces 3 échantillons.

Référence CELABOR	Informations	Date de réception	Date abattage des grumes
ECH-202300931	Écorces de douglas (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	12/01/2023	Octobre/novembre 2022
ECH-202300932	Écorces d'épicéa (<i>Picea abies</i>)	12/01/2023	Décembre 2022
ECH-202300933	Écorces de chêne (<i>Quercus robur</i> et <i>Q. petraea</i>)	19/01/2023	Octobre/novembre 2022

Tableau 3.1. Tableau récapitulatif des échantillons d'écorces

Optimisation de l'extraction

Matériel & méthodes

- Broyeur à couteaux Retsch SM-300
- Extracteur Micro-ondes NEOS
- Évaporateur Rotatif Buchi R-220 Pro (Température de fonctionnement: 50°C)
- Lyophilisateur Labo Martin Chris Delta 1-24 LSC Plus

Détermination des polyphénols totaux

Selon la méthode Folin-Ciocalteu, l'analyse est réalisée par ajout du réactif de Folin et suivi de l'absorbance à 755 nm. L'échantillon est dilué dans de l'eau et quantifié à partir d'une courbe de calibration réalisée avec de l'acide gallique entre 25 et 400 mg/L.

Dosage des polyphénols par UPLC-DAD-MS

Selon un protocole interne, l'échantillon est dilué ou solubilisé dans de l'éthanol avec l'aide d'une sonication. L'analyse est réalisée par injection en UPLC/MS en quantifiant à partir d'une courbe de standard externe préparée dans le même solvant que l'échantillon

Dosage des terpènes des huiles essentielles par GC-MS

Identification et dosage par chromatographie en phase gazeuse et détection par spectrométrie de masse (Ion Trap). Quantification par calibration externe, solutions

préparées à partir d'un matériau de référence certifié.

Dosage des sucres

Les sucres sont extraits par ultrasons dans l'eau millipore puis injectés en HPLC-ELSD (HPLC Agilent avec le détecteur ELSD 3300 de chez Alltech) après dilution dans un mélange acétonitrile/eau et ils sont quantifiés par calibration externe.

Prétraitement

Séchage

Dans une optique d'utilisation des écorces dans une chaîne d'approvisionnement à l'échelle nationale, il est important de travailler avec un produit le plus stable possible. L'étape de séchage est donc importante pour stabiliser les matières premières et éviter leurs dégradations en raison des activités microbiennes importantes lorsque le taux d'humidité se situe entre 30 et 50 % (Hakkila, P., 1989).

L'objectif de cette première partie est donc de déterminer comment les écorces doivent être séchées afin de permettre la meilleure extraction possible par la suite. Il faut pour cela tenir compte de plusieurs facteurs:

1. Facteur économique: le séchage des écorces doit être économiquement viable et doit donc, dans l'idéal, représenter le coût le plus faible possible
2. Facteur biochimique: le séchage ne peut pas altérer la composition biochimique des écorces, au risque de détruire les molécules d'intérêt qui font l'objet d'une extraction par la suite

Lors de cette étude, le Celabor a comparé deux grandes méthodes de séchage.

- Séchage en étuve à 50°C (conditions contrôlées) -

Extraits d'écorces et identification de molécules

Consommation énergétique : 185 W/h. La température de 50°C a été choisie afin de ne pas détériorer les matières premières (Trivelato *et al.* (2016) - Indcrops_2021_effect of thermal drying.pdf)

- Séchage à température ambiante sur des bâches à l'intérieur (conditions non contrôlées)

Pour commencer, les matières premières ont été broyées grossièrement par un broyeur de jardin. À la réception des écorces fraîches, la teneur en humidité de l'écorce était de plus de 50 %. Un suivi du taux d'humidité a été réalisé durant 4 jours pour le séchage en étuve et 14 jours pour le séchage à température ambiante. Le graphique suivant reprend les différentes mesures réalisées durant cette période.

Pour le séchage à température ambiante, une stabilisation du taux d'humidité est atteinte après 200h pour les trois

matières premières : 10 % à t200h.

Avec le séchage en étuve à 50°C (traits pleins), les écorces de douglas et d'épicéa semblent atteindre un pourcentage optimal de **10% au bout de 10h**, et se stabilisent à 3% à t54h pour les trois écorces. On peut considérer que les matières premières sont stables quand le taux d'humidité est inférieur à 10 % (Jylhä *et al.* (2021)).

En conclusion, le séchage en étuve à 50°C présente un avantage, de par ses conditions contrôlées et son gain de temps comparé au séchage à l'air libre. Cependant, pour une quantité importante d'écorces à l'échelle industrielle, il peut être plus facile d'étaler les écorces à l'air libre et attendre au moins 8 jours (200h).

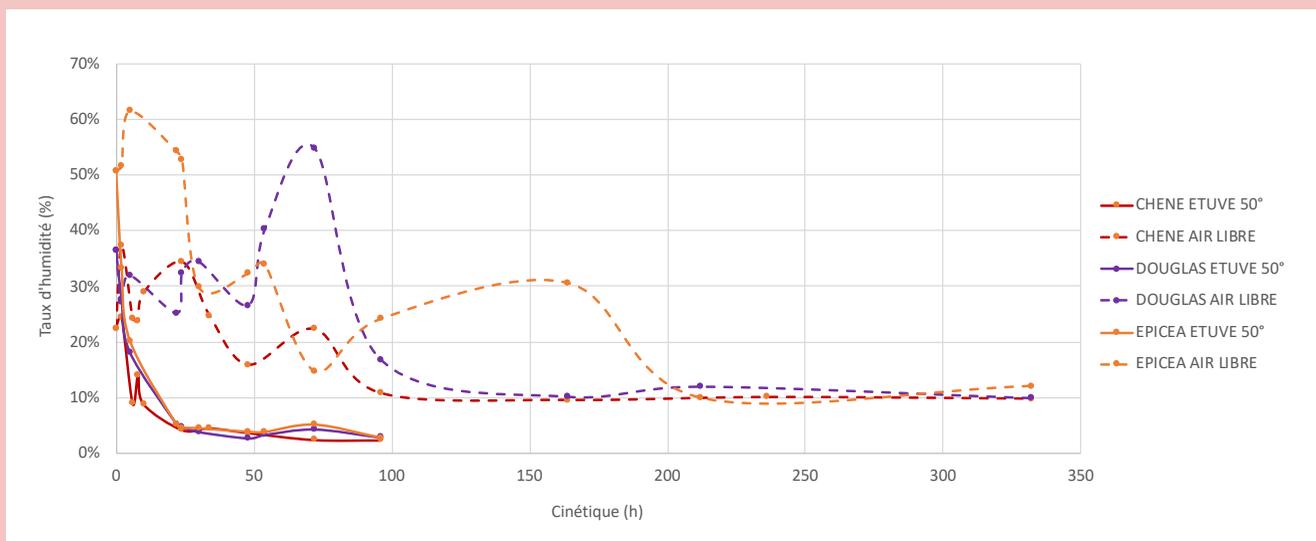


Figure 3.1. Cinétique de séchage des différentes écorces selon deux conditions : en étuve à 50°C ou à l'air libre (Tamb).

Broyage

L'objectif de cette expérience est de déterminer la granulométrie idéale pour permettre les extractions. Il faut pour cela trouver le bon équilibre en tenant compte de deux facteurs :

1. Une granulométrie plus fine permet une plus grande surface de contact avec le solvant d'extraction, et donc en théorie, une meilleure extraction de molécules.
2. En deçà d'une certaine granulométrie, il existe un risque de colmatage en fonction des appareils utilisés.

Un lot d'écorces broyées grossièrement et séchées en étuve à 40°C pendant 48h a servi pour les essais de granulométrie.

Chaque écorce est broyée en utilisant différentes mailles (8 mm ; 4 mm ; 2 mm ; 1 mm et 0,5 mm).



Figure 3.2. Différentes granulométries sur les écorces de chêne (a), douglas (b) et épicea (c) (de gauche à droite : broyage grossier ; 8 mm ; 4 mm ; 2 mm ; 1 mm et 0,5 mm).

Pour déterminer le broyage optimal pour chaque écorce, un tamisage des poudres d'écorces broyées a été réalisé permettant d'évaluer la densité de la poudre. Le tamisage est une méthode simple et économique qui consiste à superposer de tamis dont la toile a une maille calibrée décroissante.

Pour éviter un problème de colmatage lors des filtrations après extractions solide/liquide, **il est nécessaire d'avoir une faible proportion de particules dites « poussières » (particules < 250 µm)** tout en ayant une fine granulométrie permettant une bonne extraction des molécules cibles. Or, on constate une forte augmentation (en %) des particules inférieures à 250 µm entre un broyage à une granulométrie de 4 mm à 2 mm (de 16,3 à 35,8% pour le chêne, de 21 à 42,4% pour le douglas et de 6,9 à 19,8% pour l'épicea).

En conclusion, les conditions optimales de broyage pour les trois écorces sont fixées à une **granulométrie de 4 mm** afin de limiter la proportion de particules <250 µm tout en ayant une la plus fine granulométrie possible apportant une meilleure extraction des composés d'intérêt.

Optimisation des étapes de prétraitement par Improve

Actuellement, de nombreux et divers équipements sont disponibles à l'échelle industrielle pour assurer ces prétraitements. Afin d'appréhender les possibilités et limites de ces méthodes et machines, une mission d'expérimentation a été confiée au centre de recherche Improve.

Cette mission a consisté en une journée d'expérimentation, guidée par le savoir-faire du

prestataire, sur différents équipements afin de comprendre les limites et possibilités de prétraitements à appliquer aux écorces industrielles de scierie, ainsi que les équipements adaptés. La présente section reprend les résultats de cette mission d'essais exploratoires.

Au total, 15 essais de séchage, broyage et fractionnement ont été réalisés lors de la journée d'essai. Voici les principales observations effectuées lors de cette étude :

- Une humidité trop élevée (dans ce cas-ci, 42,5 %) engendre des colmatages ou des bourrages lors des différentes étapes du procédé. Le séchage est donc nécessaire avant de broyer les écorces.
- L'humidité est un point critique du projet.
- Le dimensionnement de l'équipement pilote est également un élément essentiel afin d'éviter les bourrages causés par un enchevêtrement des écorces entre-elles.
- Les 15 essais réalisés n'ont pas permis de générer des échantillons visiblement enrichis en écorce, en bois, en écorce interne et/ou en écorce externe visible à l'œil nu. Il est donc compliqué d'imaginer une étape de séparation de ces différentes parties en amont de l'extraction.
- La meilleure option afin de réaliser un fractionnement semble de sécher la matière et ensuite broyer de sorte à dissocier l'écorce et le bois voire l'écorce interne et de l'écorce externe pour ensuite réaliser une électroséparation.

Extraction

Cette section présente les résultats des expériences réalisées par le Celabor autour de l'extraction. L'objectif est de trouver la meilleure méthode d'extraction en tenant compte de divers paramètres (efficacité à extraire les molécules d'intérêts, couts de l'extraction...)

Dans un premier temps le Celabor a sélectionné 3 solvants différents. Chaque solvant sera testé et les conditions optimales seront sélectionnées pour chaque espèce d'écorce (température, durée, ...). Nous passons ici en revue les résultats des différents tests de solvants.

Les 3 solvants sélectionnés sont des solvants polaires, ce qui implique que les molécules extraites seront des molécules polaires. L'efficacité de l'extraction sera donc évaluée sur base de l'extraction d'une famille de composés polaires, les polyphénols. Pour cela, la méthode de Folin-Ciocalteu sera utilisée. **Cette méthode n'a pas pour but de donner la composition exacte en polyphénols, mais bien de donner un aperçu de la quantité de polyphénols totaux extraits, et donc de l'efficacité de l'extraction.** Le dosage des polyphénols par cette méthode se fait donc sur des extraits liquides.

Les différents essais d'extraction ont été réalisés sur les écorces séchées à l'air libre et broyées à une granulométrie de 4 mm. Les extractions ont été réalisées en diluant 10g de matière sèche dans 100 mL de liquide.

Par la suite, les extraits optimaux seront sélectionnés et concentrés par évaporation de l'EtOH et/ou lyophilisation (non valable pour les extraits A-LEEN,

conservés à 4°C). Les extraits secs récupérés serviront à calculer les rendements d'extraction ainsi que doser les composés majoritaires par UPLC (voir p. 35 « Dosage des métabolites secondaires par UPLC-DAD-MS »)

Macération à l'eau

Température (40-60-90°C) et durée d'extraction (30-60-90-120') (36 macérations)

Tout d'abord la température et la durée d'extraction optimales ont été déterminés pour chaque type d'écorce. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous.

On y observe que la teneur en polyphénols augmente proportionnellement à la température pour les 3 essences. Pour **optimiser l'extraction des molécules d'intérêt**, les macérations à l'eau seront donc fixées à **90°C** pour les essais suivants.

La durée d'extraction ne semble cependant que peu influencer la teneur en polyphénols. À 90°C, pour les écorces de chêne et d'épicéa, un plateau est atteint à 60 minutes, alors que pour les écorces de douglas, de plus fortes teneurs en polyphénols sont observées lors de macération de 90 minutes.

En conclusion, la température optimale pour une extraction à l'eau semble être 90°C pour les 3 essences tandis que la durée d'extraction est de 60 minutes pour le chêne et l'épicéa et de 90 minutes pour le douglas.

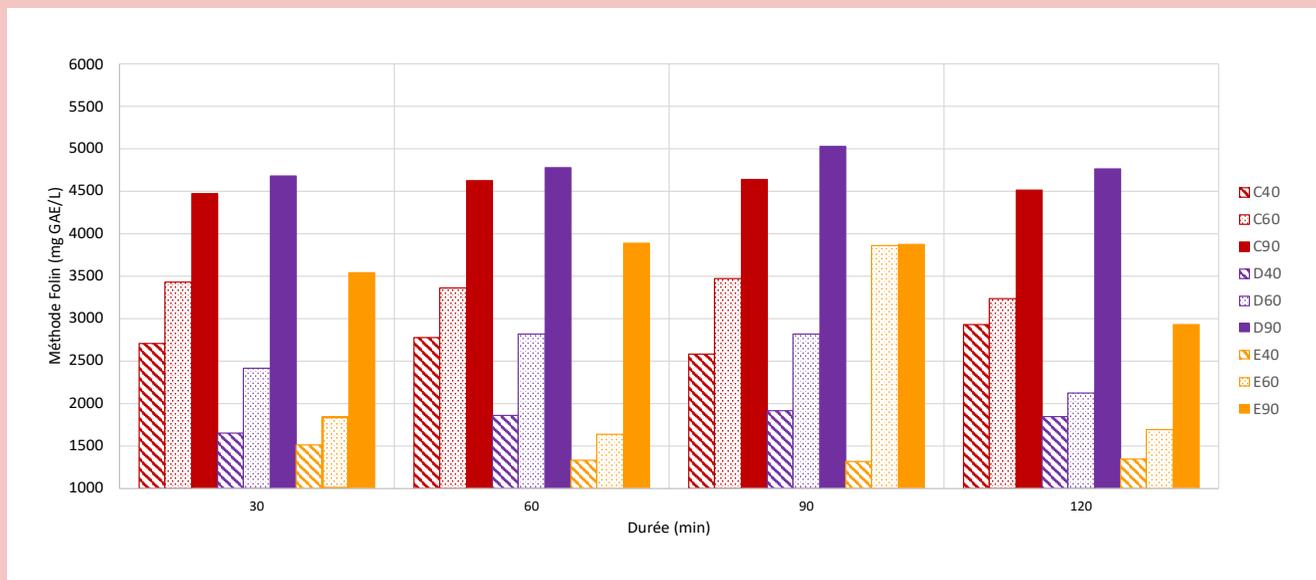


Figure 3.3. Cinétique de macérations à l'eau chaude des écorces de chêne (rouge), douglas (violet) et épicéa (orange) en fonction de différentes températures d'extraction (40, 60 et 90°C).

Rapport de bain optimal (18 macérations)

L'objectif est d'optimiser la quantité de solvant à utiliser pour les extractions, en trouvant à nouveau un équilibre entre la maximisation de l'extraction et le volume de solvant à utiliser.

Suite aux analyses UPLC réalisées sur les extraits obtenus, les résultats nous indiquent qu'un ratio de 1/10 est préférable à 1/5.

Bilan macérations à l'eau chaude

Sur base des divers essais réalisés qui prennent en compte les rendements et teneurs en extractibles, les conditions d'extraction optimales pour les 3 écorces sont les suivantes:

(i) Chêne CHE030

Ratio 1/10; 90°C; 60 minutes - 9% - 4337,23 mg GAE/L

(ii) Douglas DOUG030

Ratio 1/10; 90°C; 90 minutes - 7% - 5008,50 mg GAE/L

(iii) Épicéa EPI030

Ratio 1/10; 90°C; 60 minutes - 8% - 3270,08 mg GAE/L.

Extraction hydroalcoolique

Les tests d'extraction à l'éthanol auront pour objectif de déterminer:

- La température et durée d'extraction
- La concentration optimale en éthanol

Suite aux premières conclusions de la section précédente, le rapport de bain 1/10 sera utilisé pour les extractions suivantes.

Température (20-40-60°C) et durée d'extraction (30-60-90-120') (36 macérations)

Pour cette première étape, le pourcentage d'EtOH a été fixé à 70%. Les résultats sont présentés dans la figure de la page suivante.

De la même manière que pour les macérations à l'eau chaude, le paramètre température influence sur les polyphénols présents dans les extraits, avec quelques différences cependant. La température optimale semble ici être atteinte dès **40°C pour le chêne et l'épicéa**, tandis qu'une température de **60°C semble être optimale pour le douglas**. La **température de 40°C** a été fixée pour la suite des expériences sur les différentes matières premières

Tout comme pour les macérations à l'eau chaude, un plateau semble atteint à **60 minutes** pour l'épicéa et le chêne, alors que pour les écorces de douglas, de plus fortes teneurs en polyphénols sont observées lors de macération de **90 minutes**.

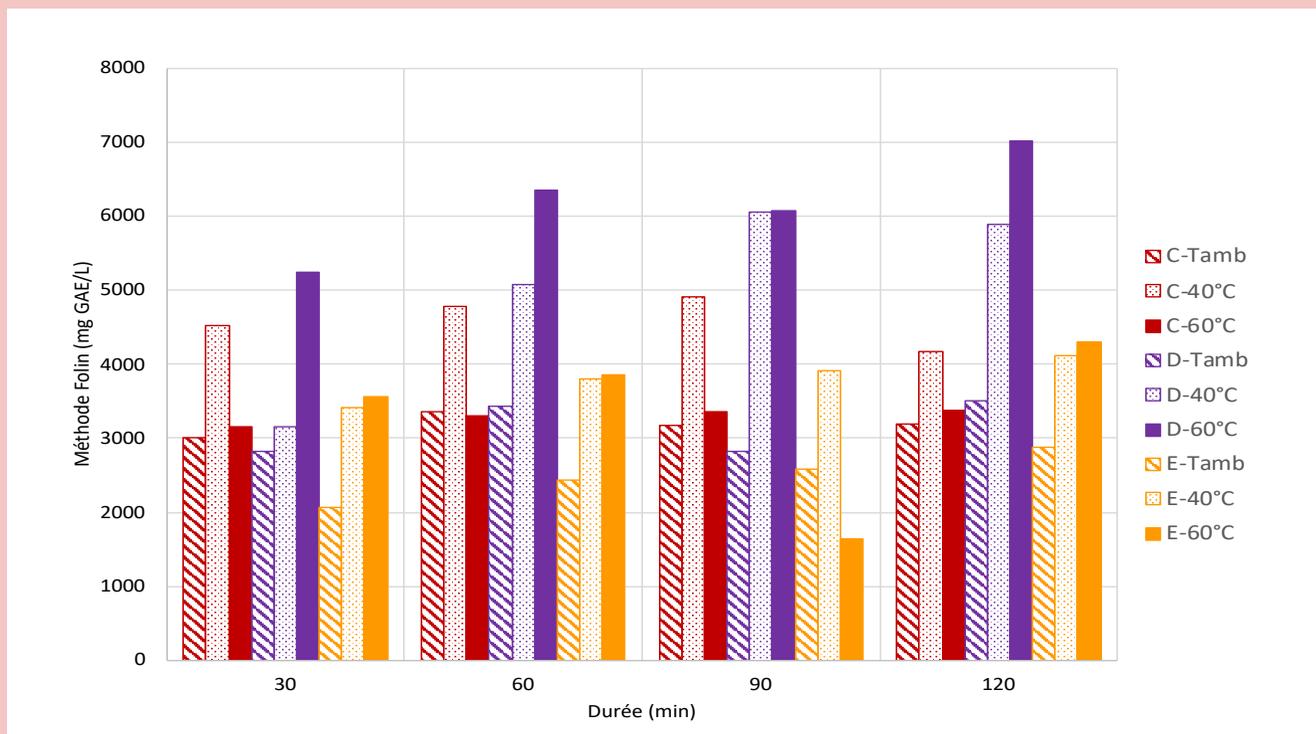


Figure 3.4. Cinétique de macérations hydroalcooliques (EtOH 70%) des écorces de chêne (rouge), douglas (violet) et épicéa (orange) en fonction de différentes températures d'extraction (Tamb, 40 et 60°C).



Sélection du ratio EtOH/H₂O (50-70-100 % EtOH) (9 macérations)

Lors de cette expérience (conditions optimales utilisées sur base des résultats précédents), nous constatons que la **teneur en polyphénols diminue lorsque la concentration en éthanol augmente**. D'après ces résultats, le mélange EtOH/H₂O 50/50 présente donc le ratio optimal pour obtenir une teneur plus importante en extractibles des différentes écorces.

Néanmoins, des analyses UPLC viennent contredire quelque peu ces résultats en montrant que les composés d'intérêt sont en réalité mieux extraits avec de l'EtOH 70 %.

Les paramètres optimaux pour une extraction hydroalcoolique sont donc les suivants.

Bilan macérations hydroalcooliques

Sur base des divers essais réalisés qui prennent en compte les rendements et teneurs en extractibles, les conditions d'extraction optimales pour les 3 écorces sont les suivantes :

(i) Chêne CHE016

EtOH 70 % ; ratio 1/10 ; 40°C ;
60 minutes - 5 % - 3417,41 mg GAE/L

(ii) Douglas DOUG016

EtOH 70 % ; ratio 1/10 ; 40°C ;
90 minutes - 7 % - 4751,07 mg GAE/L

(iii) Épicéa EPI016

EtOH 70 % ; ratio 1/10 ; 40°C ;
60 minutes - 9 % - 3222,32 mg GAE/L

Une autre batterie de tests a été effectuée avec des extractions hydroalcoolique pressurisées (100-130-160°C). Cette méthode étant peu pertinente en raison du coût que cela représente, nous nous contenterons de décrire brièvement les résultats :

- Les concentrations en polyphénols extraits sont plus élevées qu'à pression atmosphérique
- Globalement, au plus la température d'extraction est élevée (160°C), au plus la teneur en polyphénols est importante (avec néanmoins un plateau à 130°C pour le chêne et le douglas)
- Les analyses UPLC démontrent qu'une plus grande quantité de molécules d'intérêt est retrouvée dans les extractions à 130°C
- Le ratio ETOH/H₂O optimal est de 70 %
- **Les conditions optimales seraient donc 130°C et EtOH à 70 %**

A-LEEN

Le solvant A-LEEN est un solvant utilisé en formulation cosmétique, certifié Ecocert et COSMOS et représente donc une alternative durable pour les extractions.

Température (ambiante - 50°C) et durée d'extraction (30-60-90-120') (24 macérations)

Les teneurs en polyphénols par la méthode Folin

obtenues sur les 24 macérations sont représentées à la figure ci-dessous.

De la même manière que pour les macérations à l'eau chaude et les extractions hydroalcooliques, le paramètre température influence fortement sur les polyphénols présents dans les extraits. Pour chaque essence, et quelle que soit la durée d'extraction, la teneur en polyphénols est plus importante à **50°C, qui est donc la température optimale.**

À cette température, une tendance à l'augmentation des

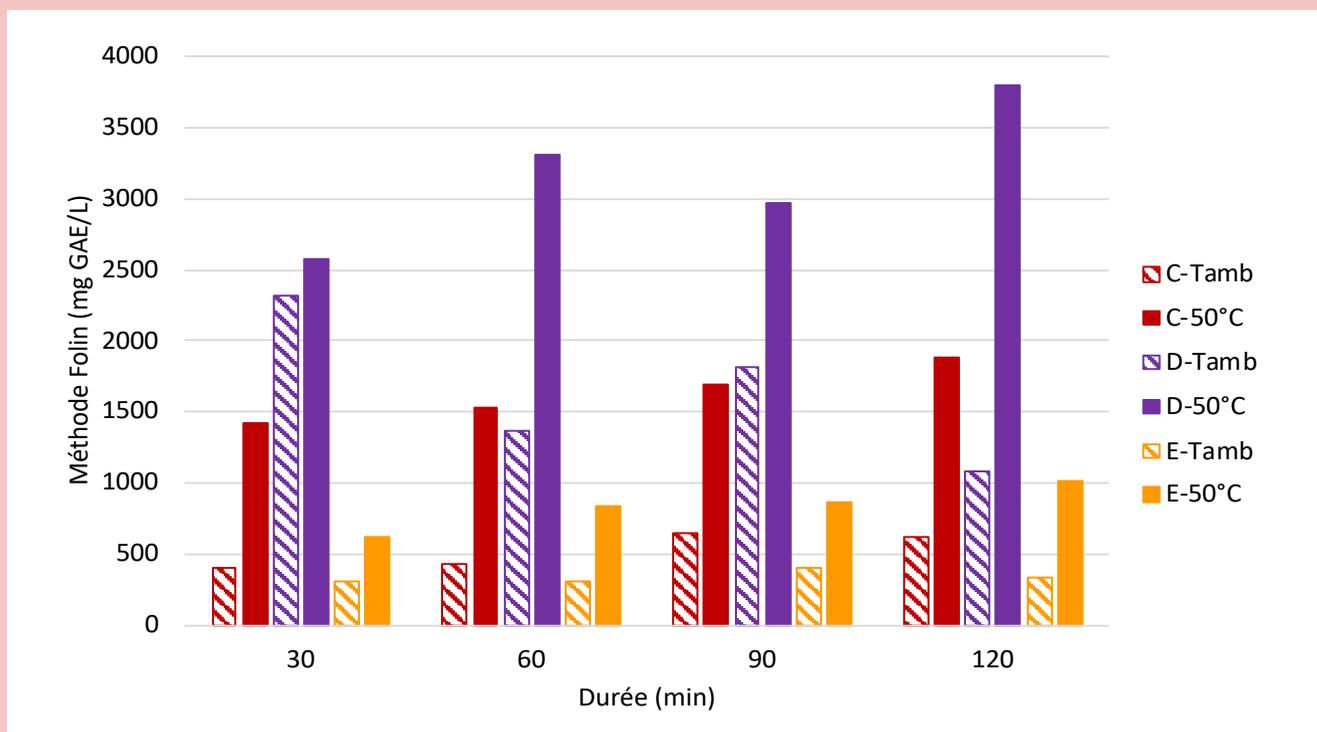


Figure 3.5. Cinétique de macérations avec solvant A-LEEN des écorces de chêne (rouge), douglas (violet) et épicéa (orange) en fonction de deux températures d'extraction (Tamb et 50°C).

teneurs en polyphénols en fonction du temps est observée pour les 3 matières premières. Cependant, pour des raisons pratiques, une durée de **60 minutes** est fixée pour la suite comme durée optimale.

Sélection du ratio A-LEEN/H₂O (9 macérations)

En faisant varier le ratio A-LEEN/eau, on remarque qu'une plus grande proportion d'eau permet d'extraire une plus grande quantité de polyphénols. L'utilisation du solvant A-LEEN à **30%** présente le pourcentage optimal pour obtenir une teneur plus importante en extractibles des différentes écorces par macérations à 50°C.

Hydrodistillation par entrainement à la vapeur et assistée par micro-onde

Dans cette partie nous nous intéressons aux huiles essentielles, molécules volatiles qui peuvent être extraites par hydrodistillation.

Bilan macérations avec le solvant A-LEEN®

Sur base des divers essais réalisés qui prennent en compte les teneurs en extractibles, les conditions d'extraction optimales pour les 3 écorces sont les suivantes:

(i) Chêne CHE031

A-LEEN 30%; ratio 1/10; 50°C;
60 minutes – 4476,76 mg GAE/L

(ii) Douglas DOUG031

A-LEEN 30%; ratio 1/10; 50°C;
60 minutes – 4388,38 mg GAE/L

(iii) Épicéa EPI031

A-LEEN 30%; ratio 1/10; 50°C;
60 minutes – 5015,09 mg GAE/L

	ÉPICÉA				CHÊNE				DOUGLAS			
	T°C	Durée	Concentration	Polyphénols (mg GAE/L)	T°C	Durée	Concentration	Polyphénols (mg GAE/L)	T°C	Durée	Concentration	Polyphénols (mg GAE/L)
Macération eau chaude	90°C	60'	/	3270	90°C	60'	/	4337	90°C	90'	/	5009
EtOH	40°C	60'	70%	3222	40°C	60'	70%	3417	40°C	90'	70%	4751
A-LEEN	50°C	60'	30%	5015	50°C	60'	30%	4477	50°C	60'	30%	4338

Tableau 3.2 : Conditions optimales déterminées pour chaque solvant par essence

Pour les essais d'hydrodistillations, les conditions ont été fixées selon les paramètres suivants :

- Hydrodistillations conventionnelles (HC) : rapport de bain 1/10 (s/L) ; reflux ; 4h
- Hydrodistillation assistée par micro-ondes (HMAE) : rapport de bain 1/10 (s/L) ; reflux ; 0,5h

	Extraction	Code	Rendement (mL/kg)	Rendement (%)
Chêne	HC	CHE028	0,99	0,10
	HMAE	CHE029	-	-
Douglas	HC	DOUG028	2,46	0,25
	HMAE	DOUG029	-	-
Épicéa	HC	EPI028	0,40	0,04
	HMAE	EPI029	-	-

Tableau 3.3. Synthèse des rendements

Les résultats nous montrent que les rendements obtenus sont faibles, et les huiles essentielles obtenues ne présentent pas d'odeur pertinente. Ceci semble indiquer que les écorces sont peu riches en composés volatils. Les terpènes ont néanmoins été dosés par GC-MS.

Les huiles essentielles d'écorces d'épicéa sont plus riches que les huiles essentielles d'écorces de chêne et de douglas, le principal composé étant le β -pinène. Parmi les autres composés dosés, on trouve aussi le cis-nérolidol, le limonène, le trans-ocimène ou encore le β -caryophyllène.

Conclusion intermédiaire

- Les rendements d'extraction les plus intéressants (> 10 %) corrélés avec les teneurs en polyphénols totaux les plus sont obtenus par extractions pressurisées. Cependant ce type d'extraction n'est pas facilement transposable à l'échelle industrielle
- Globalement on a des meilleures extractions **lorsque la température augmente.**
- La **durée d'extraction** ne semble **pas être un paramètre déterminant**, même si le douglas semble avoir besoin de durée d'extractions un peu plus longue
- Pour l'éthanol et le A-LEEN, leur concentration influence l'extraction, avec un optimum à **70 % pour l'éthanol** et à **30 % pour l'A-LEEN.**
- Les 3 essences sont relativement proches en termes de teneur en polyphénols totaux dans chacune des extractions
- Étant donné leur facilité de transposition à l'échelle industrielle, les macérations semblent une bonne méthode d'extraction
- L'utilisation du solvant A-LEEN 30 % avec de l'eau donne également des teneurs en polyphénols totaux intéressantes sans nécessiter un chauffage à 90°C pour les macérations à l'eau seule. L'inconvénient majeur est l'absence d'informations détaillées sur les compositions chimiques en raison de la non évaporation du solvant. Néanmoins, les essais réalisés avec ce solvant apportent des perspectives de valorisation en cosmétique.
- L'écorce d'épicéa semble être la plus riche en terpènes (principalement β -pinène).

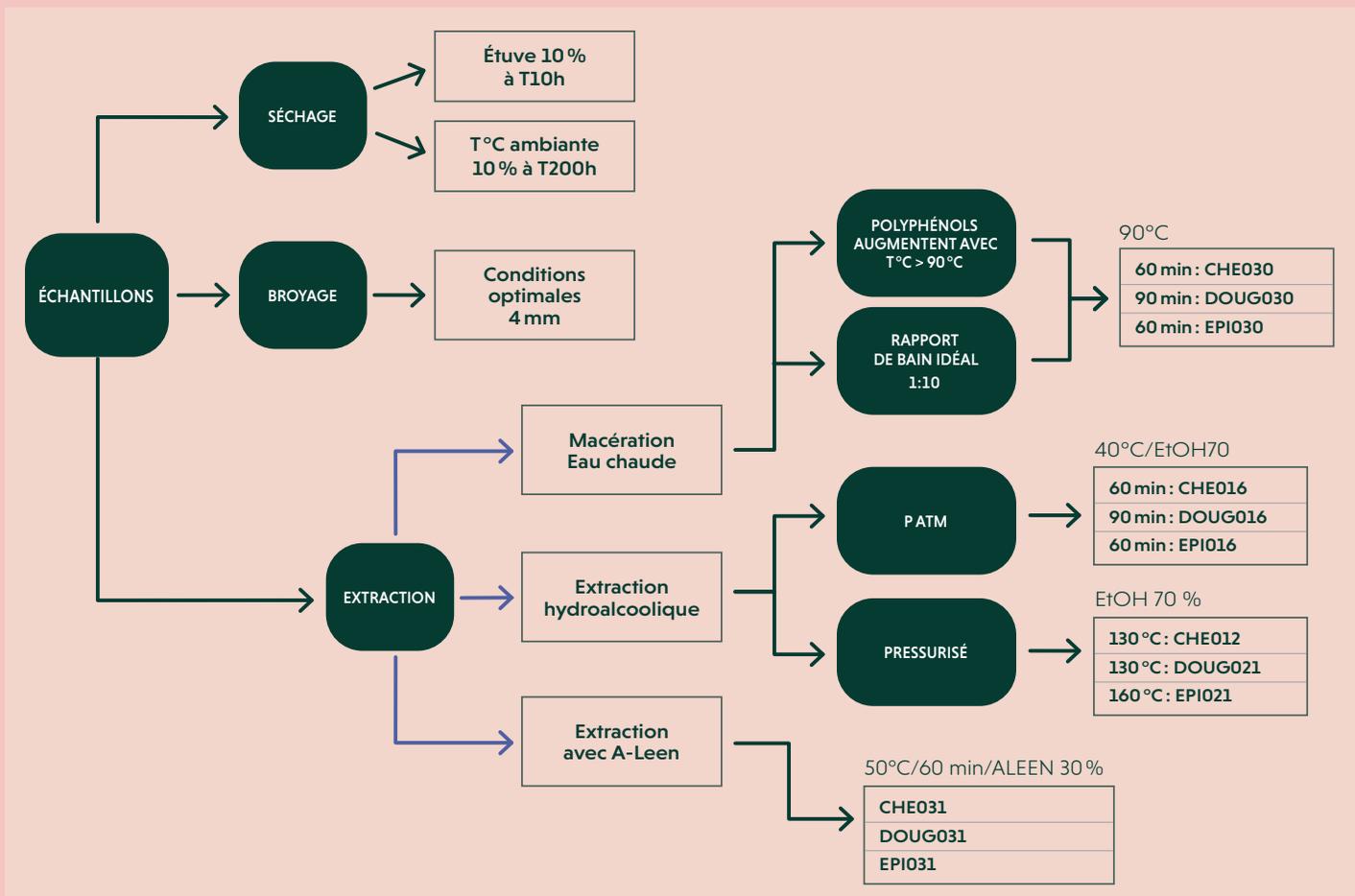


Figure 3.6. Synthèse des tests de prétraitement et d'extraction réalisés par Celabor

Ajoutons que des tests de validation réalisés par l'Université de Liège ont aboutis à des résultats fort semblables. D'après les données obtenues, le solvant A-LEEN 30 % semble être le meilleur solvant d'extraction (en terme de rendement), suivi de l'éthanol, puis de l'eau. Notons que ces résultats rendent compte de la masse de tous les produits extraits et non pas de la sélectivité du solvant.

Concernant les concentrations d'équivalents acide

gallique mesurées par l'ULiège, les comparaisons sont compliquées étant donné que les protocoles ne sont pas tout à fait pareils. On constate néanmoins certaines différences, notamment le fait que les valeurs sont systématiquement plus faibles pour les extractions à l'eau, ce qui n'est pas le cas pour les analyses réalisées par le Celabor. Cela ne modifie cependant pas les conclusions que l'on peut tirer de ces tests d'extraction, dans la mesure où les différences entre solvants restent faibles.

Identification des molécules extraites

Une fois les tests d'extraction réalisés avec différents solvants, l'objectif est ici d'aller voir plus en détail la composition des différents échantillons en essayant d'identifier et de quantifier les grandes familles de molécules présentes. Cette partie nous donnera donc des informations sur le « potentiel chimique » des écorces.

Dosage des métabolites secondaires par UPLC-DAD-MS

Sur base de la littérature scientifique et des expériences précédentes chez CELABOR, 24 composés phénoliques standards ont été sélectionnés pour cette étude.

Ci-dessous (figure 3.7), les profils chromatographiques de l'extrait de douglas obtenu par extraction hydroalcoolique sous pression sont représentés. On retrouve la taxifoline (6,50 min), principal composé présent dans l'extrait de douglas.

Les concentrations en composés dosés dans les extraits optimaux sont représentées par un graphique regroupant ces extractibles par catégories pour visualiser l'intérêt et les potentielles valorisations des extraits (figure 3.8).

Dans ce graphique, les teneurs ont été rapportées aux rendements d'extraction. Ce qui est très intéressant, c'est que **les trois écorces sont riches en différentes catégories de composés phénoliques. Les écorces de chêne sont principalement riches en acides tels que l'acide ellagique, les écorces de douglas sont riches en flavonoïdes, majoritairement de la taxifoline et les écorces d'épicéa sont riches en stilbènes tels que l'astringine.**

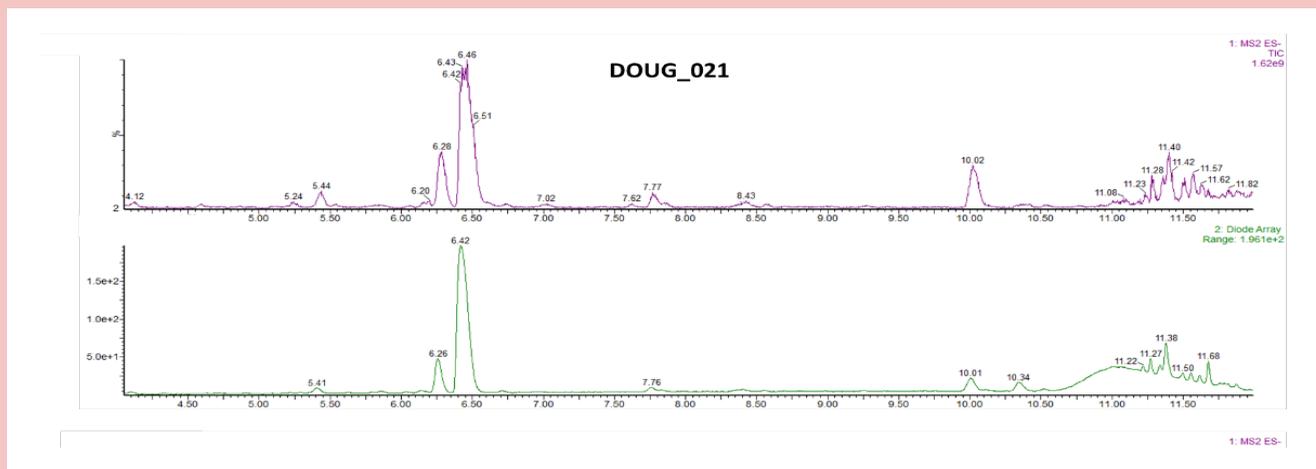


Figure 3.7. Exemple de profils chromatographiques d'un extrait de douglas (DOUG_021) obtenu par extraction hydroalcoolique sous pression. En violet, le chromatogramme full scan en détection MS (détecteur quantitatif) et en vert le chromatogramme en détection UV (détecteur qualitatif).



Figure 3.8. Concentrations des polyphénols dosés (stilbènes, flavonoïdes et acides) dans les extraits d'écorces de chêne, douglas et épicéa en fonction de différents procédés d'extraction. Les codes des échantillons sont détaillés en annexe 1. C_litt, D_litt et E_litt correspondent aux données de la littérature.

Dosage des molécules terpéniques dans les huiles essentielles par GC-MS

Le système utilisé pour cette phase d'identification et de dosage des terpènes est une GC-MS (GC-MS ion trap Thermo ITQ 900). Sur base de la littérature scientifique et des expériences précédentes chez CELABOR, 23 composés terpéniques standards ont été sélectionnés pour cette étude. Sur les 23 terpènes, 19 ont été détectés dans les huiles essentielles.

L'apport des micro-ondes n'a pas permis une meilleure extraction des composés volatils dans les différentes écorces. Ces données confirment les rendements

inférieurs à 0,01% obtenus pour les hydrodistillations assistées par micro-ondes sur les différentes écorces.

Parmi ces terpènes dosés, des différences entre les huiles essentielles issues des trois écorces sont visibles et confirment ce qui se voyait sur les profils chromatographiques à savoir une richesse en composés volatils selon l'ordre suivant: Épicéa > Chêne > Douglas.

L'huile essentielle d'écorces d'épicéa est principalement riche en monoterpènes dont le β -pinène est le composé majoritaire alors que l'huile essentielle de chêne semble plus riche en sesquiterpènes. Dans l'huile essentielle de douglas obtenue de façon conventionnelle, aucun sesquiterpène n'a été dosé.

Dosage des polyphénols et des tannins par spectrophotométrie UV-Vis

Ces analyses ont été faites sur des extraits optimisés et présentent des résultats intéressants.

Selon l'étude de Pascale Richardin (1988) sur les tannins végétaux utilisés dans la fabrication des cuirs, les écorces de chêne contiendraient environ 10 % de tannins.

Dans notre étude, pour la majorité des extraits obtenus à partir des écorces des 3 essences, les teneurs en tannins sont supérieures à 10 % (Figure 3.9).

Ces données très intéressantes présentent un potentiel de valorisation des tannins issus des écorces dans divers secteurs tels que les résines, les plastiques ou encore dans les produits pharmaceutiques.

À ce jour, il manque cependant d'usines permettant l'extraction des tannins à l'échelle industrielle.



Figure 3.9. Teneurs en tannins dans les extraits d'écorces de chêne (rouge), douglas (violet) et épicea (orange) en fonction de différents procédés d'extraction. Les codes des échantillons sont détaillés en annexe 1. En vert, des données issues de la littérature sur les écorces de chêne, sapin et châtaignier.

Conclusion

- Les divers procédés d'extraction testés avec les conditions optimisées sont résumés dans le tableau bilan ci-dessous (voir p. 41). Les rendements d'extraction les plus intéressants (> 10%) corrélés avec les teneurs en polyphénols totaux les plus importants (> 5000 mg GAE/L = 5 mg GAE/g, si on considère 1g = 1mL) sont obtenus par extractions pressurisées.

Cependant ce type d'extraction n'est pas facilement transposable à l'échelle industrielle. En se focalisant sur les macérations, plus faciles à transposer à l'échelle pilote, les teneurs en composés dosés restent néanmoins intéressantes (de 2,1% à 15,3% de polyphénols dosés). Les macérations semblent donc une bonne méthode d'extraction dans cette étude.

- Les rendements d'extraction par macérations semblent peu importants, mais restent néanmoins supérieurs à ce qu'on peut trouver dans la littérature (rendements inférieurs à 5% d'après Sut *et al.* 2022). Le choix d'eau ou de solvant hydroalcoolique dépend des compositions des différentes matières premières :

- Extraction des **acides phénoliques dans les écorces de chêne** ➔ macération à l'eau.
- Extraction de la **taxifoline dans les écorces de douglas** ➔ macération hydroalcoolique.
- Extraction d'un **mélange de taxifoline et stilbènes dans les écorces d'épicéa** ➔ macération hydroalcoolique.

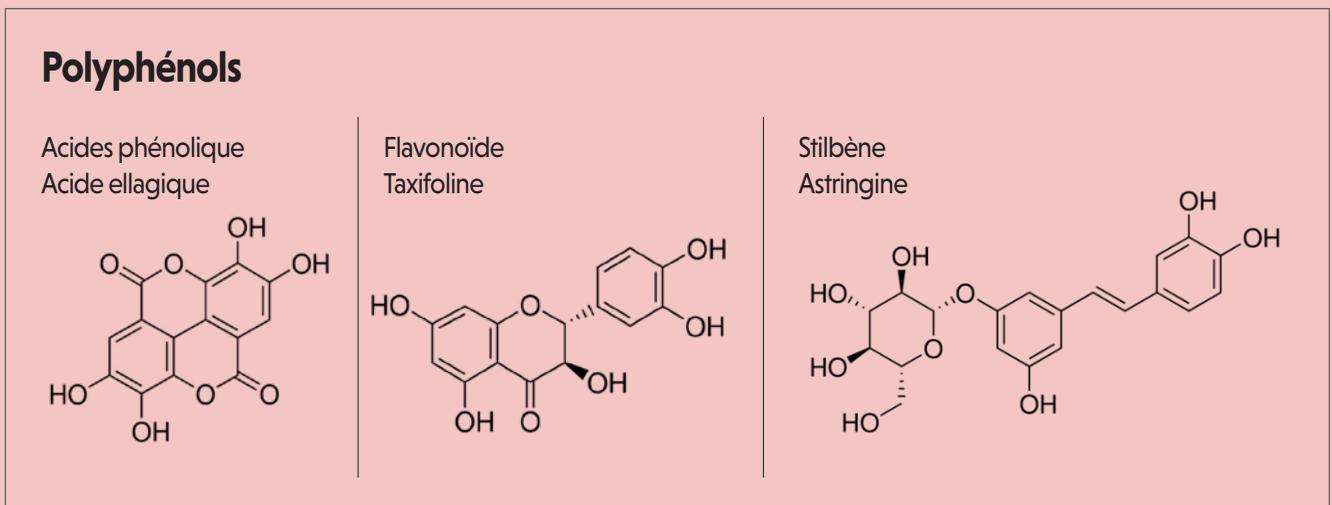


Figure 3.10. Structure chimique des 3 polyphénols d'intérêts identifiés

Chêne

- Dans notre étude, **l'extrait de chêne (CHE030) contient 48,605 mg/g (4,861 %) d'acide ellagique** (Tableau 1 en annexe), alors que dans la littérature on trouve une teneur de seulement 0,9782 mg/g pour *Quercus robur* après extraction aux ultrasons avec du méthanol (Elansary *et al.* 2019)
- **L'acide ellagique est connu pour ses fortes propriétés antioxydantes, antiprolifératives et anticancéreuses.** Des compléments alimentaires (capsules et gélules) d'extrait de grenadier contenant 40 % d'acide ellagique sont sur le marché actuel. Une valorisation des écorces de chêne peut donc être envisagée dans le secteur des compléments alimentaires mais également de la cosmétique en raison de leur richesse en flavonoïdes (Ferreira-Santos *et al.* 2020).
- Ces résultats sont confirmés par l'étude du laboratoire de l'ULiège

Douglas

- L'extraction par macération hydroalcoolique des composés d'intérêt dans les écorces de douglas (DOUG016) présente un fort intérêt pour la présence très importante en **taxifoline** dans l'extrait
- Dans cette étude, **14,6 % de taxifoline** a pu être extraite sans enrichissement. Ce fort pourcentage est similaire à ce qu'on trouve dans une étude évaluant l'importance économique de la taxifoline (taxifoline présente à 13 % du poids sec de l'écorce, D_litt, Figure 3.8) (Warlo *et al.* 2023).

- L'ANSES a fait référence en 2011 de la mise sur le marché de la taxifoline issue du bois de mélèze (*Larix gmelinii*) et **valorisable en tant qu'ingrédient alimentaire pour ses propriétés antioxydantes** (Rapport Anses - Saisine n° 2011-SA-0256).
- Des compléments alimentaires à base de taxifoline végétale (aussi appelée dihydroquercétine) sont déjà sur le marché avec des concentrations standardisées à 92,2 et 92,6 % dans un extrait de mélèze dans l'extrait final (ex. marque Sunday Natural, ou laboratoire Synapsya).
- L'ajout d'une étape d'enrichissement en taxifoline des extraits d'écorces de douglas pourrait concurrencer la taxifoline extraite de mélèze
- En perspectives, des études supplémentaires d'enrichissement ou de purification de la taxifoline dans les extraits d'écorces de douglas peuvent être envisagées comme poursuite innovantes. En fonction de la pureté, la taxifoline peut également être valorisée dans le domaine pharmaceutique.
- En raison du coût du marché de la taxifoline élevé (800-1000 \$ ou 700-900€/g de taxifoline pure), cela fait des écorces de douglas une matière première très prometteuse (Trivelato *et al.* 2016)
- Ces résultats sont confirmés par l'étude du laboratoire de l'ULiège

Épicéa

- L'extraction par macération hydroalcoolique des composés d'intérêt dans les écorces d'épicéa (EPI016) présente un intérêt pour la richesse de l'extrait en stilbènes tels que l'astringine
- Dans notre étude, on trouve 40,06 g/kg (4,006 %) d'astringine comparés aux 11,57 g/kg dosée dans les écorces d'épicéa dans la littérature (Gabaston *et al.* 2017, E_litt, Voir annexe 1).

- **Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antifongiques.**
- Les écorces d'épicéa présentent également des teneurs en composés terpéniques dont principalement le β -pinène (monoterpène hydrocarbure) dans son huile essentielle, mais à des concentrations faibles qui ne favorisent pas son exploitation dans d'autres secteurs.
- Ces résultats sont confirmés par l'étude du laboratoire de l'ULiège.

	Polyphénols principaux	Terpènes	Solvant à privilégier	Molécule d'intérêt	Propriétés	Utilité
Chêne	Acides	++	Eau	Acide ellagique	Antioxydantes antiprolifératives, anticancéreuses	Compléments alimentaires, cosmétique
Douglas	Flavonoïdes	+	EtOH70%	Taxifoline	Antioxydante	Compléments alimentaires
Épicéa	Stilbènes	+++	EtOH70%	Astringine B-pinène	Antifongique	Bio-contrôle

Tableau 3.4. Résumé des teneurs en molécules d'intérêts

Extraits d'écorces et identification de molécules

Matière première	2.2 Macérations à l'eau chaude			2.3. Extraction avec solvant hydroalcoolique						2.4. Macérations avec solvant A-LEEN			2.5. Hydrodistillations		
	Chêne	Douglas	Épicéa	Sans pression			Avec pression			Chêne	Douglas	Épicéa	Chêne	Douglas	Épicéa
Code	CHE030	DOUG030	EPI030	CHE016	DOUG016	EPI016	CHE021	DOUG021	EPI021	CHE031	DOUG031	EPI031	CHE028	DOUG028	EPI028
Solvant	H ₂ O			EtOH 70%			EtOH 70%			A-LEEN 30%			H ₂ O		
Durée (min)	60	90	60	60	90	60	20	20	20	60	60	60	240	240	240
Température (°C)	90	90	90	40	40	40	130	130	130	50	50	50	100	100	100
Rendement (%)	9	7	8	5	7	9	12	16	15	-	-	-	0,04	0,1	0,25
Teneurs en polyphénols totaux (mg GAE/L)	4337	5009	3270	3417	4751	3222	5323	13005	7565	4477	4388	5015	-	-	-
Teneurs en composés dosés (%)	5,7	12,3	3,5	2,1	15,3	5,1	5,9	12,3	4,2	-	-	-	0,1	<0,1	4,3
Avantages	Mise à l'échelle industrielle facile			Mise à l'échelle industrielle facile Fortes teneurs en polyphénols totaux			Rendements intéressants Fortes teneurs en terpènes dosés			Mise à l'échelle industrielle facile Formulation pour usage direct			Teneurs intéressantes en terpènes pour les écorces d'épicéa		
Inconvénients	Faibles rendements d'extraction			Faibles rendements d'extraction			Difficulté de mise à l'échelle industrielle			Solvant en cours d'étude Pas d'évaporation possible			Faibles rendements d'extraction		

Tableau 3.5. Tableau de synthèse

Les rendements calculés correspondent au rapport entre la quantité d'extrait sec obtenu et la matière première sèche mise en jeu. Aucun rendement ne peut être établi sur les extraits A-LEEN.

Extraction à l'échelle semi-pilote

Une fois réalisés les premiers tests d'extraction et d'identification de molécules à l'échelle laboratoire, la demande a été faite au Celabor de réaliser certaines extractions à l'échelle semi-pilote.

L'objectif était donc d'obtenir des extraits en quantité suffisante (50g/extrait sec ou 0.5l/extrait liquide) à partir

des écorces des 3 essences forestières testées.

9 extractions ont été réalisées, en utilisant les 3 méthodes déjà testées à l'échelle laboratoire dans leurs conditions optimales (macération à l'eau chaude, extraction hydroalcoolique, extraction au solvant A-LEEN).

Préparation des échantillons

Les différentes extractions à l'échelle semi-pilote ont été réalisées sur les écorces séchées à l'air libre et broyées à une granulométrie de 4 mm.

Le rapport de bain à 1/10 (matière première/solvant) a été choisi en fonction des données obtenues par les essais de macérations à l'eau chaude à l'échelle laboratoire.

Matériel et méthodes

Broyeur à couteaux Retsch SM-300
(Grilles utilisées: 4 mm)

Réacteur NR 6000 - Berghof.
Volume de 6 litres

Évaporateur Rotatif Buchi R-220 Pro
(Température de fonctionnement: 50°C)

Lyophilisateur pilote Telstar Lyobeta 35



Figure 3.11. Photos de l'extraction à l'échelle pilote, de gauche à droite: Extraction sur Berghof (contenance maximale 6L) – extraits avant lyophilisation – filtration des extraits et lyophilisation – extraits secs

Ces étapes, représentées en figure 3.11, sont identiques pour les macérations à l'eau et hydroalcooliques. Il faut cependant inclure une

étape supplémentaire d'évaporation de l'éthanol avant séchage des extraits par lyophilisation dans le cas des macérations hydroalcooliques.

Résultats

Le tableau suivant reprend les principaux résultats obtenus.

Codes Échelle labo	Codes Échelle pilote	Matière première	Paramètres d'extraction (solvant ; durée ; température)	Rendement (%)		Dosage protéines (%)		Teneurs en polyphénols totaux (mg GAE/L* - mg GAE/g)		Teneurs en composés dosés (%)	
				Échelle labo	Échelle pilote	Échelle labo	Échelle pilote	Échelle labo	Échelle pilote	Échelle labo	Échelle pilote
CHE031*	CHE034*	Chêne	A-LEEN 30 % ; 60 min ; 50°C	-	-	-	0,2 %	4477*	2599*	-	-
DOUG031*	DOUG034*	Douglas	A-LEEN 30 % ; 60 min ; 50°C	-	-	-	0,1 %	4388*	4482*	-	-
EPI031*	EPI034*	Épicéa	A-LEEN 30 % ; 60 min ; 50°C	-	-	-	0,1 %	5015*	3325*	-	-
CHE030	CHE035	Chêne	H ₂ O ; 60 min ; 90°C	9 %	4 %	3,8 %	3,4 %	327	364	5,7	5,4
DOUG030	DOUG035	Douglas	H ₂ O ; 90 min ; 90°C	7 %	5 %	1,6 %	1,3 %	392	446	12,3	10,5
EPI030	EPI035	Épicéa	H ₂ O ; 60 min ; 90°C	8 %	6 %	2,9 %	1,2 %	277	299	3,5	1,1
CHE016	CHE036	Chêne	EtOH 70 % ; 60 min ; 40°C	5 %	5 %	1,7 %	1,9 %	401	338	2,1	1,2
DOUG016	DOUG036	Douglas	EtOH 70 % ; 90 min ; 40°C	7 %	7 %	1,0 %	0,8 %	317	408	15,3	24,6
EPI016	EPI036	Épicéa	EtOH 70 % ; 60 min ; 40°C	9 %	9 %	1,3 %	0,8 %	219	268	5,1	2,0

Tableau 3.6. Tableau de synthèse des résultats obtenus sur les extraits à l'échelle laboratoire et pilote.

Les rendements obtenus par extraction hydroalcoolique sont identiques lors du passage de l'échelle labo à l'échelle pilote (Tableau 3.6). Dans le cas des macérations à l'eau, une forte baisse des rendements a été observée (de 8,5 % à 4,4 % à l'échelle pilote pour le chêne). Cette baisse de rendements est probablement due à la montée lente en température d'extraction lors des extractions sur l'appareil pilote (passage de température ambiante à 90°C). Les paramètres d'extraction ont donc été impactées puisque la

température n'a pas été homogène durant toute la durée d'extraction. De plus, ces rendements faibles ont nécessité la réalisation de plusieurs extractions pour atteindre les 50g demandés.

Un problème rencontré à l'échelle pilote concerne la récupération et filtration du liquide mélangé à la poudre d'écorces. Il faudrait envisager une filtration directement en fond de cuve d'extraction.

Dosage des polyphénols par spectrophotométrie UV-Vis

La mesure des teneurs en polyphénols par la méthode Folin, donne une indication qualitative sur les quantités de polyphénols présents. Les dosages ont été réalisés d'une part sur les extraits liquides obtenus après macérations A-LEEN (*), d'autre part sur les extraits secs.

Globalement les teneurs en polyphénols sont stables entre les analyses sur les extraits obtenus à l'échelle du laboratoire et ceux à l'échelle pilote (teneurs entre 219 et 446 mg GAE/g pour les extraits secs). Des variabilités entre les extraits A-LEEN (pentyène glycol) obtenus à l'échelle laboratoire (100 mL) et les extraits obtenus à

l'échelle pilote (550 mL) sont néanmoins observées sur les extraits liquides de chêne et épicéa :

- 4477 mg GAE/L de polyphénols totaux dosés dans l'extrait de chêne (échelle laboratoire) contre seulement 2599 mg GAE/L sur l'extrait de chêne à l'échelle pilote.
- 5015 mg GAE/L de polyphénols totaux dosés dans l'extrait d'épicéa (échelle laboratoire) contre seulement 3325 mg GAE/L sur l'extrait d'épicéa à l'échelle pilote.

Ces variabilités dans les teneurs en polyphénols peuvent provenir de la filtration à l'échelle pilote : une perte de volume de liquide a été observée en raison de la forte absorption du liquide par la matière première.

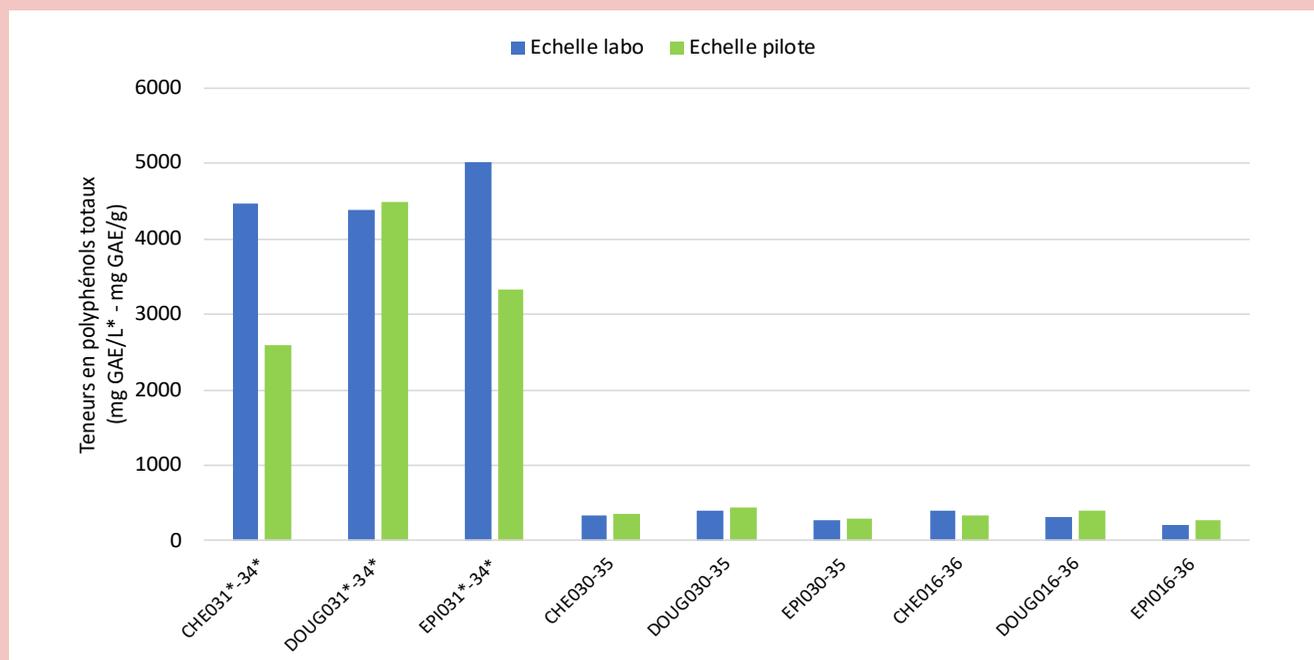


Figure 3.12: Teneurs en polyphénols dans les extraits optimisés produits à partir d'écorces de chêne (CHE), douglas (DOUG) et épicéa (EPI) que ce soit à l'échelle laboratoire (bleu) et à l'échelle pilote (vert). Les mesures ont été réalisées sur les extraits liquides (*) et secs. Les codes des échantillons sont détaillés dans le tableau en annexe p. 74

Dosage des tannins par spectrophotométrie UV-Vis

Les dosages de tannins ont été réalisés sur les extraits produits à l'échelle pilote et mis en comparaison avec les teneurs obtenues sur les extraits secs réalisés à l'échelle laboratoire ainsi que les teneurs issues de la littérature sur d'autres essences (chêne, sapin et châtaignier).

Les extraits liquides présentent des faibles pourcentages en tannins (< 0,5%), le solvant A-LEEN ne semblant pas extraire les tannins des écorces.

Globalement, les résultats obtenus à l'échelle pilote sont similaires à ceux obtenus à l'échelle laboratoire pour les extraits de chêne et de douglas. Étonnement, sur l'essence d'épicéa, de fortes baisses en teneurs en tannins ont été observées sur les extraits pilotes comparés aux extraits laboratoires: 4 fois moins de tannins dans l'extrait aqueux obtenu à l'échelle pilote (6%) et 10 fois moins dans l'extrait éthanolique (2%).

Comparées aux données de la littérature, les données pour les essences de chêne et douglas confirment néanmoins le potentiel intéressant de valorisation des tannins issus des écorces dans divers secteurs (teneurs > 8%).

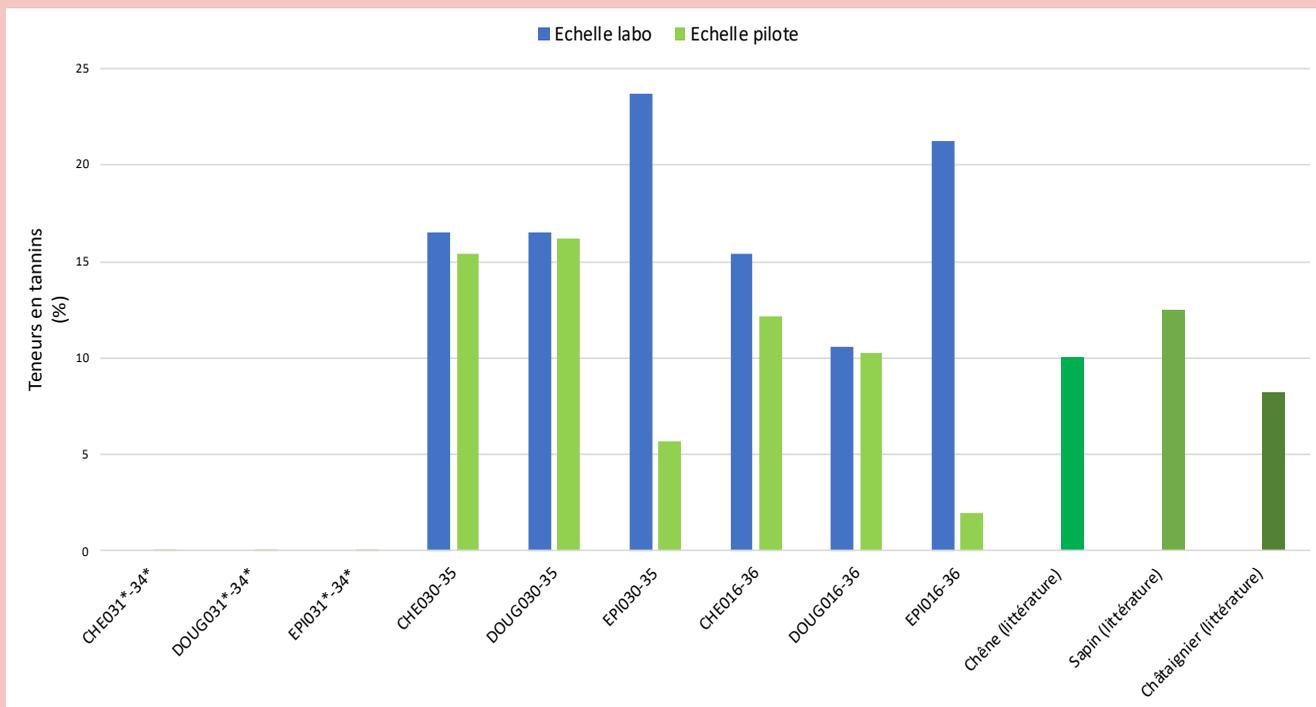


Figure 3.13. Teneurs en tannins dans les extraits d'écorces de chêne (CHE), douglas (DOUG) et épicéa (EPI) que ce soit à l'échelle laboratoire (bleu) et à l'échelle pilote (vert). Les mesures ont été réalisées sur les extraits liquides (*) et secs. Les codes des échantillons sont détaillés dans le tableau en annexe p. 74. En vert foncé sur la droite du graphique: les données issues de la littérature sur les écorces de chêne, sapin et châtaignier.

Dosage des métabolites secondaires par UPLC-DAD-MS

Suite au dosage réalisé en phase 2, 18 composés phénoliques standards ont été sélectionnés pour ce second dosage sur les extraits pilote (vs 24 à l'échelle laboratoire).

La figure 3.14 ci-dessous présente les concentrations en composés dosés dans les extraits obtenus à l'échelle

laboratoire (codes se terminant par 030 et 016) et ceux obtenus à l'échelle pilote (codes se terminant par 035 et 036).

Que ce soit à l'échelle laboratoire ou l'échelle pilote, les familles de composés extraits sont bien les mêmes pour les différentes écorces : les écorces de chêne sont principalement riches en acides, les écorces de douglas sont riches en flavonoïdes et les écorces d'épicéa sont riches en stilbènes.

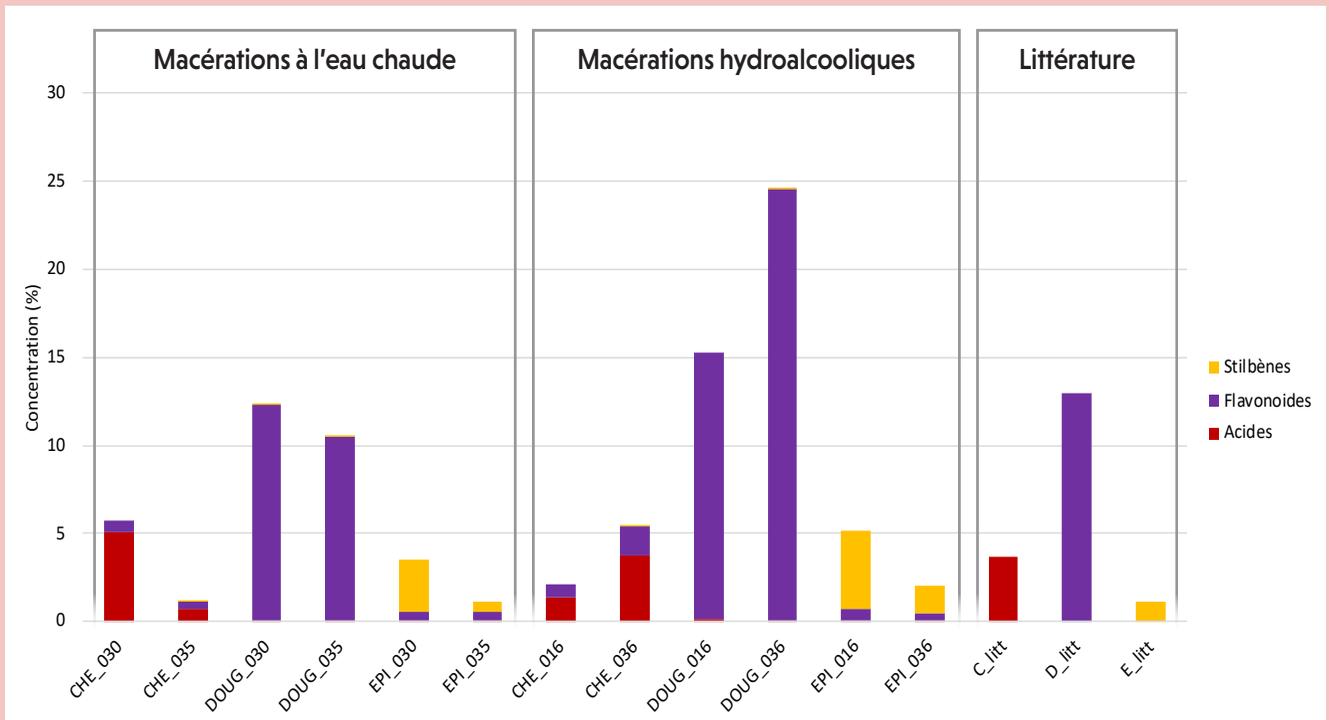


Figure 3.14. Concentrations des polyphénols dosés (stilbènes, flavonoïdes et acides) dans les extraits d'écorces de chêne (CHE), douglas (DOUG) et épicéa (EPI) que ce soit à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote. Les codes des échantillons sont détaillés dans le tableau en annexe p. 74

Macérations à l'eau chaude

Les teneurs en polyphénols dosés sur les extraits aqueux obtenus à l'échelle pilote sont inférieures à celles obtenus sur les extraits à l'échelle laboratoire. L'extrait aqueux de chêne (CHE030), riche en acide ellagique à l'échelle laboratoire (4,861%) ne présente que 0,449% d'acide ellagique à l'échelle pilote (CHE035). La valeur obtenue pour cet extrait d'écorces de chêne à l'échelle pilote est inférieure à ce qu'on peut trouver dans la littérature (3,5-3,7 % de catéchine et d'acide ellagique). Ces diminutions de teneurs également observées sur les extraits pilotes de douglas et épicéa peuvent provenir des problèmes rencontrés pour chauffer à 90°C la cuve d'extraction de 5L.

➔ Nécessité d'optimiser l'extraction à cette échelle si l'on veut mettre en avant la teneur en acide ellagique dans les écorces de chêne.

Macérations hydroalcooliques

Les macérations hydroalcooliques à l'échelle pilote semblent permettre une meilleure extraction des composés phénoliques puisque les teneurs en composés dosés sont supérieures dans les extraits hydroalcooliques obtenus à l'échelle pilote comparées à celles des extraits à l'échelle laboratoire (sauf dans le cas de l'épicéa). Les 24,14 % de taxifoline extraite à l'échelle pilote ont largement dépassé les 13 % et 14,6 % dosés respectivement dans la littérature et à l'échelle laboratoire.

➔ Des replicats d'extraction seraient à prévoir pour confirmer ces résultats très intéressants

Dans le cas des extraits d'épicéa, l'échelle pilote n'a pas permis une meilleure extraction en stilbènes. L'astringine a été extraite en quantité moins importante lors du passage à l'échelle pilote: de 2,7% extrait à l'échelle laboratoire à 0,3% à l'échelle pilote (8 fois moins) pour l'extrait aqueux et de 4% à 1% à l'échelle pilote pour l'extrait hydroalcoolique (4 fois moins). L'astringine a pu se dégrader lors du processus d'extraction à l'échelle pilote puisque les macérations étaient plus longues que celles à l'échelle laboratoire le temps d'atteindre la température souhaitée.

➔ Optimisation de la méthode d'extraction à l'échelle semi-pilote afin de préserver les stilbènes potentiellement détruits.

Bilan

- 9 extraits ont été produits à l'échelle pilote (CHE034, DOUG034, EPI034, CHE035, DOUG035, EPI035, CHE036, DOUG036 et EPI036).
- Ces extraits ont été obtenus à partir de 3 matières premières : écorces de chêne (CHE), douglas (DOUG) et épicéa (EPI)
- 3 méthodes d'extraction ont été utilisées (conditions résumés dans le tableau 3.6):
 - Macération à l'eau chaude : CHE035, DOUG035 et EPI035
 - Extraction à hydroalcoolique (Ethanol 70 %) : CHE036, DOUG036 et EPI036
 - Extraction avec solvant A-LEEN (30 %) : CHE034, DOUG03 et EPI034.
- Les rendements d'extraction pour chaque extraction sont les suivants
 - 3,4 % (CHE035), 1,3 % (DOUG035) et 1,2 % (EPI035)
 - 1,9 % (CHE036), 0,8 % (DOUG036) et 0,8 % (EPI036).
- Les profils en extractibles ont été obtenus, les composés majoritaires identifiés pour chaque essence sont les suivants :
 - acide ellagique dans les écorces de chêne
 - taxifoline dans les écorces de douglas
 - astringine dans les écorces d'épicéa

Conclusion partie 3

Les matières premières de cette étude générées par l'industrie forestière et disponibles en grande quantité sont encore sous-évaluées. Par cette étude, les conditions optimales de pré-traitement (séchage et broyage) ont été identifiées. Les procédés testés peuvent être transposés à l'échelle pilote. Le système de séchage en flux d'air continu et double disques opposés proposé par Dryer One (dryer-one.com) basé à Thimister pourrait servir pour sécher des tonnes d'écorces. Avec une surface de séchage de 500 m², il peut atteindre une capacité de séchage de 22,5t/h.

D'autre part, l'exploration de différentes méthodes d'extraction a permis de déterminer les principales extractions à l'échelle laboratoire les plus intéressantes pour une poursuite d'étude à l'échelle pilote. Les

conditions optimales pour chaque méthode d'extraction testée ont été évaluées à partir des rendements massiques mais également en fonction des teneurs en extractibles présents dans les différents extraits d'écorces. Cette étude a également permis de mettre en avant le potentiel des écorces par leurs richesses en substances phytochimiques à fort potentiel pour des applications dans divers secteurs (dermo-cosmétique, compléments alimentaires, pharmacie, antifongique, etc.).

Le passage à l'échelle semi-pilote a présenté des résultats encourageants, notamment sur la nécessité d'optimiser encore la méthode d'extraction à cette échelle (montée en température, filtration...) afin de préserver les composés d'intérêts et de les extraire au mieux.

Ces résultats prometteurs laissent entrevoir de nouvelles études très intéressantes. En perspectives, l'enrichissement des extraits peut être envisagé.

La piste de valorisation la plus intéressante concerne les écorces de **douglas qui sont très riches en taxifoline**, molécule valorisable dans le domaine alimentaire mais également pharmaceutique.

Les autres écorces peuvent également être enrichies en acides phénoliques ainsi qu'en stilbènes pour des applications en dermo-cosmétique ou en tant qu'antifongique naturel. Pour cela, divers essais d'activités biologiques seront à prévoir pour corréler les compositions chimiques riches aux potentielles voies de valorisation.

EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules
d'intérêt dans les écorces d'arbres

Partie 4

Valorisation
des extraits
Propriétés
biochimiques

Valorisation des extraits et Propriétés biochimiques

Si de nombreux marchés applicatifs sont potentiellement accessibles aux extraits d'écorces (voir Partie 1), encore faut-il confirmer que les extraits issus d'écorces industrielles wallonnes et obtenus via des procédés d'extraction adaptés (voir Partie 3) possèdent des propriétés biochimiques d'intérêt.

Ce chapitre se consacre à l'étude de plusieurs propriétés biochimiques, dont l'analyse a été confiée à différents prestataires (CRA-W, ULiège, Institut Condorcet, Celabor). Les analyses menées en Partie 3 ont démontrées que certains groupes de molécules

étaient plutôt présents dans un type d'écorce que dans l'autre. Cependant, il est reconnu que la concentration et/ou purification de molécules spécifiques au départ d'un extrait brut est un procédé coûteux.

Par ailleurs, un extrait brut contient un mélange de molécules qui peuvent agir en synergie et développer un « effet cocktail » avec des propriétés biochimiques d'intérêt. C'est pourquoi ce chapitre se concentre sur **l'étude des propriétés biochimiques des extraits bruts**, obtenus via les méthodes d'extraction optimisées en Partie 3.

Code	Matière première	Paramètres d'extraction (solvant ; durée ; température)
CHE034*	Chêne (<i>Quercus robur</i> et <i>Q. petrea</i>)	A-LEEN 30 % ; 60 min ; 50°C
DOUG034*	Douglas (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	A-LEEN 30 % ; 60 min ; 50°C
EPI034*	Épicéa (<i>Picea abies</i>)	A-LEEN 30 % ; 60 min ; 50°C
CHE035	Chêne (<i>Quercus robur</i> et <i>Q. petrea</i>)	H ₂ O ; 60 min ; 90°C
DOUG035	Douglas (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	H ₂ O ; 90 min ; 90°C
EPI035	Épicéa (<i>Picea abies</i>)	H ₂ O ; 60 min ; 90°C
CHE036	Chêne (<i>Quercus robur</i> et <i>Q. petrea</i>)	EtOH 70 % ; 60 min ; 40°C
DOUG036	Douglas (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	EtOH 70 % ; 90 min ; 40°C
EPI036	Épicéa (<i>Picea abies</i>)	EtOH 70 % ; 60 min ; 40°C

Tableau 4.1. Liste des extraits testés

Activités cosmétiques

L'objectif de cette section est d'évaluer l'activité anti-radicalaire, antioxydante et anti-âge des extraits bruts, en vue d'estimer leur potentiel intérêt pour le secteur cosmétique. Les tests ont été effectués par le laboratoire Celabor.

Matériel et méthodes

Activité anti-radicalaire et antioxydante

Activité antiradicalaire: Test DPPH

La méthode de DPPH rapide et simple permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire des métabolites. Son principe est basé sur la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) qui est en effet un radical libre de couleur violette en une molécule de couleur jaune absorbable à 517 nm. L'acide gallique (AG) qui a un fort pouvoir antioxydant est utilisé comme référence au cours de cette analyse.

Activité antioxydante: Test ORAC

La méthode appelée ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permet une évaluation du caractère antioxydant d'un extrait. La méthode est basée sur la dégradation plus ou moins rapide de la fluorescéine. S'il y a des antioxydants dans le milieu, ceux-ci vont d'abord être dégradés et la fluorescéine

continuera à émettre la même fluorescence. Inversement, s'il n'y a pas ou plus d'antioxydant, la fluorescéine va être dégradée et elle émettra donc un signal de moins en moins important au fur et à mesure de sa dégradation. Le trolox qui a un fort pouvoir antioxydant est utilisé comme référence au cours de cette analyse.

Activités anti-âges

Dans le cadre des activités anti-âge, une quantité connue d'extrait solide remis en suspension dans le solvant adéquat est mis en présence de l'enzyme et de son substrat dans un puits d'une microplaque 96 puits. Pour les extraits avec le solvant A-LEEN, les extraits liquides seront utilisés tels quels. L'absorbance du mélange sera mesurée à intervalles réguliers contre celle du même mélange sans enzyme qui fera office de blanc. Les différences observées permettront de mettre en évidence ou non une activité d'inhibition de l'enzyme.

Activité anti-collagénase et anti-élastase

Les propriétés anti-âges se basent sur l'inhibition de la **collagénase et l'élastase**, deux enzymes faisant partie de la classe des protéases qui catalysent la destruction du collagène et de l'élastine lors du processus de vieillissement

Activité blanchissante: anti-tyrosinase

La tyrosinase est une enzyme faisant partie de la classe des oxydoréductases. Elle catalyse l'oxydation des phénols tel que la tyrosine, induisant ainsi la production

de mélanine. L'objectif de ce test consiste à déterminer l'effet inhibiteur qu'un extrait peut avoir vis-à-vis de la tyrosinase. Un tel extrait pourrait alors être considéré comme un agent anti-pigmentaire potentiel.

Résultats

Activités anti-radicalaires et antioxydante

Pour se faire une première idée sur les propriétés cosmétiques des extraits, les tests DPPH et ORAC sont des méthodes fiables et standardisées pour mesurer l'activité antioxydante de molécules pures ou d'extraits végétaux. Ils sont largement utilisés pour évaluer le potentiel antioxydant de différents produits.

Cependant, il faut noter que ces tests **ne reflètent pas nécessairement l'effet biologique des antioxydants in vivo**. Les résultats obtenus sur les 9 extraits sont présentés sur le graphique en Figure 4.1.

La figure 4.1 indique que la majorité des extraits **ont des propriétés antioxydantes** (test DPPH (a) et test ORAC (b)). **Cependant, les activités antioxydantes des extraits A-Leen (violet) sont faibles comparées aux activités antioxydantes des extraits à l'eau (bleu) ou à l'EtOH (orange).**

Le test ORAC apporte des effets antioxydants plus importants pour les extraits aqueux comparés aux résultats obtenus par le test DPPH. Ceci peut provenir de la dilution des extraits avec du méthanol dans le test DPPH contrairement à l'usage d'eau pour la dilution dans le test ORAC.

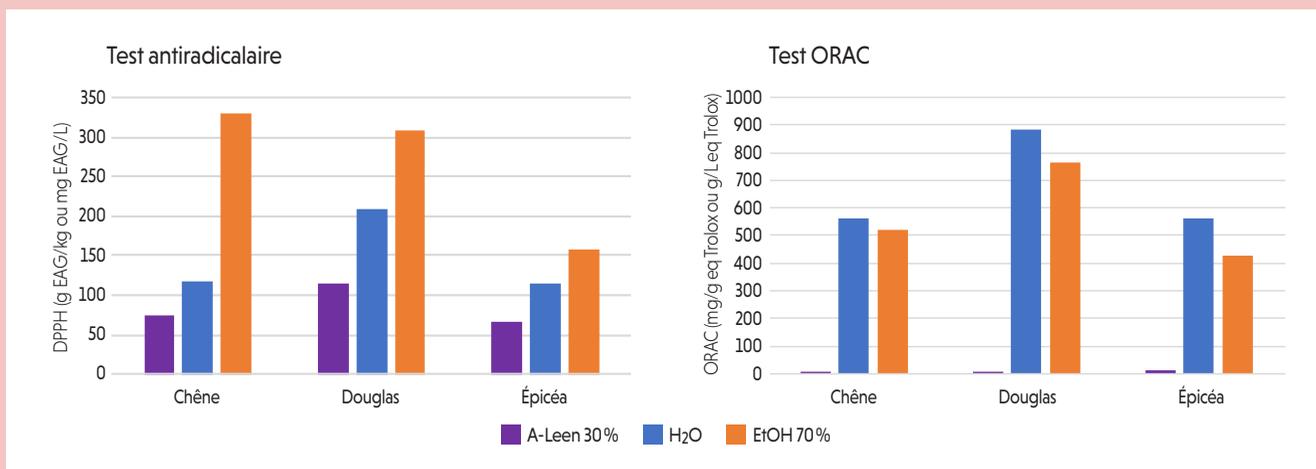


Figure 4.1. Activités antioxydantes des extraits obtenus par le test antiradicalaire DPPH (a) et le test ORAC (b).

Il n'existe pas de valeur universelle pour considérer qu'un extrait est actif contre le DPPH ou pour le test ORAC, car cela dépend de la concentration de l'extrait, du temps de réaction, du solvant utilisé et du type de composés antioxydants présents dans l'extrait. Dans la littérature, l'extrait d'écorces de *Q. robur* a montré une activité antioxydante élevée (de 0,9 à 1,3 mmol Trolox/g d'extrait sec) selon la méthode ABTS (Drózdź *et al.* 2018). Ce résultat indique l'intérêt du pouvoir antioxydant des écorces de chêne même s'il est difficile de comparer avec les données obtenues dans cette étude.

De plus, peu d'études font références aux tests antioxydants et à des valeurs antioxydantes d'extraits de douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Cependant, les extraits de *P. menziesii* semblent avoir un potentiel antioxydant, même s'il faudrait faire des études supplémentaires pour le confirmer.

D'après la littérature (Benabdallah *et al.* 2016 ; Berrada *et al.* 2011), voici quelques valeurs de références de tests DPPH en mg EAG/L obtenues pour différents produits :

- Huile d'olive vierge extra : 168,3±0,01 mg EAG/L
- Huile d'olive vierge : 182,1±0,02 mg EAG/L
- Extrait de feuilles de romarin : 520 mg EAG/L
- Extrait de feuilles de thym : 590 mg EAG/L
- Extrait de feuilles de sauge : 660 mg EAG/L

Les extraits hydroalcooliques d'écorces de chêne et douglas ainsi que l'extrait aqueux d'écorces de douglas présentent des propriétés antioxydantes plus importantes que celles d'huile d'olive vierge (> 200 mg EAG/L), mais inférieures aux propriétés antioxydantes d'extraits de feuilles de romarin, de thym ou de sauge (< 400 mg EAG/L pour tous les extraits d'écorces).

De la même manière, pour le test ORAC, les références en mg eq Trolox/g trouvées dans la littérature (Marc *et al.* 2004) sont très faibles comparées aux valeurs obtenues dans notre étude :

- Extrait de thé vert : 1,2 mg eq Trolox/g
- Extrait de romarin : 0,8 mg eq Trolox/g
- Extrait de grenade : 2,3 mg eq Trolox/g
- Extrait de myrtille : 62,2 unités ORAC par g, soit environ 0,062 mg eq Trolox/g

Ceci indique probablement que les méthodes pour doser le pouvoir antioxydant par la méthode ORAC ne sont pas comparables.

En comparaison à la littérature, on peut noter que les extraits d'écorces de chêne et douglas à l'éthanol 70 % possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes : **> 300 g/kg pour le test DPPH (a) et > 500 g/kg pour le test ORAC (b).**

Activités anti-âges

Les tests enzymatiques anti-âges anti-tyrosinase, anti-élastase et anti-collagénase sont des méthodes qui permettent d'évaluer l'effet de molécules ou d'extraits végétaux sur le vieillissement cutané.

La tyrosinase, l'élastase et la collagénase sont des enzymes impliquées respectivement dans la pigmentation, la perte d'élasticité et la dégradation du collagène de la peau. Ces enzymes sont des cibles potentielles pour des agents cosmétiques anti-âges.

Ces tests anti-âges sont basés sur la mesure de la dégradation d'un substrat de l'enzyme visée au cours du temps. La cinétique de dégradation de ce substrat permet de déterminer l'activité inhibitrice de nos extraits en pourcentage d'inhibition.

La figure 4.2 met en évidence les **propriétés anti-âges des extraits par les inhibitions des enzymes élastase (a) tyrosinase (b) et collagénase (C)**. Les activités anti-âges des extraits A-Leen (violet) restent faibles (< 50 % d'inhibition de l'élastase et < 30 % d'inhibition de la tyrosinase) comparées aux activités anti-âges des extraits à l'eau (bleu) ou à l'EtOH (orange). Nous pouvons tout de même noter que les extraits A-leen d'écorces de chêne et d'épicéa présentent des pourcentages non négligeables à hauteur de 40 % d'inhibition de l'élastase.

Les extraits aqueux d'écorces semblent avoir un **potentiel préférentiel en tant qu'anti-âge** (inhibition de l'élastase et la collagénase) **et non anti-pigmentaire** (inhibition de la tyrosinase). À chaque fois, un témoin moléculaire permettant de valider le test a été employé ainsi qu'un témoin commercial pour comparer les

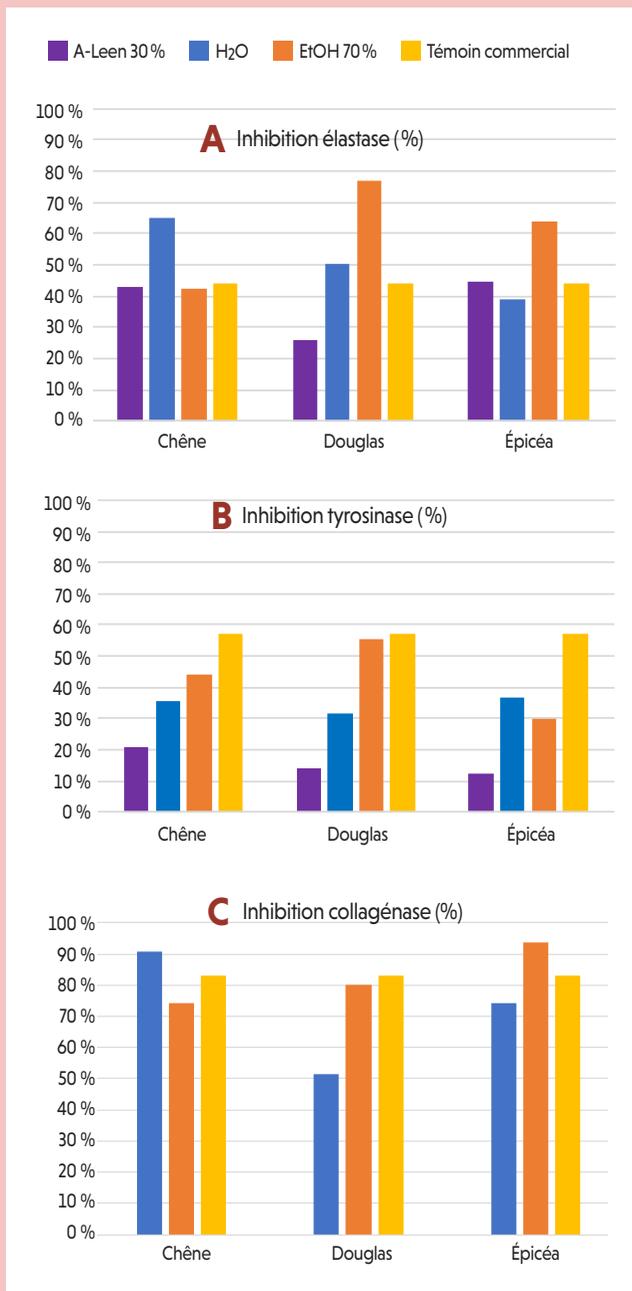


Figure 4.2. Activités anti-âges des extraits obtenus par mesure d'inhibition.

Valorisation des extraits et Propriétés biochimiques

extraits à un actif vendu dans le commerce (témoin commercial en jaune sur les graphiques). Les extraits aqueux d'écorces de chêne et de douglas possèdent des activités anti-élastase supérieures au témoin commercial (> 40 %). L'extrait aqueux de chêne possède en plus une activité anti-collagénase supérieure au témoin commercial (>80 %), ce qui en fait un extrait très intéressant à valoriser en cosmétique anti-âge.

D'autre part, on remarque que les extraits hydroalcooliques possèdent également de fortes activités anti-âges: les extraits hydroalcooliques d'écorces de douglas et d'épicéa possèdent des activités anti-élastase supérieures au témoin commercial (> 40 %) et l'extrait d'épicéa possède en plus une activité anti-collagénase supérieure au témoin commercial (>80 %). De manière générale, les extraits hydroalcooliques possèdent de très fortes activités anti-âges semblables au témoin commercial pour les trois extraits d'écorces testés.

De plus l'extrait hydroalcoolique d'écorces de douglas possède une activité anti-tyrosinase similaire à l'extrait commercial (pourcentage d'inhibition > 50 %).

L'extrait aqueux de chêne et l'extrait hydroalcoolique de douglas présentent donc les plus fortes inhibitions d'enzyme et possèdent donc un fort intérêt de valorisation en cosmétique pour leurs propriétés anti-âge.

En comparaison aux témoins commerciaux, **l'extrait aqueux de chêne (CHE035) et l'extrait hydroalcoolique de douglas (DOUG036) présentent donc les plus fortes inhibitions d'enzyme et possèdent donc un fort intérêt de valorisation** en cosmétique pour leurs propriétés anti-âge.

Ces résultats montrent un fort potentiel des extraits pour une valorisation en tant qu'anti-âge.



Conclusion

Cette étude met en évidence le potentiel antioxydant des trois lots d'extraits d'écorces, en particulier le lot d'écorces de douglas.

Concernant l'activité inhibitrice de l'enzyme élastase, on remarque un potentiel intéressant des extraits aqueux d'écorces de chêne et douglas ainsi que des extraits hydroalcooliques de douglas et épicéa.

Ce potentiel pourrait être exploré lors d'une étude ultérieure, avec une étape de concentration des extraits obtenus, et l'identification des actifs responsables des propriétés.

Le potentiel en termes d'activité blanchissante (anti-tyrosinase) semble moindre.

	Activités anti-âge			Activité anti-radicalaire et antioxydante	
	Activité anti-élastase	Activité blanchissante : anti-tyrosinase	Activité anti-collagénase	Activité antiradicalaire : Test DPPH	Activité antioxydante : Test ORAC
Épicéa	Activité > témoin avec extraits EtOH et = avec H ₂ O et A-LEEN	Activité < témoin avec tous les extraits	Activité > témoin avec extraits EtOH	Activité la plus faible	Activité moyenne avec extraits H ₂ O et EtOH
Chêne	Activité > témoin avec extraits H ₂ O et = avec EtOH et A-LEEN	Activité < témoin avec tous les extraits	Activité > témoin avec extraits H ₂ O	Activité forte avec les extraits EtOH	Activité moyenne avec extraits H ₂ O et EtOH
Douglas	Activité > témoin avec extraits H ₂ O et EtOH	Activité = témoin avec extraits EtOH	Activité = témoin avec extraits EtOH	Activité forte avec les extraits EtOH, moyenne avec H ₂ O	Activité la plus forte avec extraits H ₂ O et EtOH

Tableau 4.2. Synthèse des activités cosmétiques

Activités fongicides

Dans cette section, réalisée par l'institut Condorcet, l'objectif fut de mettre en évidence un éventuel effet antifongique et/ou antibactérien d'extraits d'écorces.

Matériel et méthodes

Champignons

Quatre pathogènes fongiques rencontrés couramment ont été utilisés pour mettre en évidence un potentiel effet antifongique :

- **Solani** ➔ Alternariose des solanacées
 - **B. cinerea** ➔ Pourriture grise
 - **F. solani** ➔ Fusariose des solanacées et indicateur de celle des céréales
 - **P. infestans** ➔ Mildiou de la pomme de terre
- Les extraits ont été intégrés à un milieu de culture à une concentration de 1; 2,5 et 5 g/l. Les extraits liquides ont été utilisés en considérant la masse équivalente au volume (1g = 1 ml).
 - Les milieux utilisés sont le PDA (Potato Dextrose Agar) pour *A. solani*, *B. cinerea* et *F. solani* et le milieu V8 (jus de légumes V8) pour *P. infestans*.
 - Les milieux contenant les extraits ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C.
 - Les milieux stérilisés ont par la suite été coulés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre.
 - Une fois le milieu refroidi, le pathogène est inoculé

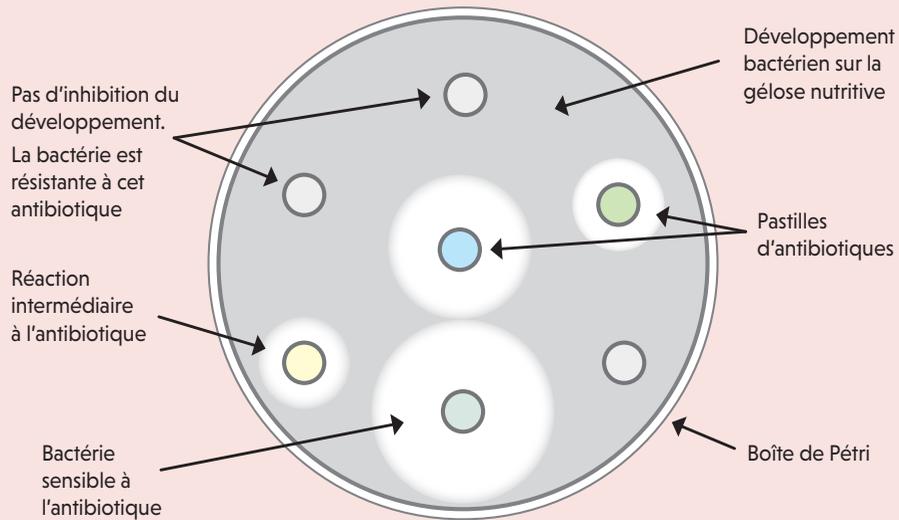
en son centre. Les pathogènes fongiques ont une croissance radiale assez homogène sur milieu de culture. L'inhibition est donc mesurée en comparant la croissance radiale du pathogène sur le milieu contenant les extraits au même milieu sans les extraits (blanc).

Bactéries

Les deux bactéries utilisées pour mettre en évidence un éventuel effet antibactérien sont les suivantes :

- **E. coli** (GRAM -)
 - **S. aureus** (GRAM +)
- L'inhibition de la croissance bactérienne à l'aide des extraits a été évaluée avec le même principe qu'un antibiogramme (voir figure en page suivante). Une substance avec des propriétés antibactériennes est placée sur une gélose et se diffuse. Il se forme alors un halo sans développement bactérien à partir de l'endroit où a été déposé l'antibiotique.
 - Une gélose Mueller-Hinton de 4 mm de hauteur a été coulée dans des boîtes de Petri.
 - Les boîtes ont étéensemencées par écouvillonnage de bactéries. Ensuite, trois puits de 5 mm de diamètre ont été creusés dans la gélose.
 - Dans un puit a été déposé 40 µl contenant 30 µg de chloramphénicol, c'est un antibiotique qui sert de témoin.
 - Dans les deux autres puits ont été déposés 40 µl d'une solution autoclavée contenant 20 g/l d'extrait. Les extraits A-leen ont été utilisés pur.
 - Si les extraits ont un effet antibactérien, il n'y aura pas de développement de la bactérie aux alentours de l'endroit où ils ont été déposés.

Illustration du fonctionnement d'un antibiogramme



Un antibiogramme

© Georges Dolisi

Résultats

Activité antifongique

Alternaria solani

La figure ci-dessous illustre une partie des résultats sur le pathogène *A. solani*.

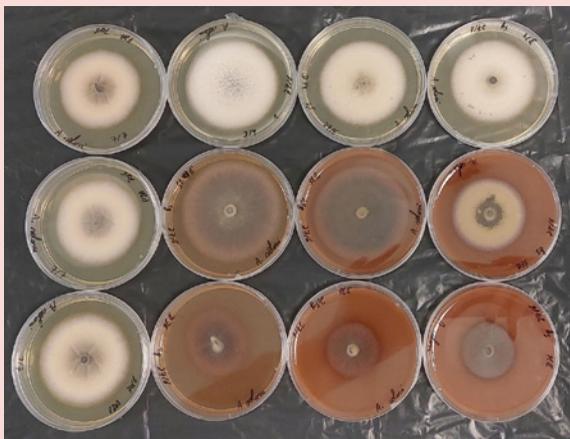


Figure 4.4. : Inhibition de la croissance d'*A. solani* sur les différents extraits (de gauche à droite : 0 – 1 – 2,5 et 5 g/l, de haut en bas : extrait DOUG34, DOUG35 et DOUG36)

Observations

- L'inhibition de la croissance du pathogène la plus importante est observée sur les extraits « 36 », c'est-à-dire ceux élaborés avec l'éthanol 70% comme solvant.
- L'inhibition maximale (53,0 %) a été obtenue avec l'extrait DOUG36 à une concentration de 5 g/l (en bas à droite)
- Les extraits CHE34 et CHE35 ont stimulé la croissance du pathogène par rapport au témoin.

Botrytis cinerea

La figure ci-dessous illustre une partie des résultats sur le pathogène *Botrytis cinerea*.



Figure 4.5. Inhibition de la croissance de *B. cinerea* sur les différents extraits (de gauche à droite : 0 – 1 – 2,5 et 5 g/l, de haut en bas : extrait DOUG34, DOUG35 et DOUG36)

Observations

- Tout comme avec *A. solani*, l'inhibition maximale (69,9 %) a été obtenue avec l'extrait DOUG36 à une concentration de 5 g/l
- L'inhibition de la croissance du pathogène la plus importante est observée sur les extraits « 36 », c'est-à-dire ceux élaborés avec l'éthanol 70% comme solvant.
- Tous ces extraits ont eu au moins une inhibition de 50 % à une concentration de 5 g/l.
- Avec les extraits DOUG36 et CHE36, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de 2,5 et 5 g/l. Aucune différence n'a été constatée entre les concentrations de EPI36
- Il n'y a pas eu de stimulation de la croissance du pathogène.

Fusarium solani

La figure ci-dessous illustre une partie des résultats sur le pathogène *F. solani*.



Figure 4.6: Inhibition de la croissance de *F. solani* sur les différents extraits (de gauche à droite: 0 – 1 – 2,5 et 5 g/l, de haut en bas: extrait CHE34, CHE35 et CHE36)

Observations

- L'inhibition maximale (71.3 %) a été obtenue avec l'extrait CHE36 à une concentration de 5 g/l.
- L'inhibition de la croissance du pathogène la plus importante est observée sur les extraits « 36 », c'est-à-dire ceux élaborés avec l'éthanol 70 % comme solvant.
- Tous ces extraits ont eu au moins une inhibition de 50 % à une concentration de 5 g/l.
- Il n'y a pas eu de stimulation de la croissance du pathogène à part avec DOUG34 1 g/l.

Phytophthora infestans

La figure ci-dessous illustre une partie des résultats sur le pathogène *Phytophthora infestans*.



Figure 4.7: Inhibition de la croissance d'*P. infestans* sur les différents extraits (de gauche à droite: 0 – 1 – 2,5 et 5 g/l, de haut en bas: extrait CHE34, CHE35 et CHE36)

Observations

- Tous les extraits 35 et 36 ont complètement inhiber la croissance du pathogène même à la plus faible concentration.
- Contrairement aux autres pathogènes, les extraits A-leen ont aussi eu des résultats intéressants avec des inhibitions de plus de 48 % à une concentration de 5 ml/l.

Activité antibactérienne

S. aureus

La figure ci-dessous illustre une partie des résultats sur le pathogène *S. aureus*.

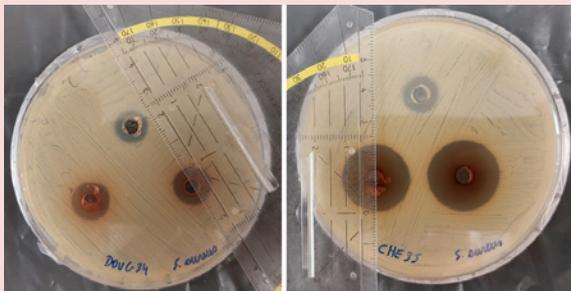


Figure 4.8: Inhibition de *S. aureus* avec l'extrait DOUG34 (à gauche) et l'extrait CHE35 (à droite)

Observations

- Tous les extraits ont inhibé la croissance de *S. aureus*.
- Les extraits ayant les meilleurs résultats sont à base de chêne et le solvant le plus performant pour extraire les molécules d'intérêt est l'eau.

E. coli

La figure ci-dessous illustre une partie des résultats sur le pathogène *E. coli*.

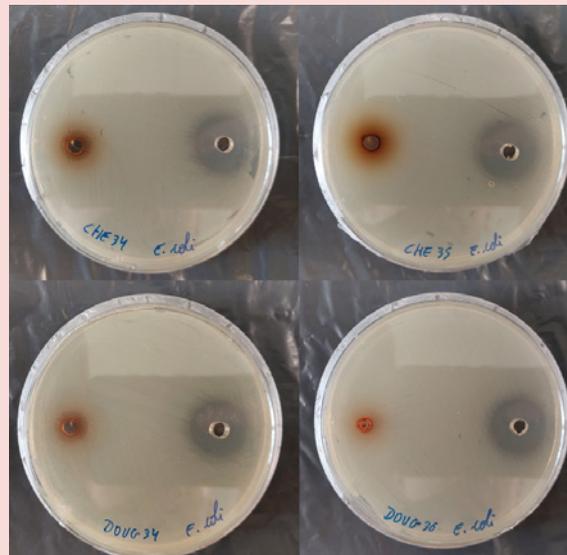


Figure 4.9: Inhibition de la croissance de *E. coli* avec les extraits CHE34, CHE35, DOUG34 et DOUG36

Observations

- Seuls les échantillons 34 utilisés pur ont montré un léger effet antibactérien contre *E. coli*. Ils ont eu à chaque fois une inhibition de l'ordre de 10 -11 mm de diamètre.
- Les autres échantillons (35 et 36) n'ont pas montré d'inhibition du développement de la bactérie.

Discussion

- Les résultats obtenus pour l'inhibition des fongiques sont encourageants. Pour chaque pathogène, les extraits provenant des 3 écorces ont au moins eu une inhibition de 50 % (sauf EPI contre *A. solani*).
- Il a été constaté une **meilleure efficacité des extraits avec éthanol** pour l'inhibition des fongiques.
- Tous les extraits 35 et 36 ont complètement inhibé la croissance de ***P. infestans***. Les extraits 34 ont aussi eu des résultats intéressants dans l'optique de développer un produit antifongique contre ce pathogène.
- La différence d'efficacité entre *P. infestans* et les autres pathogènes fongiques peut s'expliquer par le fait que *P. infestans* est un oomycète alors que les trois autres

font partie des ascomycètes.

- Les résultats obtenus pour l'inhibition de *S. aureus* sont aussi intéressants si on les compare à l'efficacité d'un antibiotique pur (chloramphénicol).

Conclusion

Les écorces de chêne et de douglas semblent donc avoir le meilleur potentiel en termes d'activités de contrôle, et les solvants à privilégier semblent être l'éthanol 70 % pour les champignons et l'eau pour les bactéries. Le pathogène *P. infestans*, responsable du mildiou, semble être le plus sensible aux extraits d'écorces. De plus il existe un marché potentiel énorme pour un produit biosourcé qui pourrait être une alternative aux produits conventionnels ou agir en synergie avec eux dans le but de réduire leur utilisation.

Activité anti-fongique et anti-bactérienne			
	Épicéa	Chêne	Douglas
A. solani	Inhibition >40 % pour extraits EtOH	Stimulation croissance avec extraits H ₂ O et A-LEEN Inhibition pour extraits EtOH (>2,5g/L)	Inhibition max (53 %) avec extrait EtOH (5g/L)
B. cinerea	Inhibition >50 % pour extraits EtOH (>2,5g/L)	Inhibition >50 % pour extraits EtOH (>2,5g/L)	Inhibition max (70 %) avec extrait EtOH (>2,5g/L)
F. solani	Inhibition >50 % pour extraits EtOH (5g/L)	Inhibition max (70 %) avec extrait EtOH (5g/L)	Inhibition >50 % pour extraits EtOH (5g/L)
P. infestans	Inhibition max (100 %) avec extrait EtOH et H ₂ O (>2,5g/L)	Inhibition max (100 %) avec extrait EtOH et H ₂ O (>2,5g/L)	Inhibition max (100 %) avec extrait EtOH et H ₂ O (>2,5g/L)
S. aureus	Inhibition max avec extraits H ₂ O (>17 mm) suivi par extrait EtOH (>15mm)	Inhibition max avec extraits H ₂ O (23 mm) suivi par extrait EtOH (20mm)	Inhibition max avec extraits H ₂ O (15 mm) suivi par extrait EtOH (>14 mm)
E. Coli	Peu d'inhibition	Peu d'inhibition	Peu d'inhibition

Tableau 4.3. Synthèse des activités antifongiques et antibactériennes

Activités herbicides

Introduction

Cette étude porte sur la potentielle activité herbicide des extraits d'écorces sur le trèfle (*Trifolium incarnatum* L.) et le lolium (*Lolium perenne* L.). L'étude a été réalisée par le Laboratoire de Chimie des Molécules Naturelles de l'ULiège.

Matériel et méthodes

Culture des plantes et réalisation des essais biologiques.

- Plantes pour essais biologiques : semées dans des pots en plastique de 6 × 6 × 7 cm avec terreau humide Horta Universal Bio (congelé à -80°C avant utilisation).
- Après la semence, les graines ont été recouvertes d'une fine couche de terreau.
- Étude de deux stades de croissance (cotylédon et vraies feuilles) sur une période de sept jours.
- Au moins trois réplicats par modalité, chaque réplicat comprenant six plantes au même stade de croissance.
- Pour les trèfles : observation des stades cotylédon et stade à deux vraies feuilles.
- Pour le lolium : observation des stades cotylédon et stade à une vraie feuille.
- Préparation de différentes solutions pour les essais biologiques :
 - Extraits solides à 5 g/L, 1 g/L et 0,1 g/L (extraits issus

de l'eau et de l'éthanol à 70 %).

- Trois solutions d'extraits liquides (avec solvant A-Leen) : Cinitiale/2, Cinitiale/5 et Cinitiale/10.
- Réalisation de quatre contrôles négatifs avec de l'eau et différents pourcentages d'A-LEEN (15 %, 6 % et 3 %).
- Réalisation de deux contrôles positifs avec de l'acide pélargonique à 60g/L avec 0,5 % de tween 20, et Roundup à base d'acide acétique à 60g/L.
- Protocole de pulvérisation : cinq pulvérisations sur chaque face des plantes à une distance de 20 cm du pot, pour un total de vingt pulvérisations avec un volume total d'environ 2 mL pulvérisé.
- Les plantes ont été pulvérisées une seule fois au début des essais biologiques.

Évaluation de l'activité herbicide après sept jours

- Une fois la période de sept jours écoulée, les essais biologiques ont été interrompus.
- Dans un premier temps, le nombre de plantes touchées, le nombre de cotylédons touchés, le nombre de feuilles touchées et le nombre total de feuilles ont été comptés.
- Dans un second temps, un état général a été attribué à l'ensemble des réplicats d'une même modalité (de 1, aucune influence sur les plantes à 6, plantes mortes).
- Ainsi, même les feuilles ayant poussé entre le début des essais biologiques et leur conclusion ont été prises en compte dans le décompte total des feuilles, bien qu'elles n'aient pas été directement exposées à la pulvérisation lors du lancement des essais biologiques.

Valorisation des extraits et Propriétés biochimiques

- Enfin, la masse fraîche de chaque réplicat a été mesurée et le pourcentage de feuilles impactées a été calculé. La masse fraîche sera le graphique qui illustrera les principaux résultats.

Résultats et discussion

Contrôles négatifs et positifs

Les solutions d'A-LEEN ont présenté des résultats surprenants. Bien qu'elles aient été utilisées dans le but de démontrer l'inefficacité de ce solvant vis-à-vis des plantes testées, elles ont en réalité montré une certaine activité herbicide pour chaque modalité, à l'exception du lolium au stade feuille. Cette activité herbicide est néanmoins moins prononcée que celle des herbicides conventionnels, comme en témoigne la masse fraîche moyenne des réplicats traitées avec A-LEEN, qui est supérieure à celle du Roundup ou de l'acide pélargonique.

On peut cependant observer que plus l'A-LEEN est dilué, plus les effets herbicides du solvant diminuent.

On peut conclure que ce solvant a un effet herbicide sur toutes les plantes à tous les stades et toutes les concentrations. Toutefois, cet effet est atténué pour le lolium au stade cotylédon pour la concentration Cinitiale/10 et au stade feuille pour les concentrations Cinitiale/10 et Cinitiale/5.

Extraits d'écorces

- En ce qui concerne les extraits à l'eau et à l'éthanol, la pulvérisation n'a eu aucun impact sur la masse fraîche, la

viabilité ou encore le pourcentage de feuilles touchées.

- Cependant, les solutions dans lesquelles les composés sont solubilisés dans l'A-LEEN ont eu un impact. Cet effet, en particulier sur la masse fraîche et la viabilité, diminue lorsque le facteur de dilution augmente.

Conclusions et perspectives

Au vu des résultats obtenus, les composés extraits des différentes écorces à l'aide de l'eau, de l'éthanol à 70 % ou de l'A-LEEN à 30 % **ne semblent pas présenter d'activité herbicide** sur les plantes et les stades de développement étudiés. Cependant, il est très probable que si les concentrations des composés étaient augmentées, un effet herbicide mesurable et significatif pourrait se manifester. Néanmoins, cette étude a mis en évidence que **le solvant A-LEEN possède une activité herbicide non négligeable** malgré un faible pourcentage massique.

À l'avenir, il serait intéressant d'accroître les concentrations des extraits d'écorces afin d'obtenir un effet herbicide sur les plantes traitées. De plus, il serait essentiel d'étudier l'activité herbicide de l'A-LEEN sur différentes plantes avant de pouvoir envisager son utilisation dans une formulation.

Le fait que les extraits ne présentent pas d'activité herbicide peut s'avérer être une propriété intéressante en vue d'une utilisation de ces extraits contre des pathogènes (insectes, champignons,...). En effet, dans ce cas, nous ne souhaitons pas obtenir un effet toxique sur la plante.

Activité insecticide

Introduction

L'objectif de cette partie est d'évaluer l'activité insecticide des extraits d'écorces sur les deux insectes suivants.

L'étude a été réalisée par le Centre de Recherche Agronomique de Wallonie.

- Le charançon du blé (*Sitophilus granarius*). Cette espèce de coléoptère de la famille des Curculionidae est un insecte ravageur des céréales stockées, dont les larves se développent à l'intérieur du grain. Il s'attaque non seulement au blé, mais aussi à un large éventail de céréales, dont l'avoine, le seigle, l'orge, le maïs et d'autres, ainsi qu'à des sous-produits tels que la farine et divers grains, en particulier ceux de la famille des Fabacées, comme les légumineuses.



Adulte de *Sitophilus granarius* (source www.eakringbirds.com)

- L'acarien rouge (*Tetranychus urticae*) est un acarien phytophage que l'on trouve couramment sur les plantes, en particulier dans les serres et sur les cultures pérennes, et qui cause des dégâts sur les arbres, les

légumes et les plantes ornementales. Il s'agit de l'un des problèmes phytosanitaires les plus importants au monde.



Adulte de *Tetranychus urticae* (source https://fr.wikipedia.org/wiki/Tetranychus_urticae)

Matériel & méthodes

L'eau du robinet a été utilisée comme contrôle négatif pour les deux tests.

Comme contrôle positif (TS), nous avons appliqué une formulation de spinosad 480 g/l (Tracer) à la dose de 0,025 ml/l pour le charançon du blé.

Pour l'acarien rouge le contrôle positif est le Mavrik 2F (substance active: Tau-fluvalinate) 240 g/l.

Les 9 échantillons testés sont toujours ceux présentés dans le tableau 4.1. Tous les extraits ont été testés à une concentration de 5 g/l.

Matériel biologique

Les adultes de *S. granarius* ont été élevés au CRA-W en utilisant des lots de grains de blé infestés. Les adultes ont été récoltés et placés dans des bocaux en verre remplis de grains de blé et d'orge non traités, constituant environ la moitié du contenu du bocal. L'élevage est maintenu à température ambiante.

L'élevage de *T. urticae* a été maintenu au CRA-W en plaçant de nouveaux plants de haricots toutes les semaines/deux semaines au contact des plants de haricots infestés. L'élevage a été réalisé à une température ambiante de 20-25°C, avec une photopériode jour/nuit de 16/8 et un éclairage LED.

Description des unités expérimentales et des conditions

S. granarius

Les tests ont été effectués sur des adultes prélevés au hasard dans les bocaux. Les unités d'essai ont été installées dans une salle avec un environnement contrôlé: température maintenue à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative moyenne allant de 60 % à 90 % HR.

Les coléoptères ont été traités soit individuellement à l'aide d'un microapplicateur. Dans ce cas une gouttelette de 2 μL de produit a été appliquée sur le thorax de chaque coléoptère. Dans l'autre cas, le produit a été appliqué à l'intérieur d'une boîte de Petri pour distribuer 200 l/ha. Une fois les résidus secs, 10 coléoptères ont été placés dans la boîte de Petri traitée.

T. urticae

La veille de l'application des produits, des disques de feuilles de haricots (\varnothing 30 mm) ont été découpés sur des plants de haricots. Vingt-quatre heures avant l'application des produits, les acariens femelles ont été prélevés dans la masse d'élevage et placés sur la feuille à l'aide d'un pinceau fin. Chaque disque de feuille a été infesté par 10 acariens femelles. Le jour de l'application, avant la pulvérisation, tous les œufs ont été enlevés sous binoculaire à l'aide d'une brosse fine.

Les produits ont été appliqués dilués dans l'eau du robinet. L'appareil a été calibré pour délivrer $2\text{mg}/\text{cm}^2 \pm 10\%$, ce qui correspond à une application au champ de 200 l/ha $\pm 10\%$.

Pour les deux insectes, les produits ont été appliqués dans l'ordre suivant: contrôle, produits testés et enfin la norme toxique (TS).

Résultats

S. granarius

Les résultats de l'exposition par microgroutte n'ont pas donné de résultats significatifs. En effet, au cours des 168 heures, un effet toxique significatif sur *S. granarius* n'a été observé qu'avec le Tracer, servant de contrôle positif. Aucun effet létal significatif n'a été détecté avec les neuf extraits appliqués à l'aide d'un microapplicateur.

L'exposition par boîte de Petri traitée n'a pas donné de meilleurs résultats. Au cours des 48 premières heures d'exposition dans la boîte de Petri traitée, aucune mortalité de *S. granarius* n'a été observée. À partir de

Valorisation des extraits et Propriétés biochimiques

120 heures, une mortalité significative a été observée uniquement avec le Tracer.

T. urticae

Après une période d'exposition de 48 heures, la mortalité de T. urticae dans tous les extraits testés n'était pas significativement différente par rapport au groupe témoin.

En termes de fertilité par contre, nous avons observé

significativement moins d'œufs (tableau 4.4) par rapport au groupe témoin ($9,0 \pm 5,1$ œufs) lors de l'utilisation du « chêne extraction hydro-alcoolique » ($2,7 \pm 1,1$ œufs). L'efficacité en termes de réduction de la fertilité a été estimée à 69,7% pour le « chêne extraction hydro-alcoolique » et à 86,9% pour l'insecticide/acaricide Mavrik. Pour les autres extraits, de plus faibles réductions de fertilité ont été observés : « douglas extraction aqueuse » (47,5%), « chêne extraction A-leen » (36%), « épicéa extraction aqueuse » (34,5%) et « douglas extraction A-leen » (25,3%).

Substance	N	Mortalité (%)		Mortalité corrigée (%)	Fertilité (nombre d'œufs par femelle)		Réduction de la fertilité (%)
Control: water	3*	13.3 ± 5.8	a	0	9.0 ± 5.1	c	-
EFW23-01: douglas extraction aqueuse	4	30 ± 11.5	a	19	4.7 ± 2.5	ac	47.5
EFW23-02: douglas extraction hydro-alcoolique	4	15 ± 12.9	a	2	9.0 ± 4.1	c	0.3
EFW23-03: douglas extraction A-leen	4	25 ± 23.8	a	13	6.7 ± 1.9	ac	25.3
EFW23-04: épicéa extraction aqueuse	4	7.5 ± 15	a	0	5.9 ± 1.1	ac	34.5
EFW23-05: épicéa extraction hydro-alcoolique	4	17.5 ± 12.6	a	5	8.7 ± 1.9	c	3.2
EFW23-06: épicéa extraction A-leen	4	20 ± 8.2	a	8	7.0 ± 2.1	bc	22.2
EFW23-07: chêne extraction aqueuse	4	17.5 ± 5	a	5	7.1 ± 2.0	bc	20.5
EFW23-08: chêne extraction hydro-alcoolique	4	32.5 ± 9.6	a	22	2.7 ± 1.1	ab	69.7
EFW23-09: chêne extraction A-leen	4	12.5 ± 12.6	a	0	5.8 ± 2.0	ac	36
TS: Mavrik 2F	4	90 ± 8.2	b	88	1.2 ± 1.2	a	86.9

Tableau 4.4 : Moyenne de la mortalité (%) et de la fertilité (œufs par femelle) ± écart-type et réduction de la fertilité (%), mortalité corrigée (%), après 48h d'exposition. La mortalité ou la fertilité avec la même lettre n'est pas significativement différente (test de Tukey t).

Conclusion

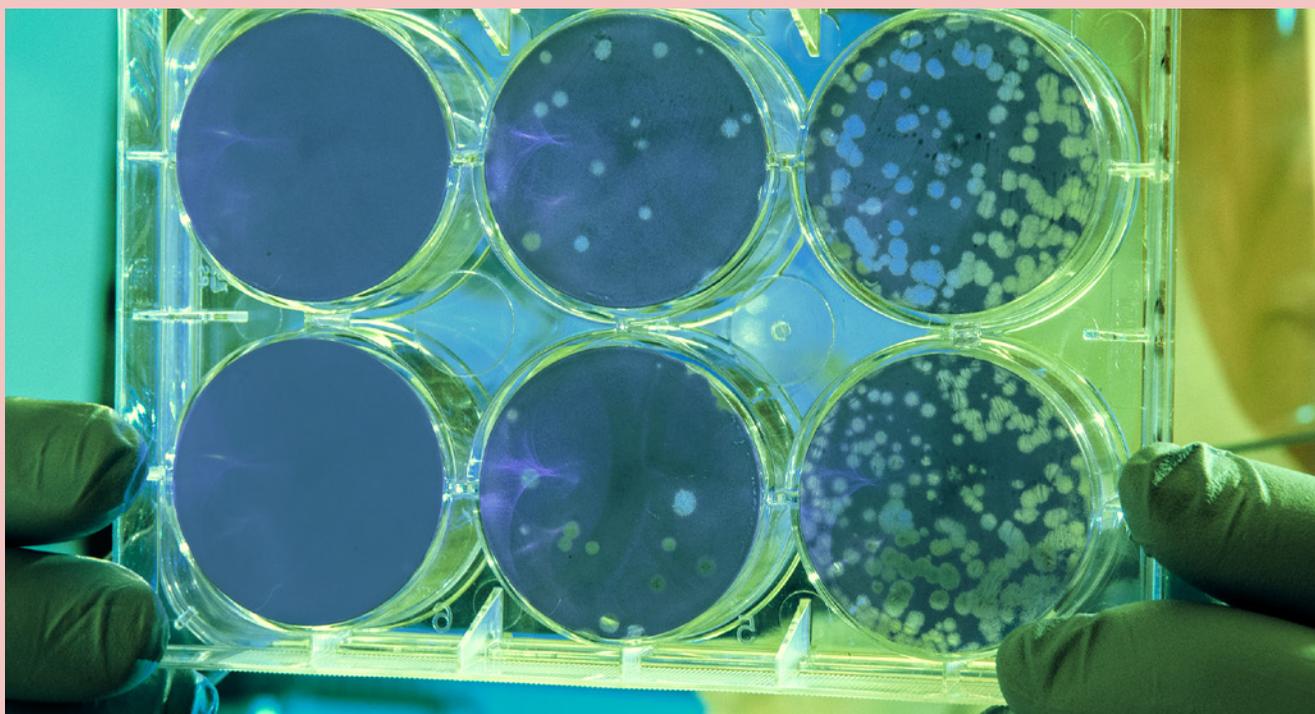
Après une semaine d'essais en conditions contrôlées, aucune mortalité significative de *S. granarius* n'a été observée avec les neuf extraits testés par une exposition à une microgouttelette de 2µl ou à une boîte de Pétri en verre traitée.

Nous n'avons pas non plus observé d'effets létaux significatifs sur *T. urticae* après une période d'exposition de 48 heures .

En revanche, nous avons détecté une réduction significative de la fertilité de *T. urticae* lors de l'utilisation

du « chêne extraction hydro-alcoolique » par rapport au contrôle (69.7% de réduction de la fertilité). Cette réduction de la fertilité n'était pas significativement différente de l'efficacité de l'insecticide/acaricide Mavrik 2F (86.9 %). De plus, d'autres extraits ont également montré des effets sur la fertilité, comme le « douglas extraction aqueuse » (réduction de 47.5%) et le « chêne extraction A-leen » (36 %).

En conclusion, parmi les neuf extraits testés en conditions contrôlées, l'extrait hydro-alcoolique de chêne (CHE036) a démontré l'effet acaricide le plus prometteur, avec un effet comparable à celui d'un insecticide/acaricide synthétique en termes de réduction de la fertilité.



EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules
d'intérêt dans les écorces d'arbres

Conclusions
générales
et perspectives

Conclusions générales et perspectives

La première partie de ce rapport nous a renseigné sur le gisement potentiel d'écorces en Wallonie. Il y'aurait 634.538 m³ d'écorces d'épicéa, de douglas et de chêne au total. Leur utilisation actuelle en tant que combustible et dans les parcs et jardins n'est certes pas fort valorisée, mais empêche néanmoins la totalité du gisement d'être disponible pour l'extraction. La disponibilité de ce gisement dépend donc du prix de vente de ces écorces.

En amont de l'extraction, deux étapes de prétraitement sont nécessaires. Le broyage, afin d'augmenter la surface de contact entre le solvant d'extraction et la matière première, et le séchage de celle-ci, afin de faciliter le broyage.

L'extraction des molécules d'intérêts à l'échelle laboratoire peut se faire au moyen de différents solvants (eau, éthanol, A-LEEN). Chaque solvant possède ses avantages et ses inconvénients, et le choix du solvant dépendra donc principalement des molécules que l'on souhaite extraire.

- Extraction des **acides phénoliques dans les écorces de chêne** ➔ macération à l'eau.
- Extraction de la **taxifoline dans les écorces de douglas** ➔ macération hydroalcoolique.
- Extraction d'un **mélange de taxifoline et stilbènes dans les écorces d'épicéa** ➔ macération hydroalcoolique.

En effet, chaque essence d'écorce semble contenir un certain type de polyphénols dans des concentrations intéressants :

- L'extrait de chêne contient 48,605 mg/g (4,861 %) d'acide ellagique alors que dans la littérature on trouve une teneur de seulement 0,9782 mg/g.
- Les écorces de douglas présentent un fort intérêt pour la présence très importante en taxifoline dans l'extrait (14,6 %).
- Les écorces d'épicéa présentent un intérêt pour la richesse de l'extrait en stilbènes tels que l'astringine (40,06 g/kg (4,006 %) d'astringine comparés aux 11,57 g/kg dosés dans les écorces d'épicéa dans la littérature).

Lors du passage de l'échelle laboratoire à l'échelle semi-pilote, il est apparu que certains procédés doivent encore être optimisés afin d'obtenir les mêmes rendements d'extraction qu'à l'échelle laboratoire. Néanmoins les premiers résultats sont encourageants.

Dans la partie 4 de ce rapport, le potentiel des extraits d'écorces a été analysé, sous plusieurs aspects. Tout d'abord, le potentiel antioxydant des trois lots d'extraits d'écorces a été mis en évidence, en particulier le lot d'écorces de douglas. En effet, ces extraits présentent des propriétés antioxydantes plus importantes que celles d'huile d'olive vierge (> 200 mg EAG/L).

Concernant l'activité inhibitrice de l'enzyme élastase, on remarque un potentiel intéressant des extraits aqueux d'écorces de chêne et douglas ainsi que des extraits hydroalcooliques de douglas et d'épicéa.

Conclusions générales et perspectives

Les écorces de chêne et de douglas semblent également avoir le meilleur potentiel en termes d'activités de contrôle. Le pathogène *P. infestans*, responsable du mildiou, semble être le plus sensible aux extraits d'écorces.

Le potentiel acaricide semble lui aussi bien présent, en particulier sur la fertilité des acariens rouges.

Finalement, seul le potentiel herbicide des extraits semble totalement absent.

Ces résultats entrouvrent donc de belles perspectives pour des applications qui sont à la recherche d'alternatives biosourcées. De plus amples études devront être réalisées pour confirmer ces potentiels.

Pour le futur, ajoutons les pistes suivantes à explorer:

- faire des tests d'activité sur des mélanges d'essences (mélange de résineux ou de feuillus) pour éventuellement augmenter le gisement disponible.
- Faire des tests d'extraction à l'échelle industrielle
- Établir le lien entre les molécules actives et les activités des extraits
- Approfondir les premiers résultats prometteurs sur les activités cosmétiques, alimentaire et de biocontrôle
- Analyser les contraintes de ces secteurs en termes de réglementation afin de sélectionner la meilleure alternative de valorisation en termes de cout-bénéfices

	ÉPICÉA	DOUGLAS	CHÊNE
Gisement mobilisable	+++	++	+
Prix	+	+++	++
Extraction optimale	Hydroalcoolique 70%	Hydroalcoolique 70%	Eau
Polyphénols principaux	Stilbène (astringine)	Flavonoides (taxifoline)	Acides phénoliques (ac. ellagique)
Autres molécules	β-pinène	/	/
Activité antiradicalaire et antioxydante	Faible	Forte avec extraction H2O ou EtOH 70%	Forte avec extraction EtOH 70% et eau (ORAC)
Activité anti-elastase	Forte avec extraction EtOH 70%	Forte avec extraction EtOH 70%	Forte avec extraction eau
Activité anti-tyrosinase	Faible	Moyenne avec extraction EtOH 70%	Faible
Activité fongicide	Forte sur <i>P. infestans</i>	Forte sur <i>A. solani</i> , <i>B. cinarea</i> , <i>P. infestans</i>	Forte sur <i>F. solani</i> et <i>P. infestans</i>
Activité herbicide	/	/	/
Activité insecticide	Moyenne avec extraction eau sur <i>T. urticae</i>	Moyenne avec extraction eau sur <i>T. urticae</i>	Forte avec extraction EtOH 70% sur <i>T. urticae</i>
Perspectives	Bio-contrôle, cosmétique	Bio-contrôle, cosmétique, alimentaire	Bio-contrôle, cosmétique, alimentaire

Tableau 4.5.

EXTRAFORWAL

Extraction et valorisation des molécules
d'intérêt dans les écorces d'arbres

Annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif de la caractérisation des extraits

PARTIE 1

Sortie : %	DOUG_001	EPI_001	CHE_001	DOUG_004	EPI_004	CHE_004	DOUG_005	EPI_005	CHE_005	D_015	E_015	C_015	D_016	E_016	C_016	D_019	E_019	C_019	D_020	E_020	C_020	
Myricétine										0,000	LQ	LQ	0,000	0,000	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	
Acide Coumarique										LQ	0,020	0,000	LQ	0,017	0,000	LQ	0,016	0,000	LQ	0,030	0,000	
Acide Gallique	0,001	LQ	0,009	0,028	0,027	0,140	0,050	0,018	0,491	0,010	0,015	0,073	0,009	0,015	0,096	0,022	0,037	0,222	0,012	0,024	0,131	
Acide Ferrulique	0,001	0,001	LQ	0,017	LQ	LQ	LQ	0,016	LQ	0,045	0,013	LQ	0,018	0,011	LQ	0,015	0,013	LQ	0,010	0,014	LQ	
Resveratrol	0,000	0,001	LQ	LQ	0,021	LQ	LQ	0,023	LQ	LQ	0,027	LQ	0,000	0,023	LQ	0,000	0,007	0,000	LQ	0,020	LQ	
Piceatannol	0,000	0,001	0,000	LQ	0,018	0,000	0,000	0,050	LQ	LQ	0,160	LQ	LQ	0,131	0,000	LQ	0,086	0,000	LQ	0,114	0,000	
Chryisine										0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Lutéoline	0,004	0,000	0,000	0,085	0,000	0,000	0,043	0,000	0,000	0,258	LQ	LQ	0,100	LQ	LQ	0,046	0,000	0,000	0,234	LQ	LQ	
Epicatechine	0,003	0,000	LQ	0,276	LQ	0,015	0,370	LQ	0,016	0,116	LQ	LQ	0,115	0,007	LQ	0,327	LQ	LQ	0,187	LQ	0,008	
Catechine	0,003	0,001	0,025	0,351	0,020	0,658	0,422	0,040	0,423	0,164	0,178	0,286	0,150	0,235	0,499	0,325	0,099	0,353	0,305	0,192	0,577	
Acide Ellagique	0,000	LQ	0,033	LQ	0,021	0,772	0,008	LQ	1,077	LQ	0,000	0,529	0,109	0,000	1,276	LQ	0,000	LQ	0,000	0,000	3,688	
Quercétine	0,002	0,001	LQ	0,115	0,010	LQ	0,150	0,108	0,007	0,116	0,044	0,010	0,131	0,043	0,013	0,196	0,034	LQ	0,194	0,098	0,016	
Taxifoline	0,413	0,029	0,010	5,966	0,419	0,133	7,008	0,433	0,094	12,757	0,351	0,205	14,627	0,413	0,175	10,594	0,240	0,126	15,268	0,486	0,174	
Epigallocatechine	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	LQ	
Gallocatechine	0,000	LQ	0,001	0,000	LQ	0,031	LQ	LQ	0,022	0,000	LQ	0,019	0,000	LQ	0,022	LQ	LQ	0,025	LQ	LQ	0,030	
Dihydromyricétine										LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	0,007	LQ
Polydatin	0,000	0,004	LQ	0,000	0,067	LQ	0,000	0,000	LQ	0,000	0,183	LQ	LQ	0,238	LQ	0,000	0,102	0,000	0,000	0,201	LQ	
Astringine	0,000	0,002	0,000	LQ	0,083	0,000	0,000	LQ	LQ	LQ	2,833	0,007	0,034	4,006	0,000	LQ	2,120	0,000	0,026	3,805	0,000	
Catechine Gallate	LQ	0,000	LQ	0,000	0,000	LQ	LQ	0,000	LQ	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	0,023	
Epicatechine gallate	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	
EGCG	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	LQ	0,000	
Gallocatechine gallate	LQ	0,000	LQ	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	LQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	LQ	
Isoquercitrine										LQ	0,008	0,006	LQ	0,008	0,007	LQ	0,006	LQ	LQ	0,008	0,009	
Rutine										0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Isorhapontigenine																						
Isorhapontin																						
Rhapontin																						
Polyphénols totaux (mg Eq AG/g)	34,85	44,07	42,53	315,82	215,81	350,56	394,76	281,15	373,46							500,72	272,76	369,91				
Polyphénols totaux (mg Eq AG/L)										5863,51	4443,90	4576,73	4751,07	3222,32	3417,41	7349,34	5258,07	6944,85	8113,30	7382,74	3940,42	

Annexe 1 : Tableau récapitulatif de la caractérisation des extraits

PARTIE 2

Sortie : %	D_021	E_021	C_021	D_022	C_022	E_022	D_030	E_030	C_030	DOUG_034	CHE_034	EPL_034	DOUG_035	CHE_035	EPL_035	DOUG_036	CHE_036	EPL_036
Myricétine	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ									
Acide Coumarique	LQ	0,016	0,000	LQ	0,000	0,013	LQ	0,012	0,000									
Acide Gallique	0,010	0,020	0,202	0,010	0,151	0,015	0,020	0,031	0,217									
Acide Ferrulique	0,008	0,009	LQ	0,010	LQ	0,008	0,015	0,016	LQ				0,018	0,006	0,016	0,020	LQ	0,013
Resveratrol	LQ	0,019	LQ	LQ	LQ	0,013	LQ	0,009	LQ				0,000	0,000	0,010	LQ	0,000	0,000
Piceatannol	LQ	0,100	0,000	LQ	LQ	0,078	LQ	0,097	LQ				0,000	0,000	0,088	0,000	0,000	0,129
Chryisine	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000									
Lutéoline	0,089	LQ	LQ	0,115	LQ	LQ	0,046	0,000	0,000				0,003	0,000	0,000	0,072	0,000	0,000
Epicatechine	0,308	0,012	0,036	0,568	0,020	0,041	0,360	LQ	0,010				0,339	0,008	0,006	0,121	0,019	0,000
Catechine	0,360	0,209	1,337	0,749	0,812	0,262	0,360	0,141	0,448				0,379	0,279	0,071	0,168	1,336	0,026
Acide Ellagique	LQ	0,000	4,041	LQ	3,721	0,000	0,000	0,000	4,861				0,000	0,449	0,043	0,000	3,419	0,017
Quercétine	0,218	0,213	0,026	0,594	0,025	0,062	0,216	0,044	LQ				0,044	0,002	0,017	0,056	0,006	0,031
Taxifoline	11,285	0,358	0,191	9,877	0,208	0,231	11,293	0,344	0,142				9,688	0,080	0,376	24,140	0,242	0,383
Epigallocatechine	0,000	0,000	LQ	0,000	LQ	LQ	0,000	0,000	0,000				0,000	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000
Gallocatechine	LQ	LQ	0,069	0,000	0,043	LQ	0,000	LQ	0,027				0,000	0,024	0,003	0,000	0,087	0,003
Dihydromyricétine	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	LQ	0,008	LQ	LQ									
Polydatin	0,000	0,149	LQ	0,000	LQ	0,119	0,000	0,130	LQ				0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,097
Astringine	0,008	3,062	0,000	0,000	0,000	2,703	0,019	2,686	0,000				0,002	0,002	0,326	0,000	0,000	1,028
Catechine Gallate	0,000	0,000	0,022	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	LQ				0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
Epicatechine gallate	0,000	0,000	0,006	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000				0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
EGCG	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000									
Gallocatechine gallate	0,000	0,000	LQ	0,000	LQ	0,000	0,000	0,000	LQ									
Isoquercitrine	LQ	0,006	0,007	LQ	0,008	LQ	LQ	0,008	LQ				0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002
Rutine	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000									
Isorhapontigenine													0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,045
Isorhapontin													0,000	0,000	0,104	0,000	0,000	0,229
Rhapontin													0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
Polyphénols totaux (mg Eq AG/g)							456,89	303,31	370,52				446,01	363,50	299,16	407,64	337,75	267,88
Polyphénols totaux (mg Eq AG/L)	13005,49	7565,38	5323,89	11262,11	5132,95	11062,87	5008,50	3270,08	4337,23	4482,44	2599,06	3325,39						

Code extrait	Matière première	Extraction	Solvant	Rapport de bain
CHE015	Chêne	Macération	EtOH 50 %	1/10
CHE016	Chêne	Macération	EtOH 70 %	1/10
CHE019	Chêne	Macération	H ₂ O	1/5
CHE021	Chêne	ASE	EtOH 70 %	1/10
CHE022	Chêne	ASE	EtOH 70 %	1/10
CHE030	Chêne	Macération	H ₂ O	1/10
DOUG015	Douglas	Macération	EtOH 50 %	1/10
DOUG016	Douglas	Macération	EtOH 70 %	1/10
DOUG019	Douglas	Macération	H ₂ O	1/5
DOUG021	Douglas	ASE	EtOH 70 %	1/10
DOUG022	Douglas	ASE	EtOH 70 %	1/10
DOUG030	Douglas	Macération	H ₂ O	1/10
EPI015	Épicéa	Macération	EtOH 50 %	1/10
EPI016	Épicéa	Macération	EtOH 70 %	1/10
EPI019	Épicéa	Macération	H ₂ O	1/5
EPI021	Épicéa	ASE	EtOH 70 %	1/10
EPI022	Épicéa	ASE	EtOH 70 %	1/10
EPI030	Épicéa	Macération	H ₂ O	1/10



**Valbiom vous accompagne
pour concrétiser des solutions durables
en économie biosourcée.**

valbiom

EN PARTENARIAT AVEC



Avec le soutien de
la



Wallonie

