

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN
RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR
MARIE-CHRISTINE RÉGIS
B.Sc. (BIOCHIMIE)

EXTRACTION, CARACTÉRISATION ET BIOTRANSFORMATION
DE LA LIGNINE ALCALINE DE L'ÉPINETTE NOIRE
PICEA MARIANA (Mill.) B.S.P.

NOVEMBRE 1994



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

Suite à une élimination des extractibles la lignine alcaline de l'épinette noire a été extraite à l'aide de NaOH en milieu aqueux dans un autoclave (P=5,44 atm, T=150°C) durant une heure. La lignine recueillie est ensuite purifiée par précipitation avec de l'acide sulfurique (Mansour *et al.*, 1984).

L'échantillon est analysé par RMN à l'état solide (CP/MAS) et RMN à deux dimensions homonucléaire et hétéronucléaire. En plus des structures guaïacyles, hydroxyméthyles, hydroxyphényles coniféryles, synapyles, de nombreuses autres structures particulièrement de types phénylpropanoïdes étherifiées et non étherifiées ont été détectées. L'analyse élémentaire et les spectres infrarouges complètent la caractérisation.

La lignine alcaline de l'épinette noire est ensuite biotransformée par la moisissure blanche *Phanerochaete chrysosporium*. La chromatographie d'exclusion sur gel permet d'observer deux populations de masses moléculaires différentes d'environ 75 000 et 450 Daltons qui varient selon les temps de biotransformation.

RESUME

La lignine est un biopolymère intégré aux parois cellulaires de toutes les plantes vasculaires. Des découvertes récentes dans le domaine médical quant à l'utilisation de la lignine et de ses produits de biotransformation laissent entrevoir l'avenir de ce biopolymère avec beaucoup d'optimisme. En effet, des propriétés antitumorales, antivirales (anti-SIDA, anti-herpès), anticholestérolémiques et anti-influenza ont été signalées dans la littérature récente (Sakagami *et al.*, 1991).

La lignine alcaline de l'épinette noire est extraite selon le procédé KRAFT modifié pour les besoins de cette étude, ce qui permettra l'obtention d'une lignine soluble. Pour ce faire, le bois est préalablement débarrassé des extractibles lors d'une extraction au soxhlet dans un mélange de solvant éthanol:toluène (1:2). La farine de bois ainsi préparée sera cuite durant une heure à l'autoclave dans une solution alcaline de NaOH 5% (M/V) à une pression de 5,44 atm (80psi) et une température de 150°C. Une filtration permet ensuite de séparer la lignine de la cellulose et des hémicelluloses, pour obtenir une lignine soluble. La lignine recueillie est ensuite purifiée par précipitation avec de l'acide sulfurique (Mansour *et al.*, 1984).

Des analyses spectroscopiques sont effectuées sur les échantillons de lignine alcaline de l'épinette noire afin de caractériser ce polymère. La spectroscopie infrarouge permet l'identification des différents groupements fonctionnels qui caractérisent la lignine. L'unité guaïacyl est caractéristique de la lignine extraite des bois mous comme l'épinette noire et se caractérise par une bande d'absorption à 1270 cm⁻¹.

La spectrométrie à résonance magnétique nucléaire (RMN) est utilisée conjointement avec la spectrométrie de masse avec atomes rapides (FAB/MS) afin de confirmer la présence de certaines structures dimériques dans la lignine. Les structures dimériques ayant des liaisons inter-unités de type β -O-4', β -5', β -1', β - β ', 5-5' et 4-O-5' sont identifiées dans la lignine alcaline de l'épinette noire. De plus, des techniques

récentes de spectrométrie à résonance magnétique nucléaire à deux dimensions (RMN-2D) sont maintenant des méthodes de choix pour l'élucidation des structures de biomolécules comme la lignine. Différentes techniques de RMN 2D homonucléaires ^1H - ^1H (ROESY et TOCSY) et hétéronucléaire ^{13}C - ^1H (HMQC), ont été appliquées à la lignine alcaline de l'épinette noire. L'interprétation de ces spectres permet de confirmer la présence des principales unités dimériques de la lignine déjà proposées.

La lignine alcaline de l'épinette noire est ensuite biotransformée par la moisissure blanche *Phanerochaete chrysosporium*. La culture de ce champignon en présence de lignine permet la dégradation des polymères de lignine en unités plus petites. Des mécanismes de polymérisation et dépolymérisation sont aussi observés par chromatographie d'exclusion sur gel. On remarque deux populations de masses moléculaires différentes d'environ 75 000 et 450 Daltons qui varient selon les temps de biotransformation.

Marie-Christine Régis

Jean-Marie Hachey

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, M. Jean-Marie Hachey, qui m'a conseillée et dirigée pour la réalisation de ce mémoire.

Un gros merci aussi au Groupe de recherche en productivité végétale (GRPV) et au Programme d'aide institutionnel à la recherche (PAIR) pour le soutien financier qui m'a permis de mener à bien ce projet.

Sont aussi assurés de ma reconnaissance, Messieurs Robert Forcier, André Barrette, Jean-Marc Gauthier et Conrad Chrétien pour leur assistance technique au cours de ce projet.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
 CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	5
2.1 Choix de la source de lignine.....	6
2.2 Échantillonnage et préparation de la biomasse.....	6
2.3 Extraction alcaline.....	9
2.4 Purification de la lignine alcaline par précipitation avec H ₂ SO ₄	12
2.5 Biotransformations.....	12
2.6 Chromatographie d'exclusion sur gel.....	17
2.7 Spectroscopie infrarouge.....	22
2.8 Spectroscopie RMN.....	23
2.8.1 Spectroscopie RMN ¹³ C à l'état solide.....	23
2.8.2 Spectroscopie RMN en solution.....	25
2.8.2.1 Spectroscopie RMN en une dimension.....	25
2.8.2.2 Spectroscopie RMN en deux dimensions.....	25
Technique TOCSY.....	25
Technique ROESY.....	26

	Technique HMQC	26
2.9	Spectroscopie de masse à bombardement par atome rapide (FAB/MS)	27
CHAPITRE III	RÉSULTATS ET DISCUSSION	29
3.1	Généralités.....	30
3.2	Composition élémentaire.....	38
3.3	Analyses spectroscopiques infrarouge	40
3.4	Analyses spectroscopiques RMN.....	49
3.4.1	Distribution des groupements fonctionnels	51
3.4.2	Spectres RMN ^{13}C à l'état solide (CP/MAS).....	52
3.4.3	Spectre RMN ^{13}C en solution	59
3.4.4	Spectre RMN ^1H en solution	69
3.4.5	Spectre RMN-2D HMQC de la lignine alcaline	75
3.4.6	Spectre RMN-2D ROESY de la lignine alcaline.....	79
3.4.7	Spectre RMN-2D TOCSY de la lignine alcaline.....	83
3.5	Biotransformation	88
CHAPITRE IV	CONCLUSION	102
BIBLIOGRAPHIE	105
ANNEXE 1	117

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1	Protocole d'extraction de la lignine alcaline	7
FIGURE 2	Schéma de l'autoclave	11
FIGURE 3	Courbe d'étalonnage pour la chromatographie	21
FIGURE 4	Biosynthèse de la lignine chez les plantes.....	31
FIGURE 5	Unités monomériques de base de la lignine.....	33
FIGURE 6	Mécanisme de polymérisation radicalaire.....	34
FIGURE 7	Formation de dilignols.....	35
FIGURE 8	Dimères de base de la lignine de type β -O-4', β -5' et β -1'.....	36
FIGURE 9	Dimères de base de la lignine de type β - β' ,5-5' et 4-O-5'.....	37
FIGURE 10	Spectre infrarouge du bois brut de l'épinette noire.....	41
FIGURE 11	Spectre infrarouge du bois pré-extrait de l'épinette noire.....	42
FIGURE 12	Spectre infrarouge de la lignine alcaline de l'épinette noire	43
FIGURE 13	Comparaison des spectres RMN ^{13}C à l'état solide du bois brut, sans extractible et de la lignine alcaline de l'épinette noire	53
FIGURE 14	Spectre RMN ^{13}C en solution dans le DMSO de la lignine alcaline de l'épinette noire.....	60
FIGURE 15	Identification d'un fragment de 4 unités de type β -O-4' et β -5' de masse moléculaire égal à 643	66
FIGURE 16	Identification d'un fragment de 4 unités de type β -O-4' et β -5' de masse moléculaire égal à 699.....	67
FIGURE 17	Identification d'un fragment de 6 unités de type β -O-4' et β -5' de masse moléculaire égal à 1017.....	68

FIGURE 18	Spectre RMN ^1H en solution dans le DMSO- d_6 de la lignine alcaline de l'épinette noire	70
FIGURE 19	Structures confirmées par le spectre RMN ^1H en solution dans le DMSO- d_6 de la lignine alcaline de l'épinette noire	71
FIGURE 20	Spectre RMN-2D HMQC de la lignine alcaline de l'épinette noire	76
FIGURE 21	Spectre RMN-2D ROESY de la lignine alcaline de l'épinette noire	80
FIGURE 22	Spectre RMN-2D TOCSY de la lignine alcaline de l'épinette noire	84
FIGURE 23	Chromatogramme de la lignine alcaline de l'épinette noire entre 0 et 48 heures de biotransformation	89
FIGURE 24	Chromatogramme de la lignine alcaline de l'épinette noire entre 96 et 144 heures de biotransformation.....	90
FIGURE 25	Chromatogramme de la lignine alcaline de l'épinette noire entre 168 et 240 heures de biotransformation.....	91
FIGURE 26	Spectre de masse avec atome rapide (FAB/MS) de la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation.....	95
FIGURE 27	Fragments retrouvés dans la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation d'après le spectre de masse.....	96
FIGURE 28	Produits les plus communs retrouvés dans la fraction de faible masse moléculaire après la dégradation du bois d'épinette par <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	98
FIGURE 29	Fragment de masse moléculaire égale à 714 pour la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation.....	99
FIGURE 30	Fragment de masse moléculaire égale à 801 pour la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation.....	100

FIGURE 31	Fragment de masse moléculaire égale à 1 149 pour la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation.....	101
-----------	--	-----

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Milieu de culture et de fermentation.....	14
TABLEAU II	Conditions d'analyse par chromatographie d'exclusion sur gel	18
TABLEAU III	Caractéristiques des échantillons standards	20
TABLEAU IV	Conditons d'analyse des spectres RMN ^{13}C à l'état solide	24
TABLEAU V	Conditions d'analyse pour la spectrométrie de masse	28
TABLEAU VI	Composition élémentaire de la lignine	39
TABLEAU VII	Interprétation du spectre infrarouge du bois brut de l'épinette noire .	46
TABLEAU VIII	Interprétation du spectre infrarouge du bois sans extractible de l'épinette noire.....	47
TABLEAU IX	Interprétation du spectre infrarouge de la lignine alcaline de l'épinette noire précipitée à l'acide sulfurique	48
TABLEAU X	Structures monomériques issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectre RMN ^{13}C (CP/MAS) et spectre de masse.....	55
TABLEAU XI	Sructures dimériques de type β -O-4' issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectre RMN ^{13}C en solution dans le DMSO et du spectre de masse.....	56
TABLEAU XII	Structures dimériques de type β -5' (phénylcoumarane) issues de la lignine alcalinede l'épinette noire. Spectre RMN ^{13}C (CP/MAS) et spectre de masse.....	58
TABLEAU XIII	Structures dimériques de type β -O-4' issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectre RMN ^{13}C en solution dans le DMSO-d6 et du spectre de masse.....	61

TABLEAU XIV	Structures dimériques de type β -5' issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectre RMN ^{13}C en solution dans le DMSO- d_6 et du spectre de masse.....	63
TABLEAU XV	Structures dimériques de type résinol issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectre RMN ^{13}C en solution dans le DMSO et du spectre de masse.....	64
TABLEAU XVI	Interprétation du spectre RMN ^1H en solution de la lignine alcaline de l'épinette noire.....	72
TABLEAU XVII	Interprétation du spectre RMN-2D HMQC de la lignine alcaline de l'épinette noire.....	77
TABLEAU XVIII	Interprétation du spectre RMN-2D ROESY de la lignine alcaline de l'épinette noire.....	81
TABLEAU XIX	Interprétation du spectre RMN-2D TOCSY de la lignine alcaline de l'épinette noire.....	86
TABLEAU XX	Distribution des masses moléculaires de la lignine alcaline de l'épinette noire lors de la biotransformation par <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	93

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La lignine est un polymère naturel utilisé surtout dans le milieu industriel. Elle est depuis plusieurs années utilisée comme combustible et aussi comme adhésif dans les panneaux gauffrés et de contre-plaqués. Des découvertes récentes dans le domaine médical quant à l'utilisation de la lignine et de ses sous produits laisse entrevoir l'avenir de ce biopolymère avec beaucoup d'optimisme. En effet, des propriétés thérapeutiques anti-cancer, anti-virale et anti-tumorale ont été attribuées à la lignine (Sakagami *et al.*, 1991). Le folklore japonais propose un extrait de cônes de pin pour traiter le cancer de l'estomac. Cet extrait est administré à la population depuis une centaine d'années et Sakagami *et al.* (1991) ont isolé la lignine comme étant l'élément actif de cette potion.

La lignine est un polymère très complexe dont la structure peut être modifiée. Les facteurs qui amènent ces différences structurales sont: l'espèce de la plante d'où la lignine est extraite, la partie de la plante (aiguilles, racines, écorce, cônes, le bois...) et aussi la méthode d'extraction. Les biotransformations par des champignons peuvent aussi produire des composés (sous-produits) ayant des propriétés thérapeutiques. Il importe donc d'obtenir le plus d'information possible sur la structure des différentes lignines. Un projet ultérieur devrait permettre d'évaluer les propriétés thérapeutiques des échantillons produits.

La quantité de biomasse terrestre produite annuellement par photosynthèse atteindrait de 100 à 1000 milliards de tonnes (Bassham, 1975; Bissaria & Ghose, 1981). En effet, plus de la moitié de l'activité photosynthétique des plantes est utilisée pour la conversion du CO₂ atmosphérique en matériel lignocellulosique. Ce dernier peut contenir de 15 à 36% de lignine, un polymère de phénylpropanoïdes présent chez les plantes vasculaires, qui assure la rigidité de la plante en liant les fibres des parois cellulaires les unes aux autres. La lignine diminue la perméabilité à l'eau à travers la paroi cellulaire du tissu xylème et rend le bois plus résistant aux attaques par des microorganismes (Kirk, *et al.*, 1971).

La lignine est un polymère composé d'unités phénylpropanoïdes. La structure de base de ces monomères de lignine peut être substituée en deux (2) ou trois (3) positions: l'addition d'un groupement méthoxyle en position 3 du noyau phénolique donne une unité guaïacyle, l'addition de deux groupements méthoxyles en position 3 et 5 du noyau phénolique produit une unité syringyle. Les bois durs (angiospermes) contiennent un rapport varié des unités de lignine de type syringyle et guaïacyle, tandis que les conifères (gymnospermes) sont principalement composés de guaïacyle (Fengel & Wegener, 1983). Par polymérisation radicalaire, les unités phénylpropanoïdes qui comportent des groupements phénoliques et méthoxyles se regroupent pour former des dilignols, trilignols et finalement la structure du polymère. Il est généralement accepté que la réaction qui contribue le plus à la délignification alcaline est le bris des liaisons β -O-4' alkyl-aryl-éther entre les unités phénylpropanoïdes (Obst, *et al.*, 1979)

La lignification dans les plantes est initiée enzymatiquement pour donner des radicaux monolignols. Le couplage de ces radicaux au hasard donne un polymère racémique avec des unités répétitives difficilement identifiables. Le nombre de possibilités de liaison dans un polymère est tellement grand que les chercheurs préfèrent étudier la lignine en fragments de dimères ou trimères. En effet, pour chaque unité phénylpropanoïde additionnée à une structure, on ajoute deux isomères optiques. Pour donner une idée de cette complexité, une molécule de lignine relativement petite, simplifiée et régulière, composée seulement d'unités β -éther possède un degré de polymérisation de 100 (masse moléculaire d'environ 19 600). Cette molécule donne lieu à $1,6 \times 10^{60}$ isomères optiques et conséquemment il y a de l'ordre de 10^{60} composés physiques distincts (Ralph, 1993), ceci seulement pour un polymère d'aussi faible masse moléculaire. L'utilisation de la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire du carbone-13 et du proton (RMN¹³C et ¹H) a contribué à l'élucidation de la

structure de la lignine en comparant les spectres de cette molécule à celui de différents composés modèles (Ede & Brunow, 1992).

Il n'existe pas de méthode absolue pour caractériser complètement un polymère de cette complexité. Cependant, il existe un ensemble de techniques d'analyse qui permet de mieux comprendre la structure des polymères de lignine. La chromatographie d'exclusion sur gel nous permettra de suivre la distribution des masses moléculaires lors de la dégradation des polymères de lignine par un champignon de type basidiomycète, *Phanerochaete chrysosporium*. Selon des études antérieures (Higuchi, T. 1983), ce microorganisme a la particularité de procéder à la dégradation de la lignine. Les produits de biotransformation de la lignine pourraient posséder certaines propriétés thérapeutiques, mais celles-ci seront évaluées lors de travaux ultérieurs. Les analyses spectroscopiques infrarouges, la résonance magnétique nucléaire (RMN) du carbone-13 à l'état solide et en solution, la RMN en deux dimensions hétéro et homo-nucléaire ainsi que la spectrométrie de masse par bombardement d'atomes rapides (FAB/MS) permettront de proposer un modèle de base représentant le plus fidèlement possible quelques unités de ce polymère, ceci en se basant sur des modèles déjà étudiés.

Les objectifs de ce travail consistent à:

1-proposer une méthode d'extraction efficace basé sur le principe du procédé industriel "KRAFT" ceci pour la lignine alcaline de l'épinette noire;

2-caractériser la lignine alcaline de l'épinette noire à l'aide des techniques suivantes:

- spectrométrie infrarouge;
- résonance magnétique nucléaire du carbone-13 à l'état solide;
- résonance magnétique nucléaire en deux dimensions hétéronucléaire ^{13}C - ^1H (HMQC) et homonucléaire ^1H - ^1H (ROESY et TOCSY);
- spectrométrie de masse par bombardement d'atomes rapides (FAB/MS);

3-effectuer la biodégradation de la lignine alcaline avec *Phanerochaete chrysosporium*;

4-caractériser les produits biotransformés par les techniques suivantes:

- chromatographie d'exclusion sur gel;
- spectrométrie de masse par bombardement d'atomes rapides.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Choix de la source de lignine

Les forêts du Québec sont en majorité constituées de conifères. Ce travail porte sur une espèce majoritaire de nos forêts: l'épinette noire ou *Picea mariana* (Mill) B.S.P. Cette espèce a été choisie en raison de sa grande abondance dans nos régions. Le territoire québécois se divise en trois grandes zones: la toundra, la taïga et la forêt. La zone la plus méridionale, "la forêt", s'étend sur 757 900 km² ou 45% de la superficie totale du Québec. Dans cette partie du Québec, les pessières noires recouvrent 58,1% du territoire (Parent, 1991). Le bois de l'épinette noire est léger, mou, faible, et sujet à torsion. Son usage par excellence est la fabrication du papier, pour laquelle sa fibre est supérieure à celle des autres bois flottables. On peut dire que durant le premier quart du vingtième siècle, l'épinette noire aura été notre grande richesse nationale.

2.2 Échantillonnage et préparation de la biomasse

La méthodologie adoptée pour l'extraction de la lignine alcaline de l'épinette noire est résumée à la figure 1. Les premières étapes sont l'échantillonnage et le broyage de la biomasse. Ensuite une pré-extraction est effectuée afin d'éliminer les extractibles. La farine de bois préparée est ensuite cuite à l'autoclave pour en extraire la lignine. La liqueur noire obtenue est précipitée par l'ajout d'acide sulfurique afin de purifier la lignine.

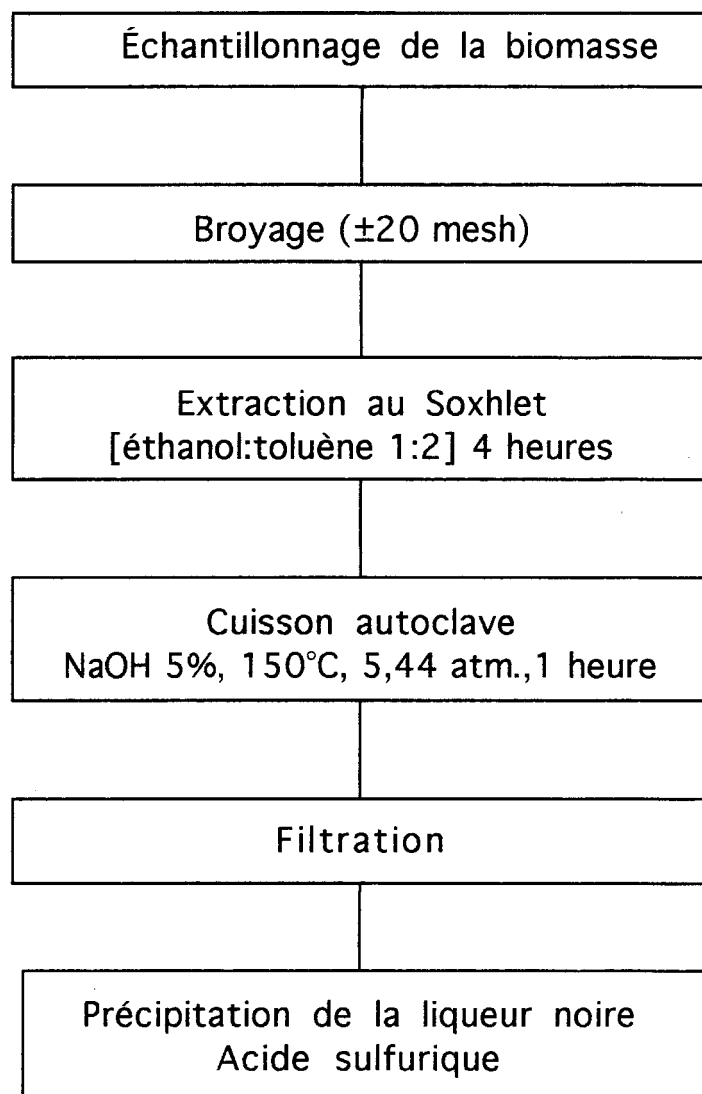


Figure 1 Schéma du protocole d'extraction de la lignine alcaline.

L'échantillonnage s'est effectué dans une forêt de Saint-Ambroise près du lac Ambroise, au Saguenay. Les troncs de trois épinettes noires matures ont été prélevés au hasard à l'aide d'une scie à main, afin de prévenir la contamination par les hydrocarbures. Le bois a par la suite été écorcé afin de ne garder que le duramen et l'aubier. Le bois a été réduit en copeaux à l'aide d'une raboteuse. Les copeaux ont été séchés à l'air et broyés à l'aide d'un moulin Wiley. Ce type de moulin permet de produire de fines particules de bois de dimensions précises. Dans cette étude, la dimension des particules est de ± 20 mesh.

La farine de bois est ensuite débarrassée des extractibles qui pourraient nuire à la purification de la lignine. En effet, il est convenu de différencier les constituants de la paroi cellulaire (composée de polysaccharides et de lignine) des composés extractibles, qui sont des substances extra-pariétales qui ne sont pas considérées comme faisant partie de la structure essentielle de la paroi cellulaire ou de la lamelle moyenne. Ces produits extractibles sont principalement composés de terpènes et d'acides gras. Plusieurs composés extractibles sont facilement solubles dans des solvants organiques neutres. Une extraction au soxhlet est donc effectuée afin d'éliminer les extractibles. Le matériel solide finement broyé de manière à obtenir une plus grande surface de contact est placé dans un filtre à extraction. Le filtre s'ajuste dans la chambre à extraction et permet le passage des solvants tout en retenant le solide. Les solvants utilisés sont le l'éthanol et le toluène dans un rapport 1:2. Cette combinaison de solvants forme un azéotrope dont le point d'ébullition est de 76°C. Les solvants placés dans le ballon sont chauffés et recondensés par un réfrigérant, ainsi ils emplissent la chambre à extraction, jusqu'à ce qu'ils atteignent le plus haut niveau où les solvants retournent dans le ballon. Cette extraction se prolonge sur une période de quatre (4) heures. Le bois est ensuite séché à l'air afin d'éliminer les traces de solvant.

2.3 Extraction alcaline

Seulement une faible quantité de lignine peut être dissoute lorsque le bois est traité avec une solution alcaline diluée froide. Une plus grande quantité de lignine est extraite des plantes avec une solution de NaOH 5 % (M/V) à 100°C, mais des hautes températures sont requises pour arriver à une délignification significative du bois (Browning, 1967). D'après Labidi *et al.*, (1993), il y a trois étapes pour la délignification du bois. La première est caractérisée par un phénomène de diffusion correspondant à la solubilisation de 21% de la lignine. Cette partie est facilement solubilisée. Durant cette étape, la structure macromoléculaire subit une réticulation partielle, laquelle facilite la pénétration des réactifs. La deuxième étape principale est caractérisée par la dissolution de la majeure partie de la lignine (73% environ) et correspond au bris des liaisons β -O-4'. L'étape finale durant laquelle un autre 6% de la lignine est extraite se produit seulement quand les conditions expérimentales sont assez draconiennes.

Quand le bois est chauffé à des températures de l'ordre de 160-180°C avec une solution de NaOH (5%) sous pression, la majeure partie de la lignine est extraite. Ce traitement est basé sur le processus de la lignine sodique commerciale ou lignine KRAFT (Browning, 1967).

Dans cette expérience, l'extraction de la lignine consiste en une cuisson de la farine de bois préparée, ceci dans une solution fortement alcaline de NaOH. On place 75g de la farine de bois ayant subi la pré-extraction dans un autoclave (figure 2) avec 1 200 mL de NaOH 5% (m/v). Ce mélange est cuit à une température de 150°C pendant 1 heure et à une pression de 5,44 atm maintenue sous atmosphère d'azote.

Description du matériel:

- système de contrôle de la température Barber-Coleman model 72c;
- autoclave standard de 2 litres model AFP-2005 magne drive packless de la compagnie AUTOCLAVE ENGINEERS de Pensylvanie, USA;
- potentiomètre micromite thermo-electric de la compagnie Saddle Brook, New Jersey USA.

Après une heure de cuisson, le mélange est refroidi en faisant circuler de l'eau froide dans le serpentin à l'intérieur de l'autoclave. La liqueur noire est ensuite récupérée avec la cellulose. Le tout est filtré sur un entonnoir Büchner avec un papier filtre Wathman #4 et lavé à l'eau distillée. La liqueur noire recueillie dans le filtrat est ensuite évaporée sur un évaporateur rotatif afin d'éliminer le plus d'eau possible. Le résidu recueilli est la lignine alcaline.

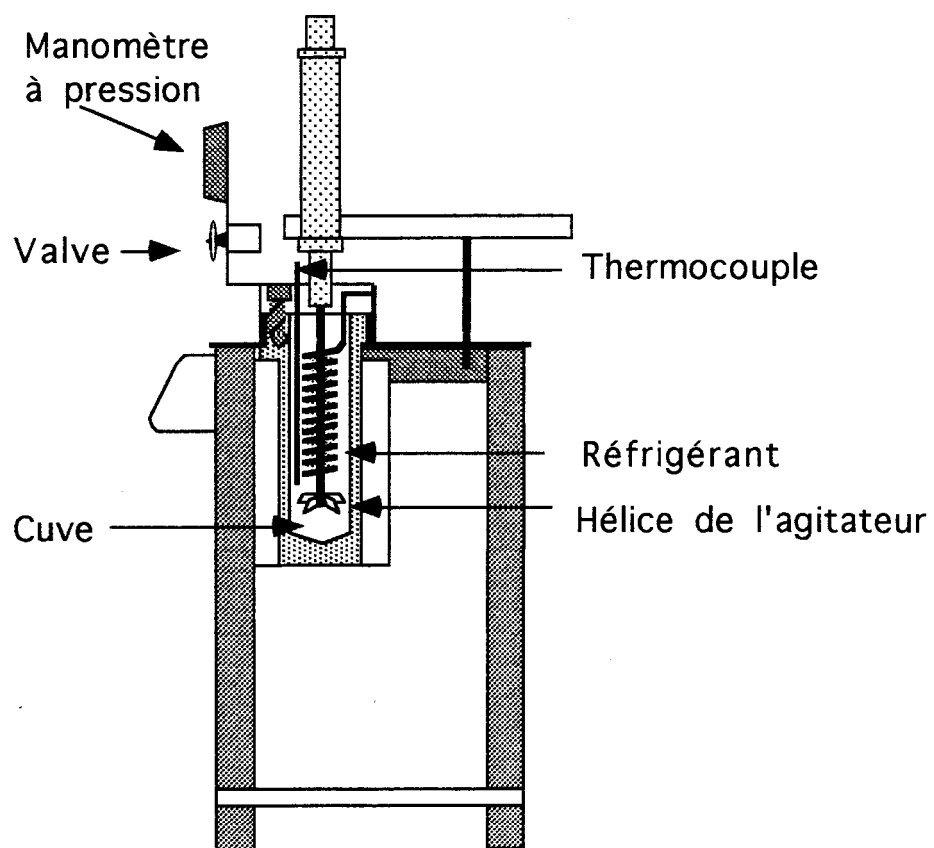


Figure 2 Schéma de l'autoclave utilisé pour la cuisson de la lignine.

2.4 Purification de la lignine alcaline par précipitation à l'acide sulfurique

Afin de faciliter les analyses spectroscopiques, la lignine contenue dans la liqueur noire est purifiée par précipitation selon la méthode décrite par Mansour *et al.* (1984). Pour ce faire, la liqueur noire est acidifiée avec de l'acide sulfurique concentré jusqu'à l'obtention d'un pH de 1,5. La solution acide est chauffée à 90°C avec un agitateur magnétique pendant 1 heure. La solution refroidie est filtrée sur un verre poreux moyen et le solide est lavé à l'eau distillée. Le solide est dissous dans le NaOH 5% (M/V). La solution de lignine alcaline est acidifiée avec de l'acide sulfurique concentré jusqu'à l'obtention d'un pH de 3,0. Le précipité est filtré sur le verre poreux et lavé à l'eau distillée. Le précipité est séché à l'air et ensuite broyé au mortier pour obtenir une poudre plus ou moins uniforme qui est la lignine alcaline de l'épinette noire pure précipitée par l'acide sulfurique. Par cette méthode, des rendements de l'ordre de 10 à 12 % (M/M) ont été obtenus pour la lignine alcaline de l'épinette noire.

2.5 Biotransformations

L'espèce utilisée, *Phanerochaete chrysosporium* ou encore *Sporotrichum pulverulentum*, est un champignon de type basidiomycète qui a la particularité de dégrader la lignine, ce qui produit une réduction de la longueur des unités phénylpropanoïdes composant le polymère. Des phénomènes de repolymérisation sont également observés (Schoemaker *et al.*, 1989). Cette espèce est obtenue à partir des souches de l'American Type Culture Collection (numéro de série: ATCC 24725).

La souche initiale de *Phanerochaete chrysosporium* est repiquée sur un milieu propice à sa croissance. Des plaques de gélose contenant un milieu de culture spécifique aux mycètes ont donc été préparées de la façon suivante:

La préparation de 200 mL de milieu nécessite 7,84g d'agar et 1,6g de dextrose à base de pomme de terre. Le milieu dissous est stérilisé à l'autoclave pendant 30 minutes à 121°C et une pression de 1,044 N/cm². Le milieu de culture est ensuite versé dans des vases de pétris dans lesquels *Phanerochaete chrysosporium* sera inoculé à l'aide d'un fil à boucle. Les milieux ainsi préparés sont incubés à 25°C pour une période de 96 heures, ce qui est le temps nécessaire pour obtenir une croissance optimale (Larouche, 1993). Cette méthode permet de produire une culture pure de *Phanerochaete chrysosporium*.

La deuxième étape est la préparation des milieux de culture Mandels-Weber (Mandels & Weber, 1969). Les milieux Mandels-Weber ont été conçus pour supporter la croissance de *Phanerochaete chrysosporium* dans un milieu liquide et pour lui permettre de dégrader la lignine présente dans le milieu. Un milieu Mandels et Weber (1969) (Chahal, D.S. & Khan, S.M., 1991) a été adapté aux conditions expérimentales permettant la biotransformation de la lignine. Les éléments contenus dans les milieux Mandels-Weber sont décrits au tableau I.

TABLEAU I

Milieu de culture et de fermentation

Produits	Concentration (g/L)
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	10,0
Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	2,0
Sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$)	1,4
Urée (H_2NCONH_2)	0,3
Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,3
Chlorure de calcium ($CaCl_2$)	0,3
Extrait de levure	0,5
	Concentration (mg/L)
Sulfate de fer (II) ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	5,0
Sulfate de manganèse (II) ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)	2,23
Sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	2,76
Chlorure de cobalt (II) ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	3,66

Chacun des constituants du milieu est dissous dans l'eau de manière à faire 1L de solution. On transfère ensuite 50mL de milieu Mandels-Weber dans un flacon de 125mL. Les milieux sont stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes à 121°C. Les manipulations suivantes sont effectuées sous la hotte à flux laminaire pour éviter les contaminations. Les milieux Mandels-Weber sont inoculés avec *Phanerochaete chrysosporium*. Pour ce faire, 10mL de milieu Mandels-Weber sont pipetés et déposés sur le vase de pétri contenant les champignons. Ensuite, en grattant la surface de la gélose avec le bout de la pipette, les spores et le mycélium passent en solution dans le milieu. À l'aide d'une pipette, les 10mL de milieu contenant le champignon sont récupérés et ajoutés au flacon initial de milieu Mandels-Weber.

Les flacons de milieux de culture inoculés sont placés sur une plaque agitatrice Junior Orbit Shaker. Les milieux sont agités à une vitesse de 100 rotations par minute (rpm) pendant 96 heures. Après cette période de croissance, les microorganismes sont prêts à être cultivés en présence de lignine.

La dernière étape est la fermentation de la lignine. Lorsque la croissance du microorganisme est à son maximum dans les milieux Mandels-Weber, les milieux contenant ces mycètes sont homogénéisés au mélangeur électrique. Le réservoir du mélangeur doit être préalablement stérilisé. Le champignon est maintenant prêt à être inoculé dans les milieux Mandels-Weber contenant la lignine alcaline de l'épinette noire.

Les milieux de fermentation contiennent les mêmes éléments que le milieu Mandels-Weber additionnés de lignine. Pour faire ces milieux, on prépare 1L de milieu Mandels-Weber dans lequel on ajoute 1,5g de lignine. Le pH du milieu est ajusté à 6,0 avec de l'acide chlorhydrique. Ce milieu sera ensuite divisé en 10 fractions de 100mL dans des flacons de 250mL qui contiendront chacun 0,15g de lignine. Dans chacun de ces milieux, 10mL de

milieu Mandels-Weber contenant *Phanerochate chrysosporium* sont ajoutés. Les milieux sont ensuite agités sur une plaque agitatrice à une vitesse de 200rpm. À toutes les 24 heures un flacon est retiré, le pH de ce flacon est vérifié et celui des autres flacons est réajusté à 6,0, sous la hotte à flux laminaire avec du NaOH préalablement stérilisé afin d'éviter la contamination. Le flacon retiré est filtré sur un papier filtre Whatman #4 afin d'éliminer toute trace de microorganisme; une goutte de formaldéhyde est aussi ajoutée au milieu filtré afin d'empêcher la croissance des microorganismes. Les échantillons sont gardés à 4°C jusqu'à l'analyse chromatographique.

2.6 Chromatographie d'exclusion sur gel

La chromatographie d'exclusion sur gel ou tamisage moléculaire est une technique de séparation basée sur la dimension moléculaire des substances. Cette technique permet l'estimation des masses moléculaires des échantillons de lignine. Idéalement, ce processus voudrait exclure toutes les autres interactions qui ne seraient pas directement liées à la dimension physique de la molécule comme par exemple l'adsorption, l'échange ionique, la solubilité préférentielle.

La phase stationnaire choisie pour cette expérience est le SÉPHADEX G-50-fine, manufacturé par la compagnie Pharmacia d'Uppsala en Suède. Le choix des caractéristiques du SÉPHADEX dépend de la taille des molécules et des propriétés chimiques des substances à séparer.

L'analyse chromatographique des échantillons de lignine alcaline est effectuée sur une colonne de verre LKB d'une longueur de 17,8cm et de 1,6cm de diamètre interne. Le détecteur UV de modèle "UV ALTEX 153" mesure un signal photométrique à une longueur d'onde fixe de 280nm. Le volume de la cellule du détecteur est de huit (8) μ l et celle-ci est reliée à une pompe péristaltique de la compagnie Rainin, modèle Rabbit. Le système de pompe permet de garder un débit constant de l'ordre de 0,5 mL·min⁻¹. Le signal fourni par le détecteur est transcrit par un enregistreur analogique de type "Linear 2000". Les conditions d'analyse sont décrites au tableau II.

TABLEAU II

Conditions d'analyse par chromatographie de perméation sur gel

Phase stationnaire	Séphadex G-50 fine
Phase mobile	eau distillée filtrée
Longueur de la colonne	17,8cm
Diamètre interne	1,6cm
Volume total (Vt)	33,0mL
Volume interstitiel (Vo)	13,5mL
Volume intérieur des grains (Vi)	6,7mL
Volume de la matrice (Vm)	12,7mL
Débit	0,5mL/min
Volume d'injection	500 μ l
Détecteur	UV ALTEX, 153
Longueur d'onde	280nm
Enregistreur	Linear 2000
Sensibilité	5mV

Le gel de Séphadex est gonflé dans l'eau (préalablement dégazée et contenant du NaN_3) pendant une période de 24 heures. La colonne est montée comme décrit dans la littérature (Pharmacia, 1985). Un volume de $500\mu\text{l}$ d'échantillon est injecté et le débit de l'éluant est maintenu à $0,5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$

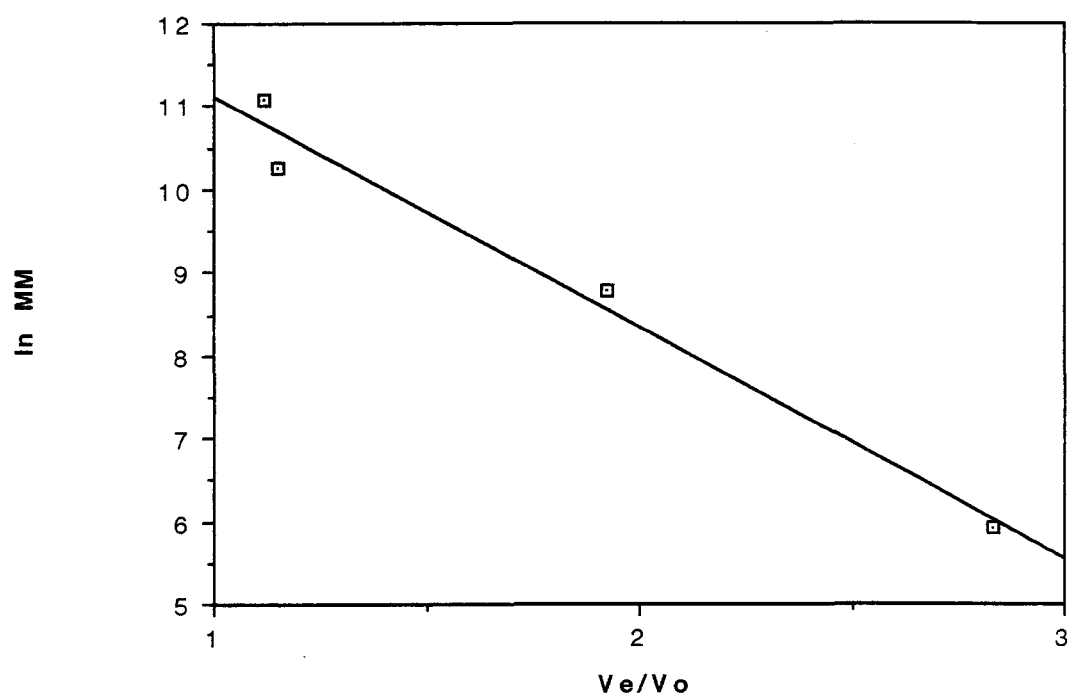
Une courbe étalon est obtenue à l'aide de marqueurs moléculaires certifiés et comprenant 5 échantillons de masse moléculaire allant de 2 000 000 à 376 Daltons. Les caractéristiques des échantillons standards obtenus chez la compagnie Sigma sont présentés au tableau III. La courbe d'étalonnage comprend quatre (4) standards, soit: l'albumine (66 000 Daltons), l'anhydrase carbonique (29 000 Daltons), l'aprotinine (6 500 Daltons) et la riboflavine (376 Daltons). En considérant ces quatre (4) standards, l'équation reliant la masse moléculaire MM au volume d'élution V_e s'écrit comme suit: $\ln MM = m (V_e/V_0) + b$.

où V_0 est le volume interstitiel, m et b sont des paramètres caractéristiques à une courbe d'étalonnage donnée.. L'utilisation de ces standards moléculaires s'est avérée efficace pour cette étude et pour celles réalisées antérieurement (Larouche, 1993; Kern, 1983)

TABLEAU III

Caractéristiques des échantillons standards

Molécules d'étalonnage	Mw (Daltons)	ln MM	Ve (mL)	Ve/Vo
Bleu dextran	2 000 000	14,51	13,50	1,00
Albumine	66 000	11,09	15,16	1,12
Anhydrase carbonique	29 000	10,27	15,96	1,15
Aprotinine	6 500	8,78	25,65	1,92
Riboflavine	375	5,93	38,25	2,83



Légende:

MM: Masse moléculaire
Vo: Volume interstitiel
Ve: Volume d'élution

Figure 3 Courbe d'étalonnage pour la chromatographie sur gel de Séphadex G-50.

2.7 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) est une méthode rapide permettant la caractérisation des groupements fonctionnels et des composantes majeures de différents échantillons. Lorsque la molécule reçoit de la lumière IR à la fréquence où elle peut entrer en résonance, elle absorbe de l'énergie et l'amplitude de ses vibrations est légèrement augmentée. Le retour éventuel à l'état fondamental libère cette énergie sous forme de chaleur.

La spectroscopie infrarouge caractérise les molécules par leurs excitations vibrationnelles et rotationnelles. La molécule présente des vibrations d'élongation (stretching) et de déformation angulaire (bending); des bandes harmoniques, de combinaison et de différence peuvent également être observées. Les vibrations de liens de valence sont caractérisées par une variation de la distance entre les atomes selon l'axe de liaison. Les vibrations de déformation comportent des effets de cisaillement, de rotation, de balancement et de torsion (Pasto & Johnson, 1979; Silverstein *et al.*, 1991)

Avec l'arrivée de la génération des spectromètres à transformée de Fourier, l'évaluation qualitative et quantitative des données se fait plus facilement et de façon plus précise. Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier fabriqué par la compagnie Midac et couplé à un système d'acquisition des données a été utilisé. Les données numérisées ont été enregistrées sur un ordinateur compatible IBM muni du logiciel LAB CALC (Copyright Galactic Industries Corp., 1991).

Les échantillons ont été préalablement placés dans un dessicateur avec du CaCl_2 durant 24 heures pour éliminer toute trace d'humidité qui pourrait nuire à une bonne analyse.

Ces échantillons sont ensuite mélangés avec du bromure de potassium, KBr solide, pour en faire une pastille. Pour éliminer les signaux donnés par les molécules de KBr, le spectre de transmission de cette référence est soustrait du spectre de l'échantillon.

2.8 Spectroscopie RMN

2.8.1 Spectroscopie RMN ^{13}C à l'état solide

Les échantillons ont été analysés à l'état solide (CPMAS- ^{13}C) au Laboratoire régional de RMN à haut champ de l'Université de Montréal. L'acquisition des données a été réalisée sur un spectromètre Varian, Modèle VXR 300 opérant à 75,431MHz pour le carbone-13, avec une sonde BB Doty ayant une vitesse de rotation typique de 4kHz. L'angle d'impulsion était de 90° et la période d'impulsion de $5,9\mu\text{s}$. Une période de relaxation de 6,0sec était nécessaire entre chaque passage et la largeur spectrale d'acquisition est de 30 030Hz. Les spectres RMN ont été enregistrés avec des intégrations qualitatives. Les analyses des échantillons ont été effectuées de deux façons: l'une selon les conditions normales et l'autre avec le procédé TOSS (Total Suppression of Sidebands) (Sanders & Hunter, 1988). Ce procédé permet de minimiser l'effet de la matrice de l'échantillon afin de fournir un spectre dépourvu de tout dédoublement. Les conditions d'analyse détaillées du RMN ^{13}C sont présentées au tableau IV.

TABLEAU IV

Conditions d'analyse de la spectroscopie RMN du carbone-13 à l'état solide

Appareil	Varian, VXR 300
Techniques	Solide CP/MAS
Angle magique du spin	54°44'
Séquence	Pulse
Angle d'impulsion	90°
Fréquence	75 431 Hz
Température	25°C
Largeur spectrale	30 030 Hz
Temps de relaxation	6.0 sec
Temps d'impulsion	5,9 μ s
Vitesse du spin	3 900 Hz
Méthode	TOSS

2.8.2 Spectroscopie RMN en solution dans DMSO-d6

2.8.2.1. Spectroscopie RMN en une dimension

Les conditions générales pour l'obtention des spectres RMN en solution dans le DMSO-d6 du ^{13}C et du ^1H sont les suivantes: environ 30mg de lignine alcaline était dissoute dans 0,5 mL de DMSO-d6 pour le spectre du proton ^1H . Pour le spectre du ^{13}C une solution de 100 mg de lignine alcaline dans 0,5 mL de DMSO-d6 est préparée. Les spectres ont été obtenus sur un spectromètre multinoyaux Bruker AMX-600 de champ magnétique fixe à 14,1 Tesla muni d'un système Aspect Hamilton Station à une température de 300°K. La largeur spectrale était de 600,13 MHz pour ^1H et de 150,9 MHz pour le ^{13}C . Les signaux du solvant apparaissent à 2,49 ppm pour ^1H et 39,7ppm pour ^{13}C .

2.8.2.2 Spectroscopie RMN en deux dimensions

Les conditions expérimentales générales pour les différents essais de RMN en deux dimensions (Schraml, *et al.*, 1988) sont les mêmes que celles des spectres RMN en solution dans le DMSO-d6 en une dimension (section 2.7.1.1.). Les conditions expérimentales spécifiques de chacune des expériences réalisées en RMN à deux dimensions sont détaillées dans la section qui suit.

Expérience TOCSY

Le programme d'impulsion standard Bruker MLSVET a été utilisé avec un temps total de mélange de 25msec. La phase sensible du spectre TOCSY a été mesurée à 600MHz sur une fenêtre spectrale F1 et F2 de 6666,67Hz. Un total de 512 mesures d'induction libre

selon la technique States-TPPI FIDS pour chaque spectre TOCSY fut accumulé en utilisant 8 transferts selon des temps (t_1) variables appliqués durant la période d'évolution sur une fenêtre de données de 2K et un délai de relaxation de 1,5sec.

Expérience ROESY

Le spectre ROESY fut obtenu en utilisant la méthode "CW spin lock" (spin lock à onde continue) appliquée durant 200 msec. Un total de 512 mesures d'induction libre selon la technique States-TPPI FIDS fut accumulé en effectuant 32 transferts par t_1 sur une matrice de 2K points et un temps de relaxation de 1,5sec. Les données sont ensuite transformées selon une matrice de 2K x 2K à l'aide d'une apodisation SINE-BELL appliquée à deux dimensions.

Expérience HMQC

Les corrélations des déplacements chimiques (^1H , ^{13}C) sur une liaison sont obtenues en mode de détection du proton selon la méthode HMQC avec une impulsion BIRD en maintenant le découplage du ^{13}C durant la période d'acquisition obtenue par la méthode GARP. La largeur spectrale des ^1H était de 5434 Hz et celle des ^{13}C de 25656 Hz. Un total de 480 mesures de décroissance d'induction libre (FIDS) selon la technique séquentielle States-TPPI FIDS fut accumulé en effectuant 16 balayages par t_1 sur une matrice de 2K points et un temps de relaxation de 1,5 sec. Les données sont ensuite transformées en matrice 2K x 1K avec un déphasage $\pi/2$ d'une fonction d'apodisation SINE-BELL appliquée à deux dimensions.

2.9 Spectroscopie de masse (FAB/MS)

La spectroscopie de masse est une technique spectroscopique très courante pour la détermination des structures chimiques. Pour cette analyse, la spectrométrie de masse par bombardement d'atomes rapides (FAB/MS: Fast Atom Bombardement / Mass Spectroscopy) est utilisée. Cette technique consiste à bombarder le composé avec un faisceau d'atomes rapides de césium. C'est une technique douce qui permet l'étude de molécules complexes comme la lignine, en observant les rapports m/z (masse /charge) des composés. Les conditions d'analyse sont résumées au tableau V. Une source d'ions césium utilisant une émission de $2\mu\text{A}$ à 22kV fut utilisée. Les spectres de masse (FAB/MS) ont été réalisés au Laboratoire de spectrométrie de masse à haute résolution de l'Université de Montréal. Les échantillons étaient dissous dans une matrice de thioglycérol ($2\mu\text{l}$) et la température avant injection était de 60°C .

TABLEAU V

Conditions d'analyse de la spectrométrie de masse (FAB/MS)

Appareil	VG, Autospec-q
Phase	solide (CP/MAS)
Courant	2 μ A
Énergie	22kV
Température	60°C

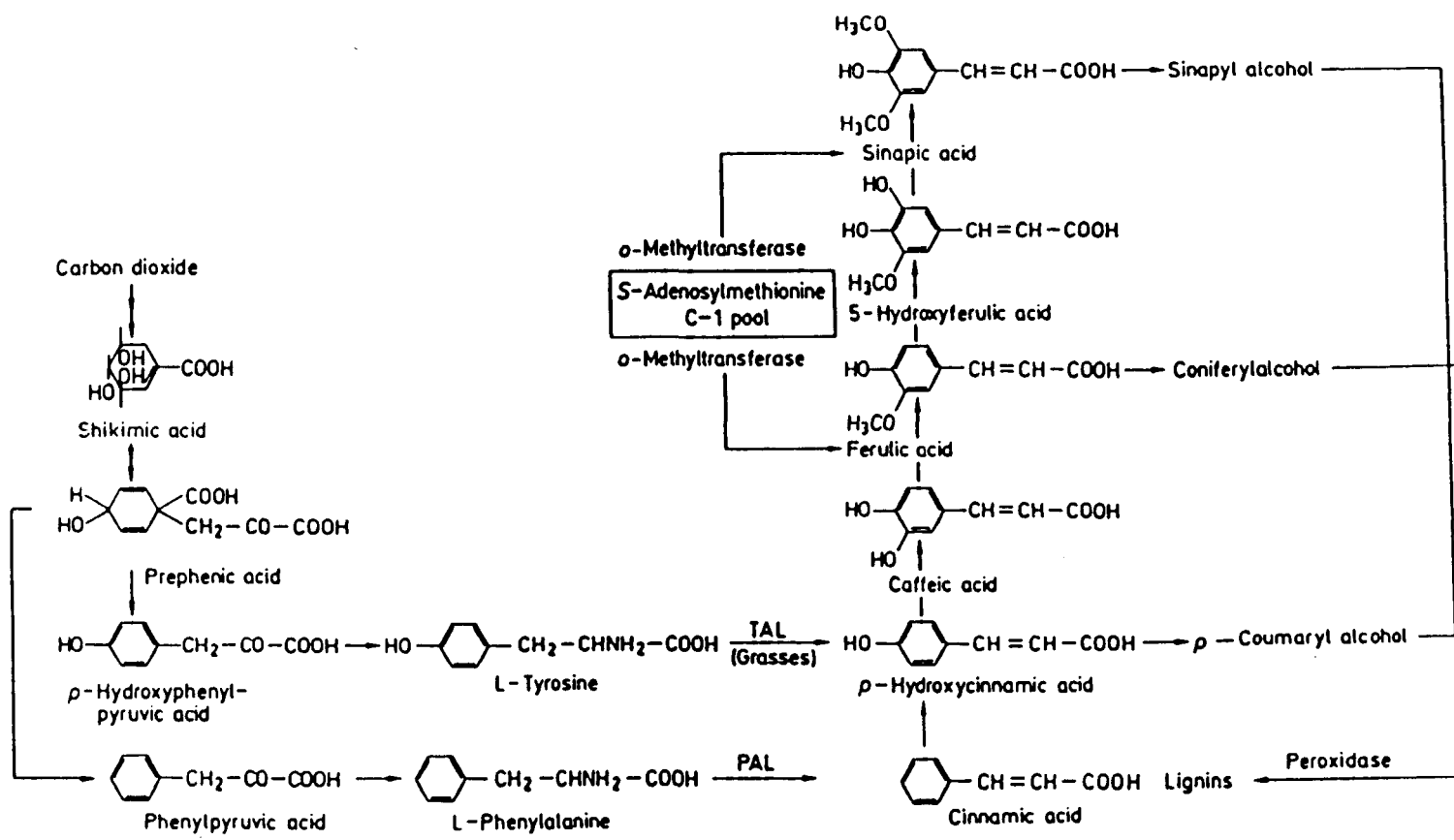
CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

Pour faciliter la compréhension des résultats, ceux-ci seront discutés au fur et à mesure qu'ils sont présentés. Les premiers résultats issus des analyses spectroscopiques amèneront de l'information sur la structure de la lignine alcaline de l'épinette noire. Ensuite, la chromatographie d'exclusion sur gel apportera des précisions sur la distribution des masses moléculaires de la lignine au cours des biotransformations par le champignon *Phanerochaete chrysosporium*.

3.1 Généralités

Afin de faciliter l'interprétation des résultats les différentes structures et liaisons composant la lignine seront présentés dans la section suivante. La biosynthèse de la lignine commence avec la fixation du CO₂ atmosphérique dans les plantes sous forme de carbone. Ceux-ci seront par la suite métabolisés en tyrosine et phénylalanine par la voie métabolique de l'acide shikimique (Higuchi, 1985). Suite à un enchaînement de réactions enzymatiques (figure 4) la plante parvient à synthétiser les précurseurs de lignine soient les alcools coniféryle, synapyle et p-hydroxyphényle (Higuchi, 1985). La structure de base de la lignine est composée d'un groupement phénolique auquel est attaché un groupement propanoïde en position 1 du noyau aromatique. Il existe trois principaux groupements phénylpropanoïdes dans la lignine se différenciant chacun par la présence de groupements méthoxyles sur le noyau aromatique. Ainsi, il y a les unités guaiacyles avec un groupement méthoxyle sur le troisième carbone du noyau aromatique, les unités syringyles avec deux



Légende: TAL: Tyrosine ammoniacale liase
PAL: Phénylalanine ammoniacale liase

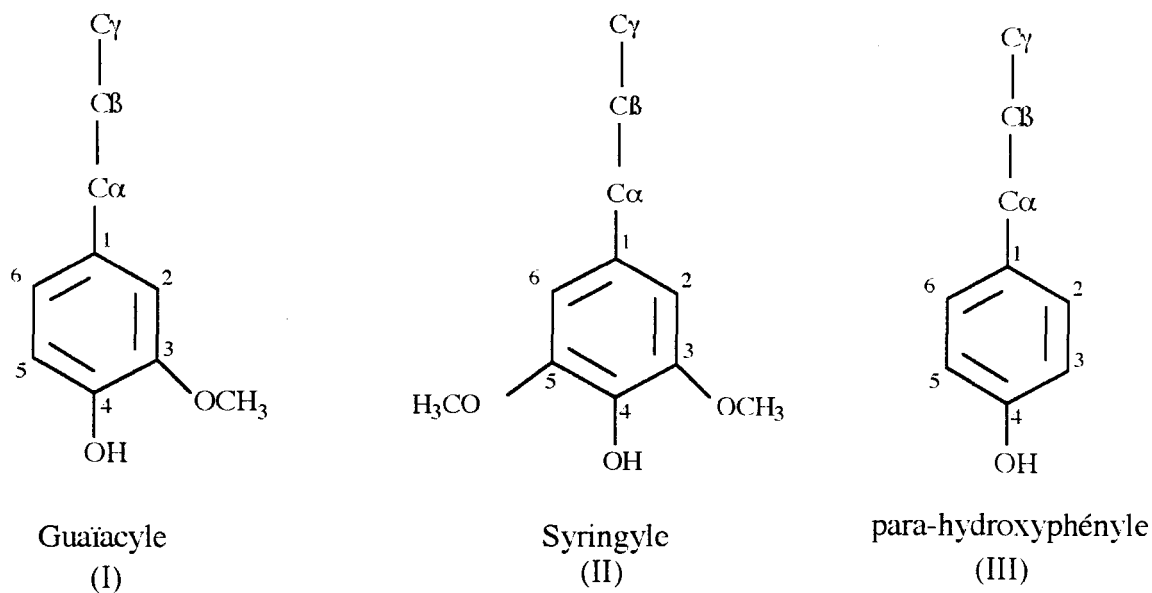
Figure 4 Biosynthèse de la lignine chez les plantes.¹

¹ Higuchi *et al.* (1977)

groupements méthoxyles en position trois (3) et cinq (5) du noyau, et ensuite les unités para-hydroxyphényles n'ayant aucun groupement méthoxyle. Les différentes unités monomériques de la lignine sont présentées à la figure 5.

La synthèse de la lignine s'effectue à partir de ces unités phénylpropanoïdes qui se polymérisent suite à un mécanisme radicalaire enzymatique. Cette polymérisation fait suite à l'abstraction enzymatique d'un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (OH) du noyau aromatique (figure 6). La formation d'un radical laisse des possibilités de mésomérie par délocalisation des radicaux afin d'obtenir une structure plus stable. Une fois les radicaux phénoxy formés, la polymérisation se fait de façon non-enzymatique (Janshekar *et al.*, 1982). Les unités radicalaires formées conduiront à la formation d'une grande variété de dilignols (figure 7), trilignols etc.

Les principaux dimères de lignine sont présentés aux figures 8 et 9. La structure dimérique (β -O-4') éther guaiacyl glycérol β -aryl, représente 40 à 60% de toutes les liaisons interunités de la lignine de conifère. La structure phénylcoumarane (β -5') et biphényle (5-5') représentent chacune environ 10% des liaisons interunités. Le diarylpropane (β -1') varie de 5 à 10 % et les autres structures comme le pinorésinol (β - β), le biphényléther (4-O-5') contribuent pour 5% de l'abondance relative (Higuchi, 1985).



Bois mou (gymnospermes):

Polymères de I

Bois dur (angiospermes):

Polymères de I + II

Lignine de l'herbe:

Polymères de I + II + III + acide coumarique

Figure 5: Unités monomériques de base de la lignine ²

² Higuchi, (1985)

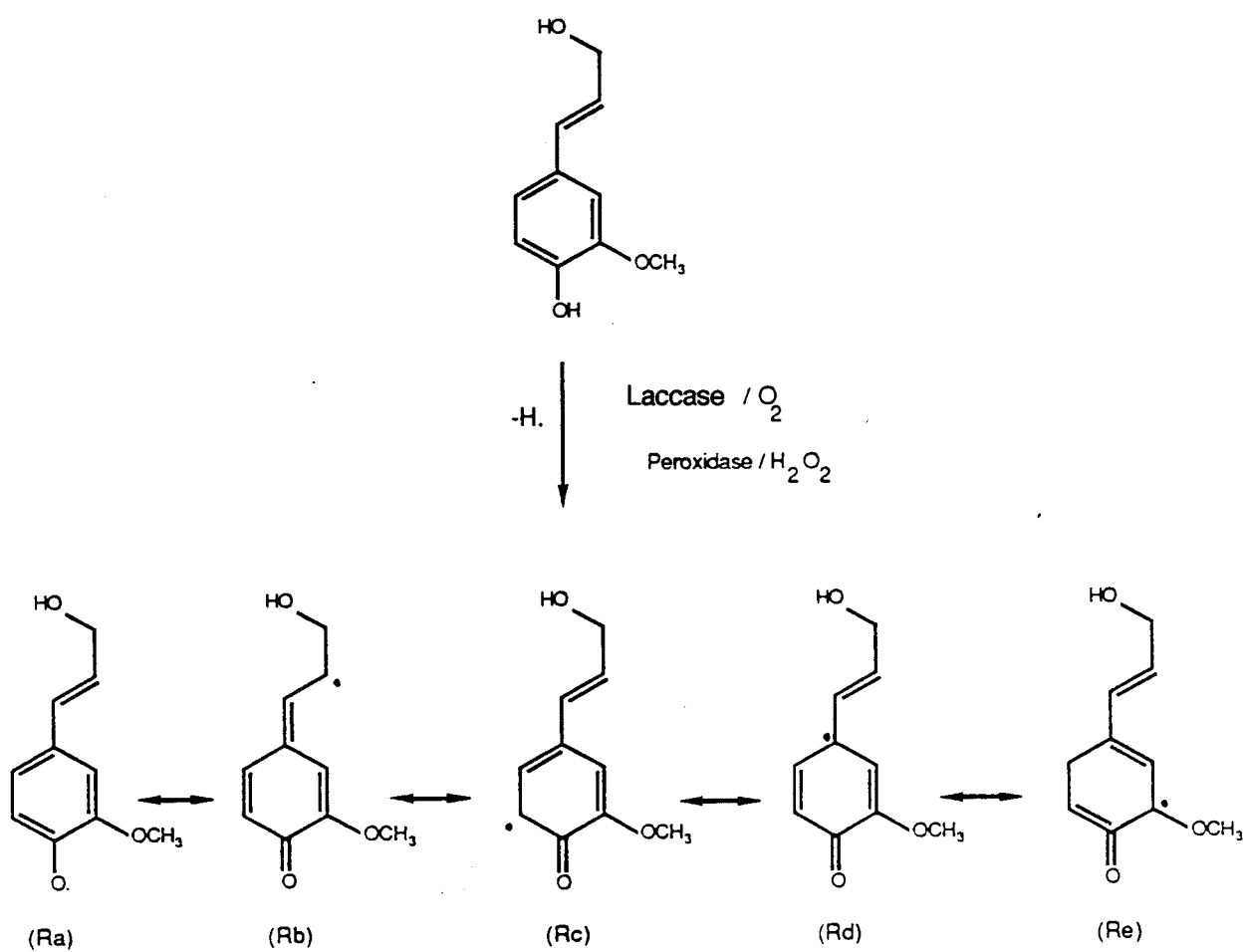
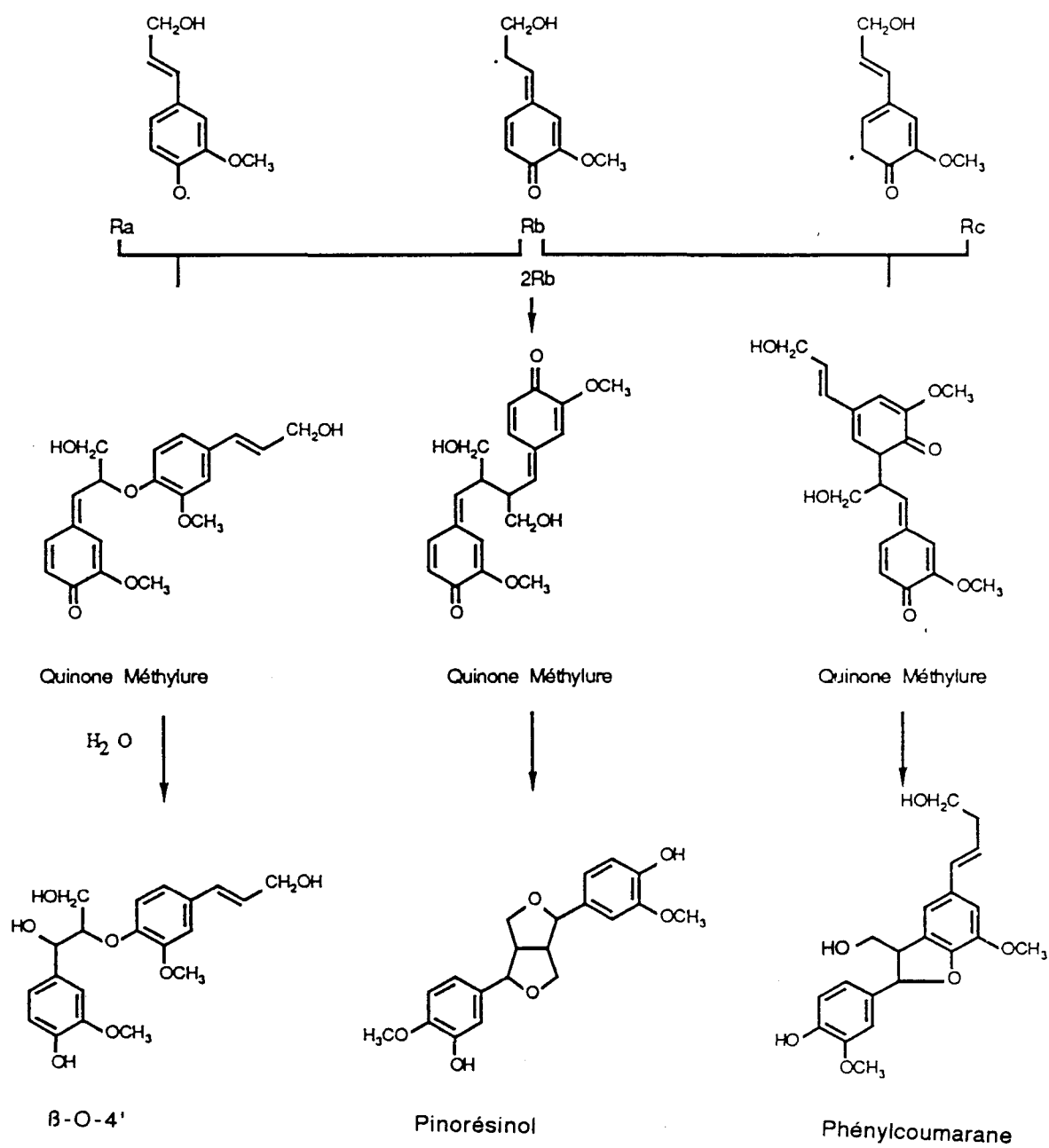
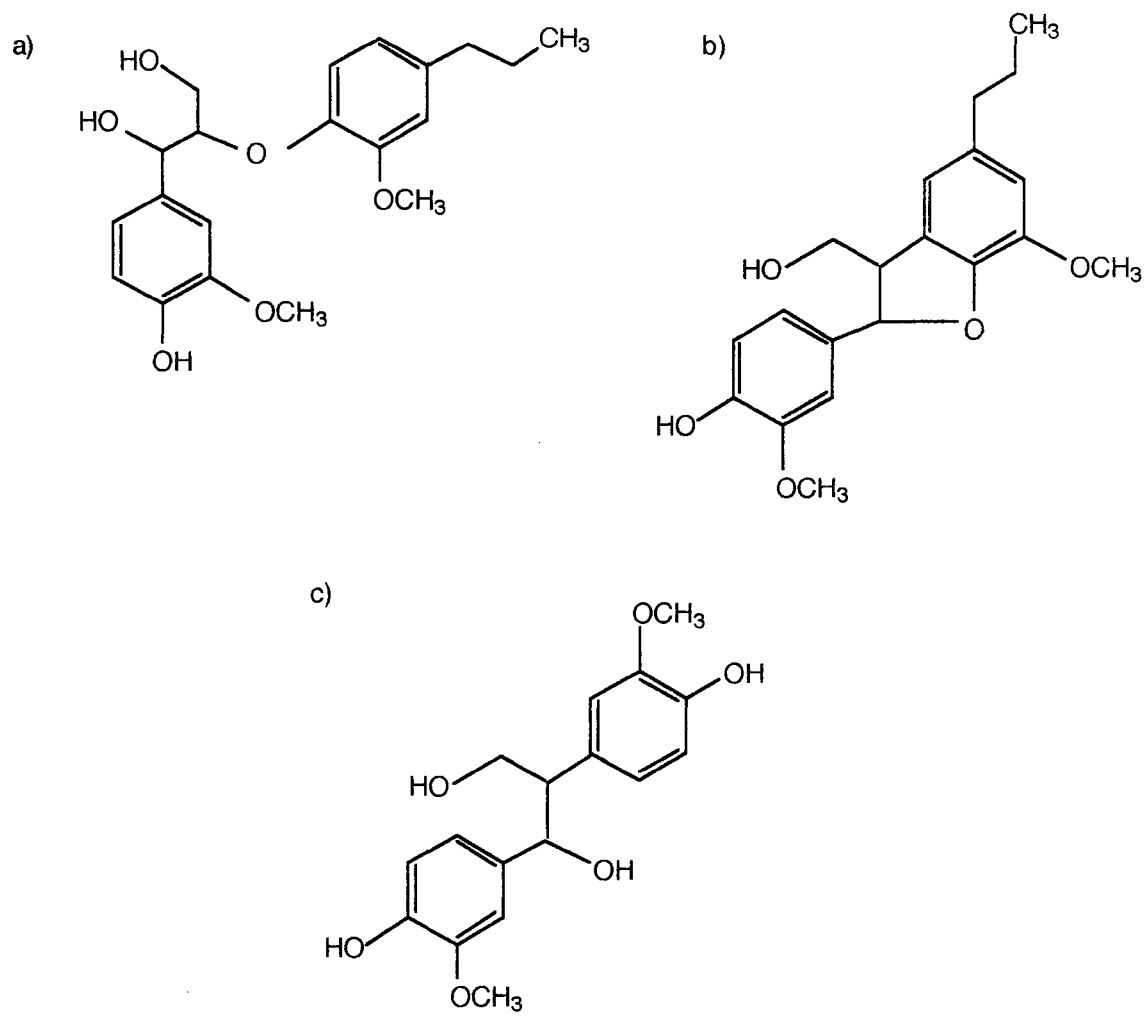


Figure 6 Mécanisme de polymérisation radicalaire.³

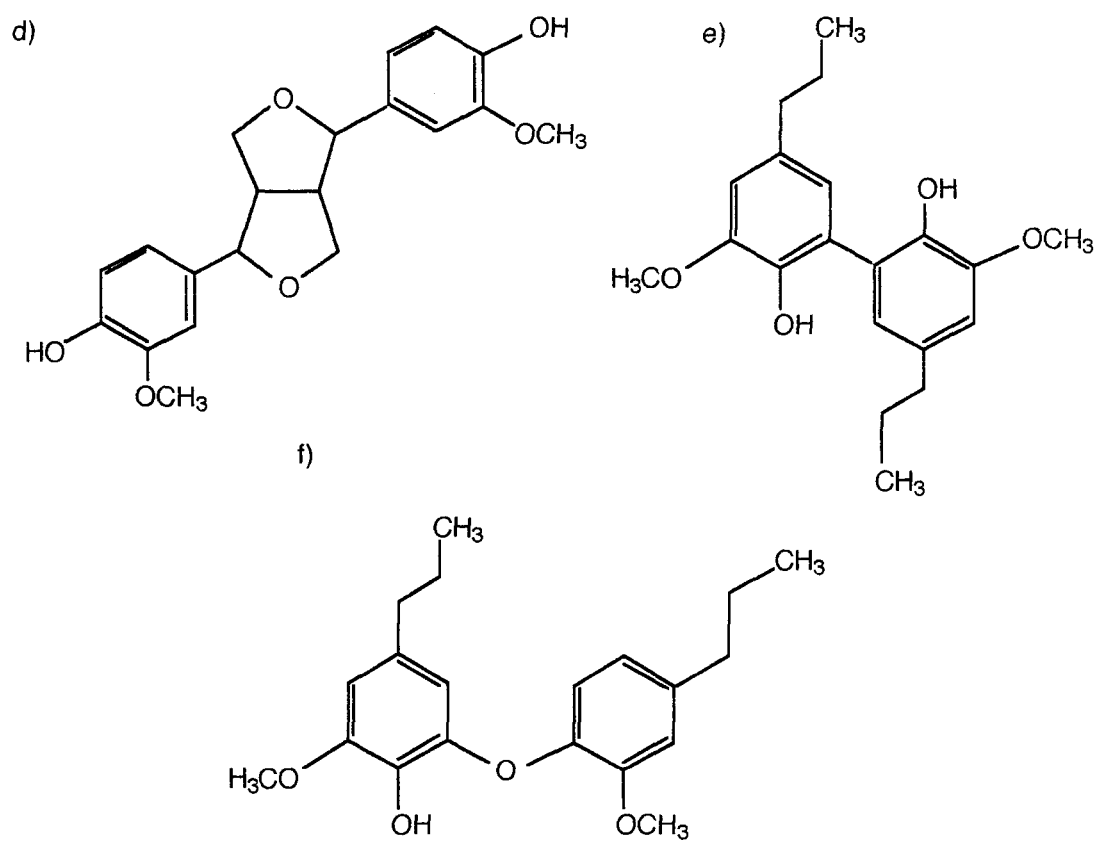
Figure 7 Formation de dilignols.⁴



Légende:

- a) Éther guaiacylglycérol β -aryl (β -O-4')
- b) Phénylcoumarane (β -5')
- c) Diarylpropane (β -1')

Figure 8 Dimères de base de lignine de type β -O-4', β -5' et β -1'. ⁵



Légende:

- d) Pinorésinol (β-β')
- e) Biphényl (5-5')
- f) Biphényléther (4-O-5')

Figure 9: Dimères de base de lignine de type β-β', 5-5' et 4-O-5'.⁶

⁶ Higuchi, (1985)

3.2 Composition élémentaire de la lignine alcaline

La composition trouvée pour la lignine alcaline de l'épinette noire (*Picea mariana* (Mill) B.S.P.) contient 58,26% (p/p) de carbone, 5,87% d'hydrogène, 10,20% de groupement méthoxyle et 0,36% de sodium. Après calculs, la proportion d'oxygène dans la lignine alcaline est de 25,31% plus celle comprise dans les groupements méthoxyles. Les données recueillies sont comparables avec celles présentées par Fengel & Wegener (1984) pour la lignine des essences résineuses comme *Picea mariana* et *Picea abies*. Le tableau VI présente la comparaison des compositions élémentaires de ces espèces pour différentes méthodes d'extraction. La proportion de chacun des constituants demeurent sensiblement la même pour les essences résineuses, environ 60% de carbone, 30% d'oxygène, 5% d'hydrogène et 10 à 15% pour les groupements méthoxyles.

TABLEAU VI

Composition élémentaire de la lignine

Lignine	Espèces	C	H	O	OCH ₃	Références
		%	%	%	%	
alcaline	<i>Picea mariana</i>	58,3	5,9	25,3	10,2	Ce travail
MWL	<i>Picea mariana</i>	63,70	6,3	29,4	15,4	Fengel, 1984
MWL	<i>Picea abies</i>	62,3	5,7	32,0	15,6	Fengel, 1984
KRAFT	<i>Pinus spec</i>	58,3	4,6	21,6	13,4	Fengel, 1984

Légende:

MWL = Mill wood lignin

3.3 Analyses spectroscopiques infrarouges

La spectroscopie infrarouge est une technique qui permet d'identifier les groupements fonctionnels caractéristiques des composés. Cette technique ne permet pas de définir exactement la structure d'une molécule aussi complexe que la lignine. Cependant les résultats obtenus permettent de constater des différences majeures dans les composantes principales du bois telles la lignine, la cellulose et l'hémicellulose.

Afin d'étudier les spectres des échantillons provenant de l'épinette noire, ceux-ci ont été soumis à la méthode de différenciation. Cette méthode permet de maximiser la résolution en minimisant le risque d'erreur (Faix & Beinhof, 1988). Le spectre de soustraction qui résulte du spectre de l'échantillon moins celui de la référence (KBr), permet d'éliminer les signaux attribuables à l'air, au KBr, et au bruit de fond de l'appareil dans l'interprétation des résultats.

Pour voir l'évolution dans le procédé d'extraction, les spectres infrarouges de trois échantillons provenant du même arbre (épinette noire) sont analysés: le bois brut, le bois pré-extrait avec l'éthanol-toluène et la lignine alcaline précipitée avec de l'acide sulfurique. Les spectres obtenus sont présentés aux figures 10, 11 et 12.

On remarque sur les trois spectres infrarouges, la présence des groupements hydroxyles (OH), représentés par une large bande dans la région de $3\,400\text{ cm}^{-1}$ (Browning, 1967). Les vibrations de valence reliées aux C-H aromatiques sont aussi communes aux trois spectres. Elles sont caractérisées par des absorptions dans la région de $2\,800$ et $3\,030\text{ cm}^{-1}$.

Les fonctions caractéristiques des unités de base de la lignine sont les fonctions aromatiques, carbonyles (C=O), les alcools et les éthers. Chacune de ces fonctions est

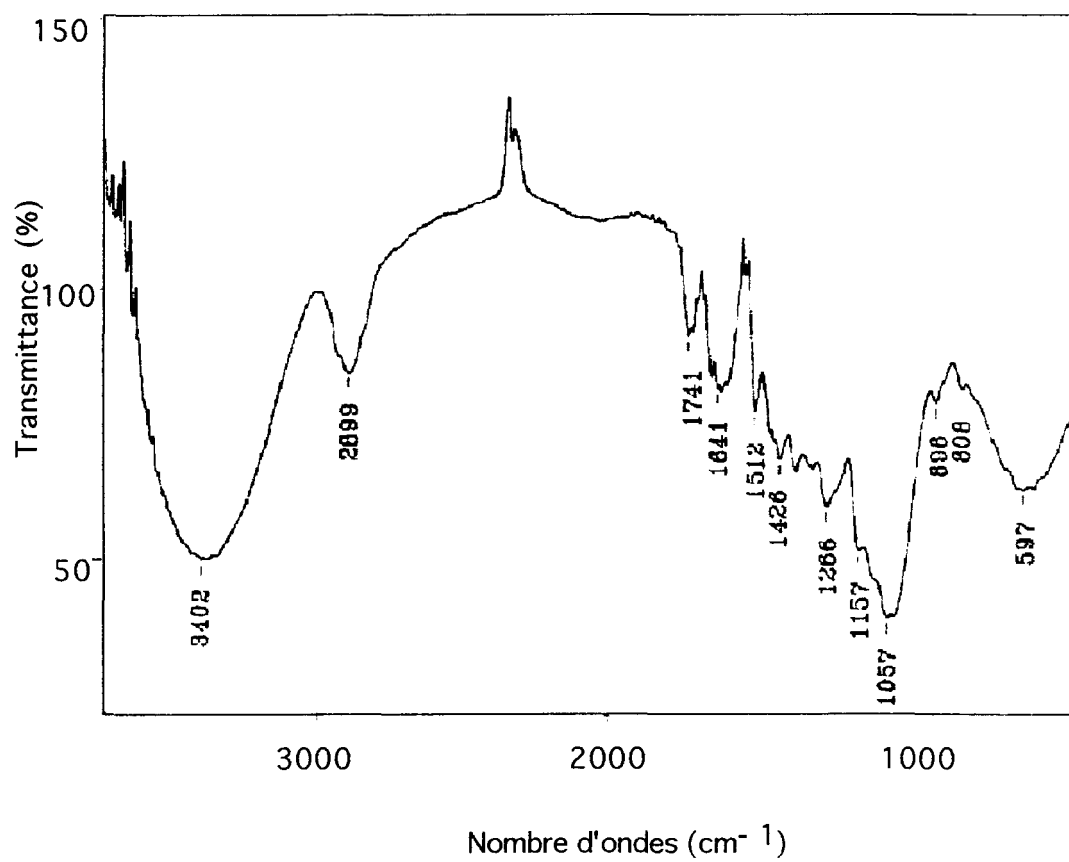


Figure 10 Spectre infrarouge du bois brut de l'épinette noire.

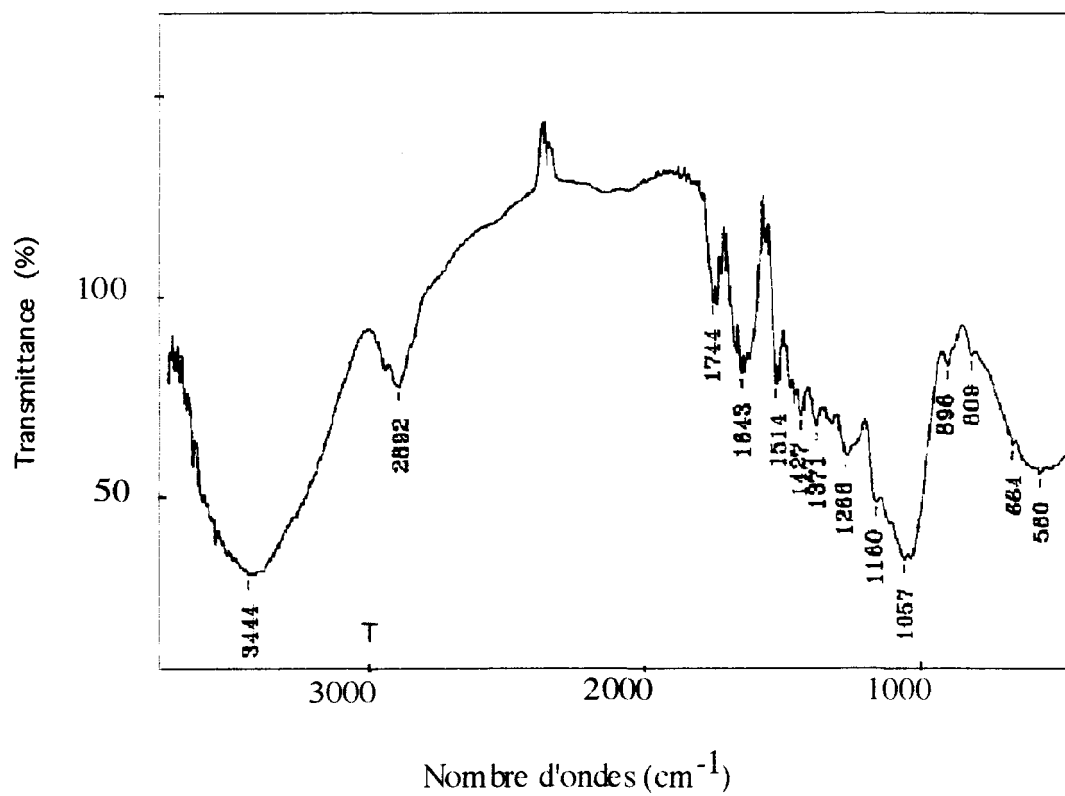


Figure 11 Spectre infrarouge du bois pré-extrait de l'épinette noire.

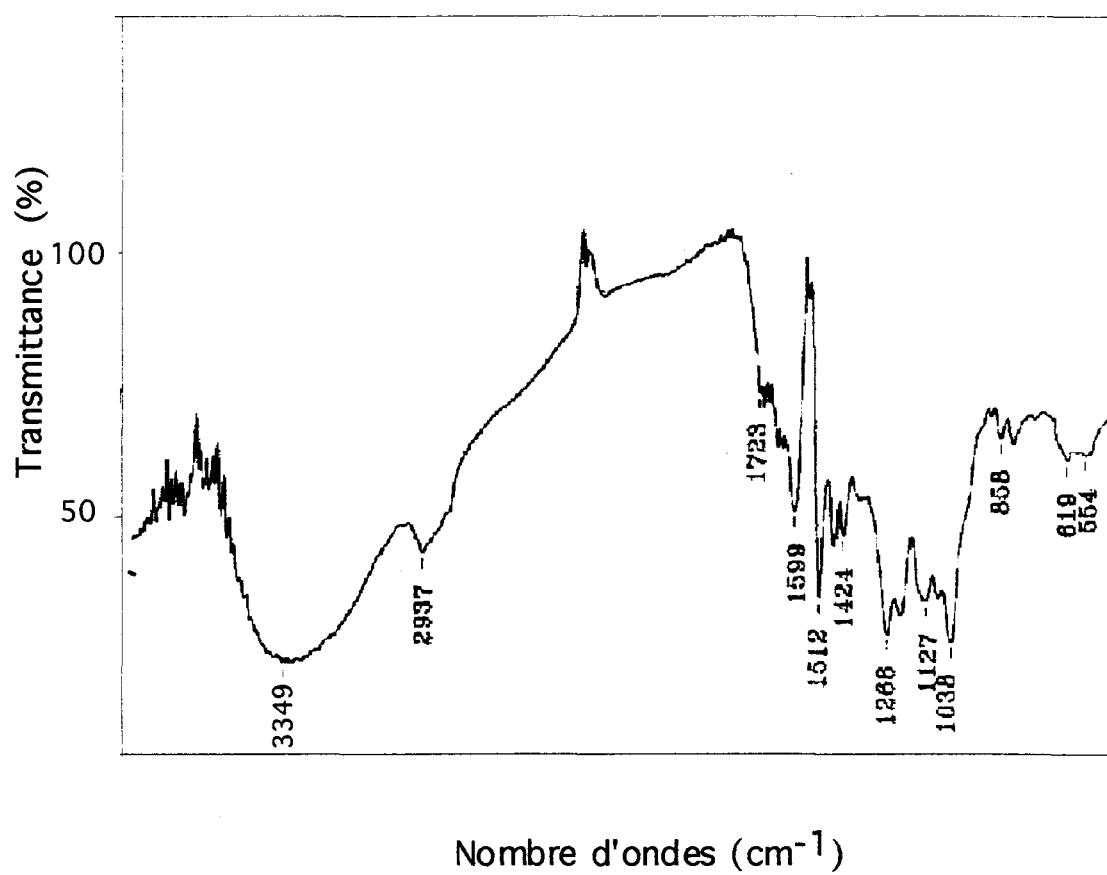


Figure 12 Spectre infrarouge de la lignine alcaline de l'épinette noire précipitée avec de l'acide sulfurique.

retrouvée dans le spectre infrarouge de la lignine alcaline de l'épinette noire. Les fonctions aromatiques sont caractérisées en infrarouge, par des bandes d'absorption dans la région de 1 500 à 1 600 cm^{-1} , ce qui est caractéristique des vibrations C=C du squelette aromatique de la lignine (Silverstein *et al.*, 1991; Browning, 1967). Aussi, des études fondamentales sur les vibrations du benzène ont montré que le mode de vibration de valence des liaisons carbone-carbone conjuguées du squelette aromatique conduit à l'apparition de 4 bandes situées entre 1 650 et 1 450 cm^{-1} (Bellamy, 1964). Ces bandes apparaissent dans le spectre de la lignine alcaline à 1 463, 1 512, 1 548 et 1 599 cm^{-1} .

Les fonctions carbonyles sont représentées par de larges bandes intenses dans la région de 1 600 à 1 725 cm^{-1} . D'après Sarkanen (1971), la bande d'absorption à 1660 cm^{-1} est caractéristique des vibrations de valence dans les groupements carbonyle-aryle conjugués. La présence de ces fonctions est confirmée par les bandes d'absorption à 1 659 et 1 709 et 1 723 cm^{-1} . Ces bandes ne sont pas identifiées spécifiquement sur la figure 12 en raison des contraintes d'espace, mais elles se retrouvent dans la description détaillée du spectre au tableau IX.

Ce qui est intéressant de constater dans les spectres infrarouges des échantillons analysés, c'est la présence d'anneaux guaiacyles et l'absence des anneaux syringyles. En effet, la lignine des bois mous (conifères) est principalement constituée de monomères de lignine de type guaiacyle tandis que la lignine des bois durs (feuillus) sera constituée d'un mélange de monomères de lignine de type guaiacyle et syringyle. L'absence d'absorption dans la région à 1 300 cm^{-1} permet de confirmer l'absence de groupement syringyle caractéristique des feuillus (Fengel, & Wegener, 1984). Les échantillons analysés présentent une vibration liée à l'anneau aromatique à 1 266 ou 1 268 cm^{-1} qui est caractéristique du groupement méthoxyle relié à l'anneau guaiacyle.

La bande d'absorption retrouvée à $1\,038\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations RC-H et aux alcools R-OH, ce qui implique la présence de fonctions alcools en bout de chaîne.

Une analyse plus détaillée des spectres infrarouges du bois brut, pré-extrait et de la lignine alcaline de l'épinette noire est présentée aux tableaux VII, VIII et IX.

Les spectres infrarouges de la lignine et du bois de l'épinette noire ne nous permettent pas de définir la structure de la lignine, mais plutôt de confirmer la présence des principales fonctions caractéristiques des lignines de bois mou comme les conifères.

TABLEAU VII

Interprétation du spectre infrarouge du bois brut de l'épinette noire

No	Signaux observés		Interprétation
	(cm ⁻¹)	Trans (%)	
01	597	64,4	gr. vinyle
02	808	82,9	benzène trisubstitué: 1,2,4
03	896	80,3	CH aromatiques à l'extérieur du plan de déformation
04	1 033	40,9	gr. guaiacyle CH, COH
05	1 057	40,5	vib. val. alcool sec. α -insaturé
06	1 157	53,0	CH aromatiques à l'intérieur du plan de déformation, type guaiacyle
07	1 266	61,0	éthers aromatiques; alcool aliph.: prim., sec., ter.; phénol; noyau guaiacyle
08	1 317	68,0	chaîne aliphatique
09	1 371	67,3	déformation C-H asym. dans CH ₃
10	1 426	69,6	vibration du squelette aromatique couplé avec CH dans le plan de déformation
11	1 463	74,6	déformation CH assymétrique dans les groupements méthyles, méthylènes et méthoxyles
12	1 512	78,5	déformation CH assymétrique dans les groupements méthyles, méthylènes et méthoxyles
13	1 548	103,7	gr. ester, carbonate
14	1 611	83,4	vib. noyau aromatique
15	1 641	82,7	benzène trisubstitué: 1,2,4
16	1 660	84,9	vib. val. carbonyle-aryl -cétone
17	1 690	99,3	vib. C=O conj.
18	1 741	92,5	gr. ester
19	2 899	85,2	vib. val. C-H aromatique
20	3 402	50,4	vib. val. O-H; pont H intermoléculaire

TABLEAU VIII

Interprétation du spectre infrarouge du bois pré-extrait de l'épinette noire

No	Signaux observés		Interprétation
	(cm ⁻¹)	Trans (%)	
01	442	27,2	benzène monosubstitué; disubst.: ortho, méta
02	560	192,8	---
03	664	141,8	---
04	809	46,3	benzène tri-substitué 1,2,4
05	896	74,3	aromatique C-H
06	1 031	128,2	gr. guaïacyl C-H, C-OH
07	1 057	97,4	vib. val. alcool sec.α-insaturé
08	1 160	54,0	CH aromatiques à l'intérieur du plan de déformation, type guaïacyle
09	1 266	105,1	éthers aromatiques; alcool aliph.: prim., sec., ter.; phénol; noyau guaïacyle
10	1 317	42,4	chaîne aliphatique
11	1 371	580,1	déformation C-H symétrique
12	1 427	119,3	vibration du squelette aromatique couplé avec CH dans le plan de déformation.
13	1 464	25,0	déformation C-H asym. dans CH ₂
14	1 514	33,7	vibration aromatique dans le noyau
15	1 552	17,4	benzène trisubstitué: 1.2.4
16	1 613	40,5	C=C conjuguée dans le noyau aromatique
17	1 643	10,6	C=C conjuguée avec le benzène
18	1 660	22,2	vib. val. carbonyle-aryl-cétone
19	1 713	17,4	vib. val. C=O non conjuguée
20	1 744	39,5	gr. ester
21	2 892	562,2	vib. val. C-H aromatique
22	3 444	477,3	vib. val.O-H; pont H intermoléculaire

Légende:

---: non-interprété

TABLEAU IX

Interprétation du spectre infrarouge de la lignine alcaline de
l'épinette noire, précipitée à l'acide sulfurique

No	Signaux observés		Interprétation
	(cm ⁻¹)	Trans (%)	
01	554	61,4	---
02	619	60,1	---
03	814	63,4	benzène tri-substitué 1,2,4
04	858	64,7	benzène trisubstitué: 1,2,4
05	1 038	22,6	gr. guaïacyle CH, COH
06	1 082	31,5	liaison éther aliphatique et groupement OH secondaire
07	1 127	30,9	C-H aromatiques dans le plan de déformation, type syringyle
08	1 220	28,1	respiration de l'anneaux guaïacyle avec vib. val. C-O
09	1 268	24,3	respiration de l'anneau guaïacyle avec vib. val. C-O
10	1 424	44,7	vib. val. C-C dans noyau aromatique
11	1 463	42,7	déformation C-H asym dans CH ₃
12	1 512	33,1	vib. val. C-C dans noyau aromatique
13	1 548	93,3	vib. val. C-C semi insaturée dans noyau aromatique
14	1 599	49,9	vib. squelette aromatique
15	1 659	63,2	vib. val. C-O conj.; (aldéhyde)
16	1 709	71,5	vib. val. carbonyle, cétone non conj.
17	1 723	74,1	vib. val. carbonyle, cétone non conj.
18	2 937	40,6	vib. val. C-H, CH ₃ sym.
19	3 439	17,7	vib. val. O-H; pont-H intermoléculaire

Légende:

---: non-interprété

3.4 Analyses spectroscopiques RMN

Depuis la dernière décennie, la technique de RMN à l'état solide du carbone-13 (CP/MAS) a été utilisée pour élucider la structure de plusieurs biopolymères des plantes. Plusieurs de ces polymères résistent encore à la caractérisation structurale par des méthodes chimiques et spectroscopiques en raison de leur très faible solubilité. Leur faible solubilité peut s'expliquer par des masses moléculaires élevées et une réticulation poussée. La RMN du carbone-13 a déjà donné beaucoup d'informations sur la chimie organique des biopolymères complexes, incluant le bois, la lignine, et les parois cellulaires des plantes. Un grand nombre de références sont données dans Preston & Rusk (1990) à ce sujet. Des études chimiques détaillées ont conduit à proposer une série de modèles, et les techniques de RMN du carbone-13 et du proton ^1H à l'état solide et en solution ont permis l'élucidation de la structure de la lignine. Cependant, toute l'interprétation des spectres RMN est basée sur la comparaison des déplacements chimiques de la résonance de la lignine avec ceux de composés modèles (Brunow, & Ede, 1992).

Afin d'obtenir plus d'information sur la structure moléculaire de la lignine alcaline de l'épinette noire, plusieurs analyses spectroscopiques de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été effectuées. Les spectres RMN du carbone-13 à l'état solide (CP/MAS) et RMN du carbone-13 et du proton ^1H en solution dans le DMSO- d_6 ont aussi été effectués.

Encore plus récemment, des techniques plus sophistiquées et informatives de RMN en 2 dimensions (RMN-2D) ont été appliquées avec succès à d'autres biomacromolécules importantes. Ces techniques ont été appliquées à la lignine dans quelques travaux (Lapierre *et al.*, 1987; Ede *et al.*, 1990).

Le grand nombre de liaisons interunités, la polydiversité, les hautes masses moléculaires et l'ampleur des bandes d'accompagnement, occasionnent le chevauchement de

plusieurs signaux de la lignine. De plus, l'ampleur des bandes de résonance des ^1H excède la grandeur du couplage scalaire en empêchant l'interprétation du spectre du proton. Aussi, il y a souvent une seule valeur de déplacement chimique δ pour les chaînes latérales des composés modèles qui peut être comparée avec la résonance de la lignine analysée conduisant à une interprétation des données spectrales qui peut être erronée (Brunow & Ede, 1992).

La spectroscopie RMN-2D est devenue la méthode de choix pour l'élucidation de la structure de biomolécules. Différentes techniques de RMN-2D ont été appliquées aux échantillons de lignine alcaline de l'épinette noire. Des techniques de spectroscopie homonucléaire du proton (^1H - ^1H) basées sur la corrélation des constantes de couplage tel que TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) et des techniques de relaxation croisée comme ROESY (Rotating Frame Overhauser spectroscopy) ont été appliquées sur les échantillons de lignine alcaline. Une expérience a aussi été tentée sur un spectre RMN 2D hétéronucléaire ^1H - ^{13}C de type HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation).

Les spectres RMN du carbone-13 ont été interprétés à l'aide d'une base de données contenant des déplacements chimiques tirés de plusieurs travaux antérieurs portant sur diverses lignines et molécules modèles synthétisées. Ce système informatique fait référence à tous les déplacements chimiques rapportés dans la littérature pour diverses lignines ou molécules modèles. Cette base de données permet de retrouver facilement des unités de bases spécifiques aux échantillons de lignine (Larouche & Hachey, 1993).

Afin de faciliter la lecture des résultats de l'interprétation des spectres RMN, ceux-ci seront présentés de la façon suivante: la première partie montre d'une façon générale les régions caractéristiques des déplacements chimiques des carbones-13 des groupements fonctionnels des lignines. Deuxièmement, les structures des molécules retrouvées dans la lignine alcaline de l'épinette noire qui ont pu être obtenues suite à l'interprétation des spectres RMN et des spectres de masse par bombardement d'atomes rapides (FAB/ms) sont regroupés

dans des tableaux avec la masse moléculaire du fragment et les déplacements chimiques de chaque carbone de la molécule.

3.4.1. Distribution des groupements fonctionnels des lignines

Les polymères de lignine contiennent plusieurs groupements fonctionnels caractéristiques. Des déplacements chimiques spécifiques reliés aux carbones de ces groupements se retrouvent dans une région du spectre variant de 0 à 200ppm. Dans la littérature, les spectres RMN¹³C de la lignine sont généralement divisés en 7 régions se différenciant par la nature des carbones retrouvés dans la molécule.

Les régions sélectionnées sont divisées comme suit: la région des aldéhydes et cétones (203 à 184 ppm); les acides carboxyliques (183 à 159ppm); les carbones aromatiques quaternaires (158 à 125ppm); les carbones aromatiques tertiaires (124 à 107ppm); les carbones aliphatiques tertiaires oxygénés (106 à 58ppm); les groupements méthoxyles reliés aux carbones aromatiques (57 à 54,5ppm) et finalement , les carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés comprenant les carbones de type β (<54.5ppm) dans les unités β -5 et les unités β - β' . Cette compilation des groupements fonctionnels est basée sur les études antérieures de Sjöholm *et al.*, (1992), et de Robert & Chen, (1989).

3.4.2 Spectres RMN ^{13}C à l'état solide (CP/MAS)

La figure 13 montre les spectres RMN ^{13}C à l'état solide (CP/MAS) de la lignine alcaline, du bois sans extractibles et du bois brut de l'épinette noire. La superposition de ces spectres permet de constater les différences de résonance dues à la présence de cellulose et hémicellulose dans les échantillons de bois brut. D'une façon générale, on remarque que les groupements aromatiques (158 à 107ppm) sont beaucoup plus intenses dans le spectre de la lignine alcaline que dans celui du bois brut et pré-extrait. Ceci est dû au fait que les échantillons de bois brut et sans extractibles contiennent, en plus de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses qui par leur présence, diminuent l'intensité relative des groupements aromatiques par rapport à l'ensemble des déplacements chimiques détectés. De la même manière, le groupement méthoxyle caractérisant l'unité de base de la lignine de conifère est caractérisé par un pic apparaissant près de 55ppm. Comparativement aux échantillons de bois brut et sans extractibles la résonance des carbones des groupements méthoxyyles sur l'anneau aromatique guaiacyle est beaucoup plus importante dans le spectre de la lignine, ceci toujours en raison de la présence de cellulose et d'hémicelluloses dans les échantillons de bois brut et sans extractibles.

Les tableaux présentés dans l'annexe 1 montrent une interprétation détaillée du spectre RMN ^{13}C (CP/MAS) de la lignine alcaline de l'épinette noire précipitée à l'acide sulfurique. Les unités monomériques et dimériques de lignine retrouvées d'après l'interprétation du spectre RMN ^{13}C (CP/MAS) et par FAB/MS ont été comparées à la littérature afin de développer certains modèles de base comprenant plusieurs unités. Les structures retenues ont été choisies lorsque tous les déplacements chimiques trouvés expérimentalement étaient identiques à ceux des modèles de la littérature, ceci à $\pm 0,5\text{ppm}$. Chaque carbone situé sur le noyau aromatique ou sur la chaîne latérale possède un déplacement chimique qui lui est

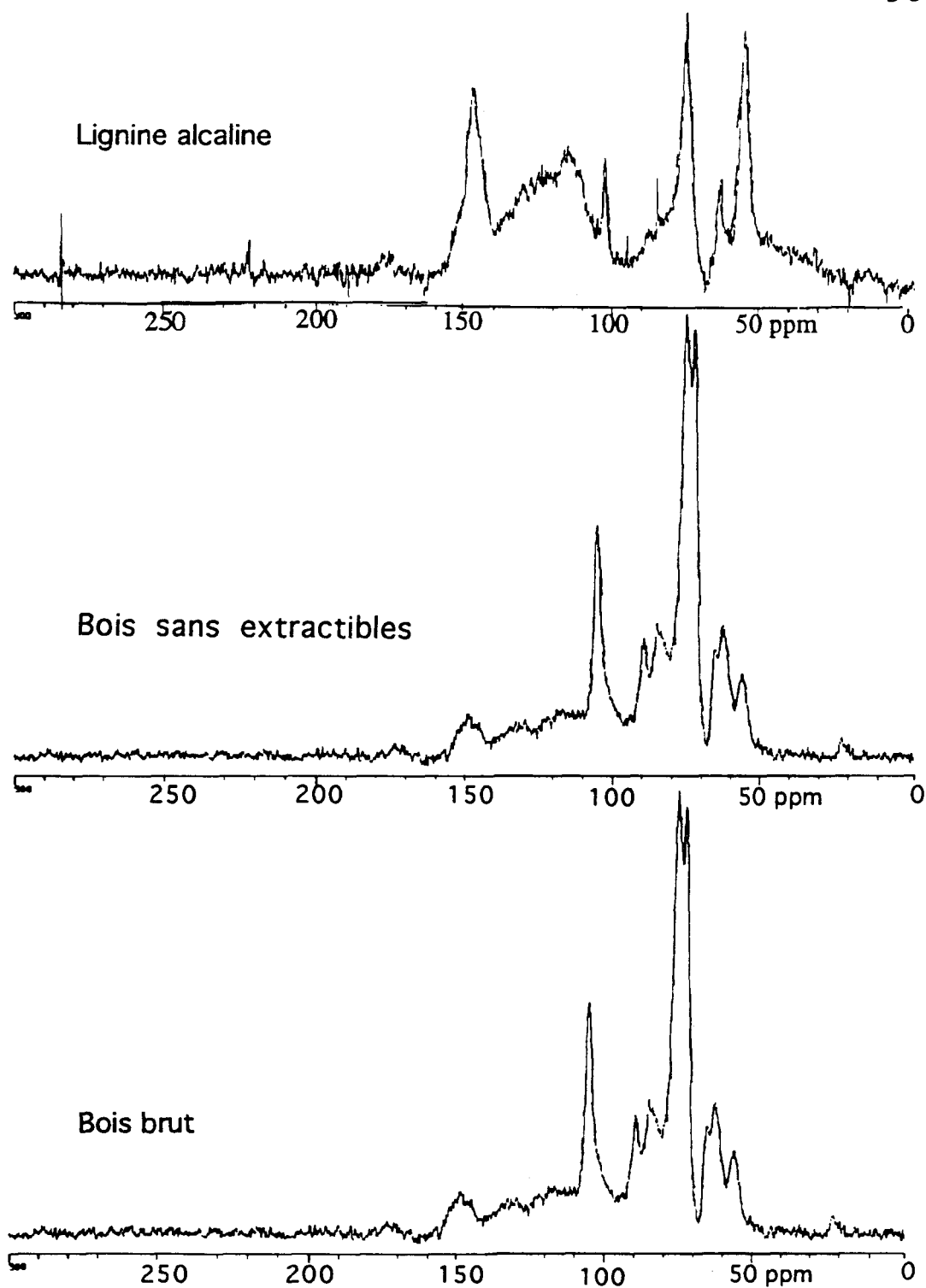
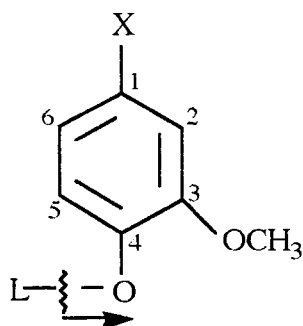


Figure 13 Comparaison des spectres RMN du carbone-13 à l'état solide du bois brut, du bois sans extractibles et de la lignine alcaline de l'épinette noire.

propre selon son environnement. L'interprétation du spectre RMN¹³C à l'état solide de la lignine alcaline de l'épinette noire permet de proposer certaines structures moléculaires en se basant sur les travaux antérieurs. Les déplacements chimiques des carbones des structures modèles de lignine publiés par Kringstad et Mörk (1983) permettent de constater la présence des unités de base de la lignine de conifères soient les unités monomériques de type guaiacyle, ces monomères sont présentés au tableau X avec les déplacements chimiques observés pour chacun des carbones sur le spectre RMN¹³C de la lignine alcaline de l'épinette noire. Les données publiés par Kringstad et Mörk (1983) permettent de proposer différentes structures de types β -O-4' qui sont présentées au tableau XI. Un grand nombre de structures ayant des liaisons interunités β -O-4' sont retrouvées dans les échantillons de lignine ce qui est normal puisque ce type de liaison représente 60% de toutes les liaisons interunitées de la lignine (Higuchi, 1985). D'autres structures dimériques de type coumarane ont aussi été proposées comme étant des constituantes de la lignine alcaline de l'épinette noire, ceci toujours en comparant les données expérimentales avec celles présentées dans les travaux antérieurs (Kringstad, 1983; Ede, 1991; Watanabe, 1988). Les tableaux X à XII montrent les structures des principales unités de guaiacyles avec leurs déplacements chimiques ainsi que les masses moléculaires correspondantes qui sont confirmées par le spectre de masse par bombardement atomes rapides (FAB/MS). L'attribution des déplacements chimiques est faite en référence aux résultats publiés antérieurement (Kringstad, 1983; Ede, 1991; Watanabe, 1988; Fukagawa, 1991 et 1992; Lapierre, 1987; Sjöholm, 1992; Eviliya, 1989; Robert, 1989).

TABLEAU X

Structures monomériques issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectres RMN du carbone-13 à l'état solide (CP/MAS) et spectre de masse (FAB/MS)

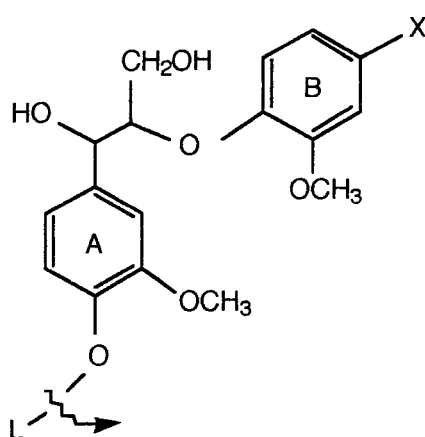


Variation du X	FAB/MS	RMN du carbone-13 (ppm)					
	m/z	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
CH ₂ OH	153	133,9	111,3	146,3	145,3	115,3	119,4
COOH	167	124,3	114,1	148,2	151,3	115,3	122,3
CHOHCH ₃	167	138,6	110,2	147,3	145,3	115,3	118,6
CH ₂ CH ₂ OH	167	130,9	114,1	147,3	145,3	115,3	121,2
CH ₂ CH ₂ CH ₃	165	133,5	111,7	143,7	145,3	133,9	116,6
CH ₂ COOH	181	126,2	114,4	147,7	145,7	115,7	122,0

Les valeurs des déplacements chimiques (ppm) sont observées sur les spectres RMN et correspondent à celles répertoriées par Kringstad et Mörk (1983)

TABLEAU XI

Structures dimériques de type β -O-4' issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectres RMN du carbone-13 à l'état solide (CP/MAS) et spectre de masse FAB/MS



Noyaux	Substituants X	C- α	C- β	C- γ	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	m/z
A	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	71,8	85,2	60,7	133,6	111,9	147,1	145,8	114,8	119,7	
B	H	-	-	-	122,0	113,3	149,3	149,9	117,2	121,1	319
B	-CH=CH-CHO	151,7	127,5	192,1	129,3	112,6	149,3	150,6	117,2	122,5	373
B	-CH=CH-COOH	145,0	116,1	167,7	126,7	111,9	149,3	149,3	116,1	122,0	389
B	-CH ₂ CH=CH ₂	39,3	138,2	114,8	130,9	113,3	147,1	145,4	115,8	120,3	359
B	-CH=CH-CH ₃	131,6	122,4	18,2	130,0	111,0	149,3	146,2	116,1	119,0	359

Les valeurs des déplacements chimiques (ppm) sont observées sur les spectres RMN et correspondent à celles répertoriées par Kringstad et Mörk (1983)

TABLEAU XI (suite)

Structures dimériques de type B-O-4' issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectres RMN du carbone-13 à l'état solide (CP/MAS) et spectre de masse FAB/MS

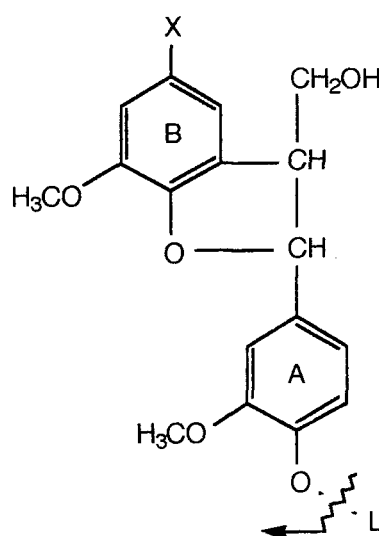
Noyaux	Substituants X	C- α	C- β	C- γ	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	m/z
B	-CH=CH-CH ₂ OH	129,3	127,7	63,3	129,3	111,0	147,1	146,2	115,8	119,7	375
B	-CH ₂ -CH ₂ OH	38,5	63,3	-	130,9	114,1	147,1	145,0	115,8	122,1	363
B	-CH ₂ -CO ₂ H; ne	40,3	172,6	-	126,2	114,8	147,1	145,8	115,8	122,0	377
B	-CH ₂ -CO ₂ H; e	40,9	173,9	-	128,4	113,3	149,3	149,7	114,8	122,5	377
B	-CHOH-CO ₂ H	71,8	174,4	-	131,7	111,9	147,1	146,2	115,8	119,7	393
B	-CHOH-CH ₃ ; ne	68,1	25,3	-	139,0	111,0	147,6	145,7	115,8	118,1	363
B	-CO-CH ₃ ; ne	196,3	25,9	-	130,0	112,6	147,1	152,0	115,8	122,4	361
B	-CO-CH ₃ ; e	196,3	25,0	-	130,9	111,9	149,7	154,0	111,9	122,7	361
B	-CH ₂ OH; ne	63,5	-	-	133,6	111,9	147,1	145,8	115,8	119,7	349
B	-CH ₂ OH; e	63,5	-	-	136,4	112,6	147,1	150,1	115,8	119,0	349
B	-CHO; ne	190,4	-	-	129,3	112,6	149,3	153,0	115,8	125,6	347
B	-CHO; e	192,1	-	-	130,6	116,3	150,1	155,2	112,6	126,2	347
B	-CO ₂ H	167,7	-	-	124,0	114,1	147,1	151,7	115,8	122,5	363
B	-CH ₃ ; ne	20,6	-	-	128,4	114,5	147,1	145,0	115,9	121,1	333

ne = non étherifié en position 4

e = étherifié en position 4

TABLEAU XII

Structures dimériques de type β -5' (phénylcoumaranes) issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectres RMN du carbone-13 à l'état solide (CP/MAS) et spectre de masse (FAB/MS)



Noyaux	Substituants X	C- α	C- β	C- γ	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	m/z
A	C ₁₀ H ₁₁ O ₃	92,7	45,3	18,2	135,8	113,3	149,7	149,7	114,1	119,0	300
B	-H	-	-	-	131,0	110,8	147,8	147,8	115,4	119,5	301
B	-CH ₃	20,6	-	-	121,3	112,2	144,0	147,0	133,2	115,9	315
B	-CH=CHCHO	149,9	126,5	192,2	129,6	112,3	145,4	149,3	126,5	119,1	355
B	-CH ₂ CH ₃	28,3	15,7	-	121,4	112,2	144,1	147,1	133,3	116,0	329
B	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	37,4	24,2	13,2	133,5	111,6	143,9	145,8	133,6	116,1	343
B	-CH=CHCH ₃	132,4	122,8	18,2	131,6	111,3	143,9	147,8	131,6	112,3	341

Les valeurs des déplacements chimiques (ppm) sont observées sur les spectres RMN et correspondent à celles répertoriées par Kringstad, 1983; Ede, 1991; Watanabe, 1988

3.4.3 Spectre RMN ^{13}C en solution dans le DMSO-d6

Comme la méthode d'extraction de la lignine alcaline permet d'obtenir une lignine légèrement soluble, les spectres RMN en solution dans le DMSO-d6 ont pu être effectués. Cependant, les spectres RMN des bois bruts et sans extractibles, n'ont pas été effectués en raison de l'insolubilité de ces échantillons. Alors, ici s'arrête la comparaison des échantillons de lignine avec les bois bruts et sans extractible. Les résultats des spectres RMN en solution confirment ceux obtenus en RMN ^{13}C (CP/MAS) et apportent plus de précision et de nouvelles structures possibles. La figure 14 présente le spectre RMN ^{13}C en solution dans le DMSO-d6 de la lignine alcaline de l'épinette noire. Les structures obtenues suite à la comparaison de ces données expérimentales avec la littérature nous permettent de confirmer la présence des dimères de lignine présentés aux tableaux XIII à XV

L'interprétation des déplacements chimiques présentée au tableau XIII est basée sur les résultats antérieurs (Kringstad, 1983) appliqués à des molécules modèles de lignine. On remarque une grande diversité d'unités dimériques de type $\beta\text{-O-4'}$. Ceci était très prévisible puisque ce type de liaison représente 40 à 60% de toutes les liaisons interunités dans la lignine de conifère (Higuchi, 1985). Les structures de type $\beta\text{-O-4'}$ déterminées pour la lignine alcaline de l'épinette noire possèdent toutes le même squelette d'unités guaiacyles reliées entre elles par des liaisons $\beta\text{-O-4'}$. Les différences se situent au niveau des substituants du noyau B qui porte des fonctions variées telles: alcool, acide, aldéhyde et cétone.

L'interprétation du spectre RMN ^{13}C en solution permet aussi de constater la présence d'unités dimériques de type coumarane et résinol. L'interprétation des déplacements chimiques basée sur les résultats antérieurs (Kringstad, 1983; Watanabe, 1988; Ede, 1991) sont présentés aux tableaux XIV et XV.

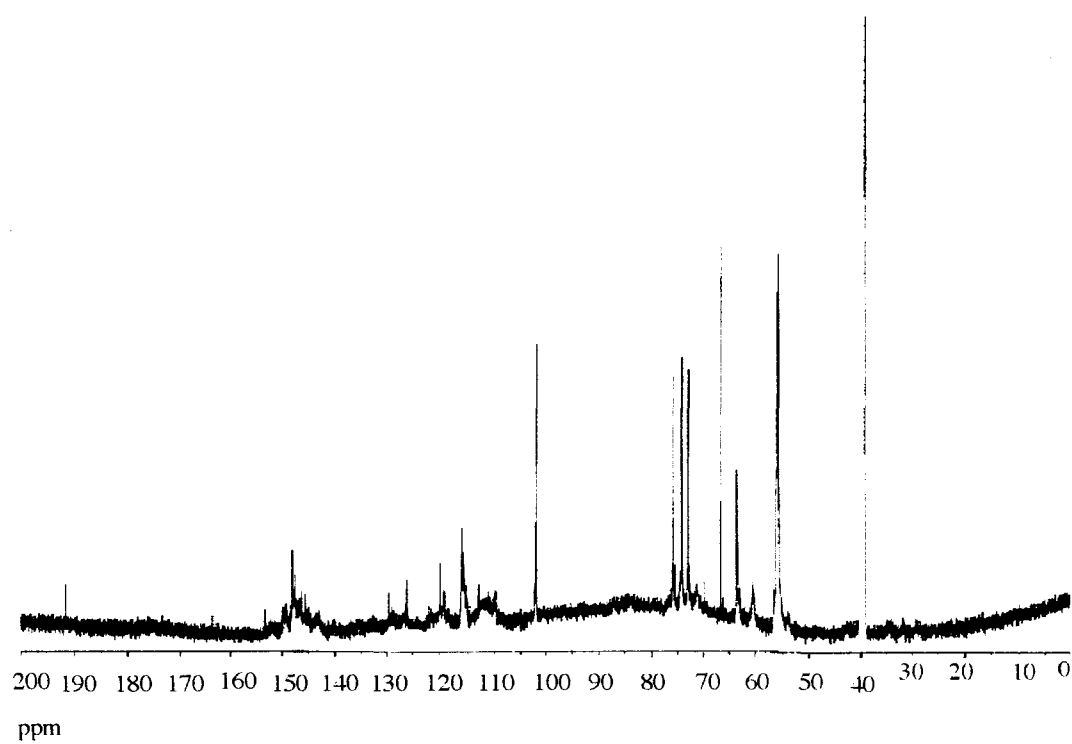
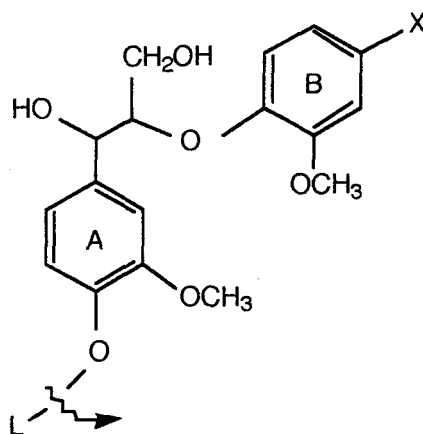


Figure 14 Spectre RMN du ^{13}C en solution dans le DMSO-d_6 de la lignine alcaline de l'épinette noire.

TABLEAU XIII

Structures dimériques (liaisons interunités B-O-4') issues de la lignine alcaline de l'épinette
noire. Spectres RMN carbone-13 en solution dans DMSO-d6 et FAB/MS



Noyau	Substituants X	C- α	C- β	C- γ	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	m/z
A	HOCH ₂ CH(OAr)CHOH	71,7	84,5	60,6	129,6	111,7	147,1	145,7	115,0	119,4	
B	H-	-	-	-	122,0	113,3	149,3	149,9	117,2	121,1	319
B	-CH=CH-CHO	151,7	127,5	192,1	129,3	112,6	14,3	150,6	117,2	122,5	373
B	-CH=CH-COOH	145,0	116,1	167,7	126,7	111,9	149,3	149,9	116,1	122,0	389
B	CH ₂ CH=CH ₂	39,3	138,2	114,8	130,9	113,3	147,1	145,4	115,8	120,3	359
B	-CH=CH-CH ₃	129,6	122,0	17,8	129,6	110,7	148,2	146,4	116,0	119,4	359
B	CH=CH-CH ₂ OH	129,3	127,7	63,3	129,3	111,0	147,1	146,2	115,8	119,7	375

Les valeurs des déplacements chimiques (ppm) sont observées sur les spectres RMN et correspondent à celles répertoriées par Kringstad, 1983

TABLEAU XIII (suite)

Structures dimériques (liaisons interunités β -O-4') issues de la lignine alcaline de l'épinette
noire. Spectres RMN carbone-13 en solution dans DMSO-d₆ et FAB/MS

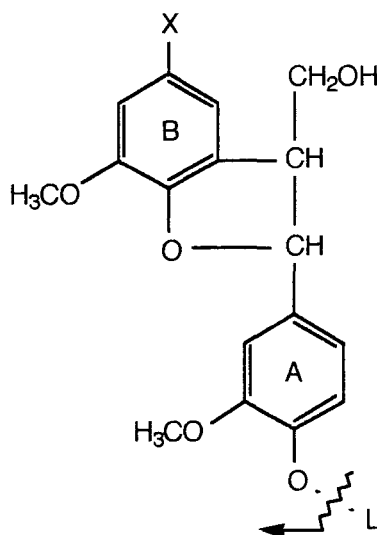
Noyaux	Substituants X	C- α	C- β	C- γ	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	m z
B	-CH ₂ CH ₃	29,3	15,9	-	135,2	112,9	147,1	145,4	116,1	120,1	347
B	-CH ₂ -CH ₂ OH	39,23	62,9	-	129,5	114,9	148,1	145,4	115,8	122,0	363
B	-CH ₂ -CO ₂ H; ne	40,7	170,0	-	126,2	114,9	147,6	145,7	115,6	122,0	376
B	-CH ₂ -CO ₂ H; e	40,7	173,9	-	129,1	112,9	148,5	149,9	114,9	122,5	376
B	-CHOH-CO ₂ H	72,4	174,0	-	129,6	111,8	147,6	146,4	115,6	119,7	393
B	-CHOH-CH ₃ ; ne	69,3	24,8	-	138,9	110,7	147,6	145,7	115,6	119,1	363
B	-CO-CH ₃ ; ne	196,3	24,8	-	129,6	112,3	147,8	152,0	115,6	122,0	361
B	-CO-CH ₃ ; e	196,3	24,8	-	129,6	111,9	149,5	154,2	112,0	122,0	361
B	-CH ₂ OH; ne	63,6	-	-	129,6	112,3	147,8	145,7	115,6	119,7	349
B	-CH ₂ OH; e	63,6	-	-	136,0	112,6	147,4	149,9	115,6	119,4	349
B	-CHO; ne	191,0	-	-	129,6	112,3	148,5	149,9	115,8	126,2	347
B	-CHO; e	191,6	-	-	129,6	111,6	149,9	149,9	114,9	126,2	347
B	-CO ₂ H	168,0	-	-	124,0	112,1	148,5	151,9	115,8	126,2	363
B	-CH ₃ ; ne	20,1	-	-	128,3	114,1	147,8	145,1	115,9	121,6	333

ne = non étherifié en position 4

e = étherifié en position 4

TABLEAU XIV

Structures dimériques (liaisons interunités coumaranes β -5') issues de la lignine alcaline de l'épinette noire. Spectres RMN carbone-13 en solution dans DMSO-d6 et FAB/MS

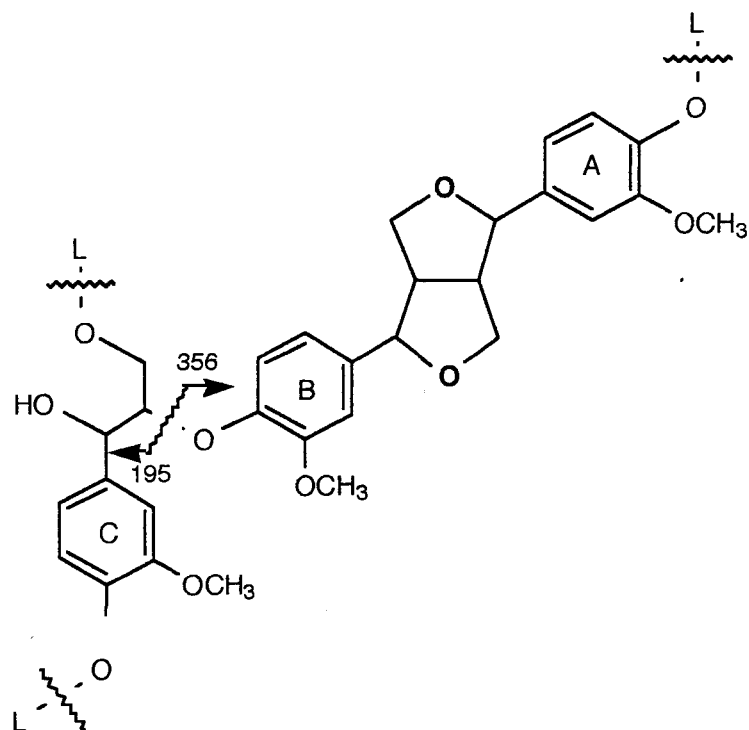


Noyaux	Substituants X	C- α	C- β	C- γ	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	m z
A	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	84,6	54,0	62,9	130,0	112,6	148,1	147,6	115,1	119,1	
B	-H	-	-	-	129,6	111,1	143,0	147,2	129,6	115,1	301
B	-CH=CH-CHO	149,9	126,5	191,6	129,6	112,3	145,4	149,2	126,5	119,1	355
B	-CH=CH-CH ₃	132,4	122,0	18,1	129,6	111,1	143,0	148,1	131,3	112,9	341
B	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	37,4	24,8	13,5	133,5	111,6	143,8	145,8	133,6	116,0	343
B	-CH=CH-COOH	144,9	116,1	168,3	126,5	112,3	148,2	149,4	116,1	122,0	371

Les valeurs des déplacements chimiques (ppm) sont observées sur les spectres RMN et correspondent à celles répertoriées par Kringstad, 1983; Ede, 1991; Watanabe, 1988

TABLEAU XV

Structures trimériques (liaisons interunités β -O-4' et résinols (β - β')) issues de la lignine
 alcaline de l'épinette noire. Spectres RMN carbone-13
 en solution dans DMSO-d₆ et FAB/MS



Noyaux	C- α	C- β	C- γ	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	m/z
A,B	≈ 84	≈ 54	≈ 71	≈ 130	≈ 112	≈ 148	≈ 147	≈ 115	≈ 119	356
C	71,8	84,5	60,6	133,1	117,8	147,2	145,7	115,1	119,4	551

En reliant les dimères obtenus par RMN, il est possible de déterminer des structures plus complexes ayant des masses moléculaires plus élevées. Les masses moléculaires de ces structures sont évidemment confirmées par le spectre de masse. Ainsi, les structures proposées aux figures 15, 16 et 17 seraient des fragments plus importants, présents dans la lignine alcaline de l'épinette noire.

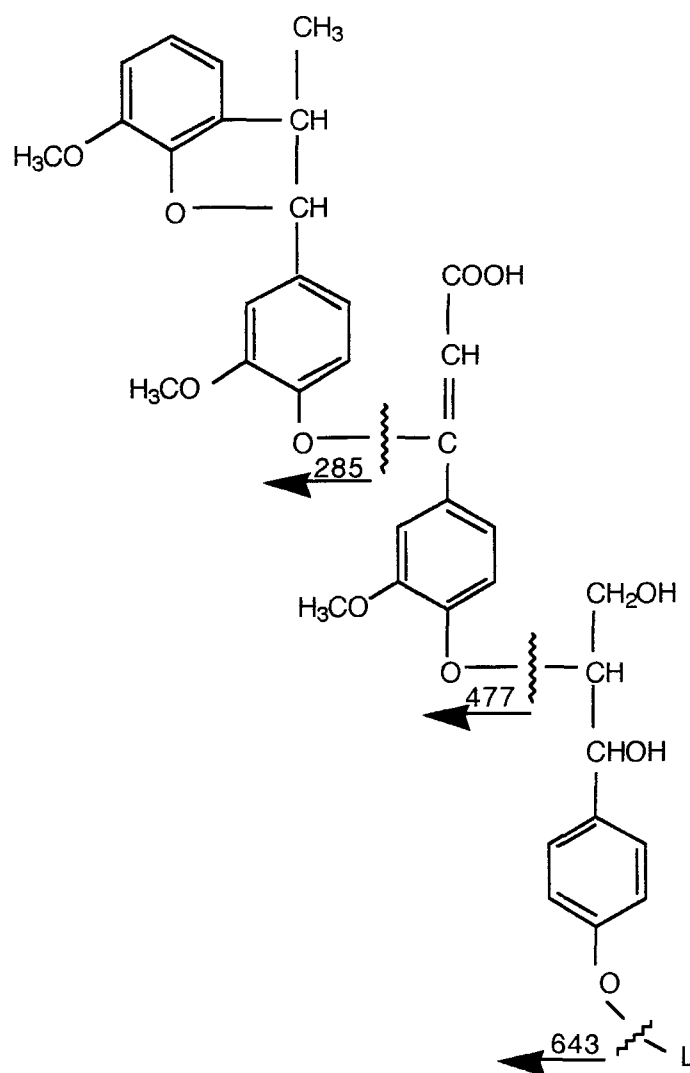


Figure 15 Fragment de quatre (4) unités de type β -O-4' et β -5' de masse moléculaire égale à 643.

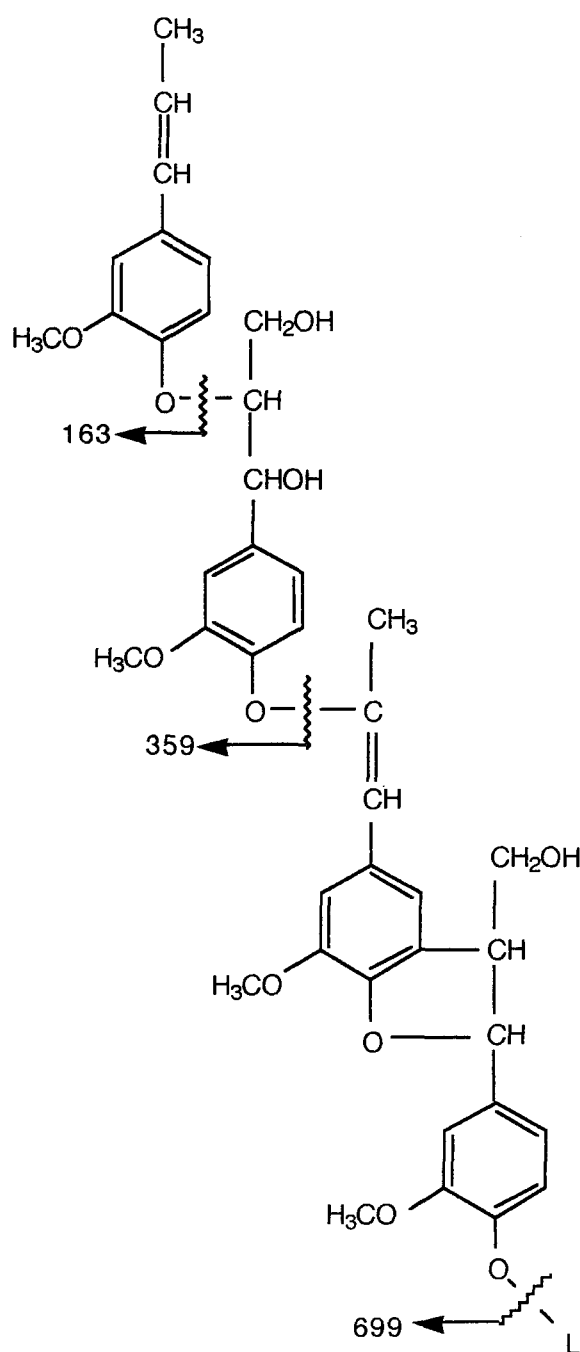


Figure 16 Fragment de quatre(4) unités de type β -O-4' et β -5' de masse moléculaire égale à 699.

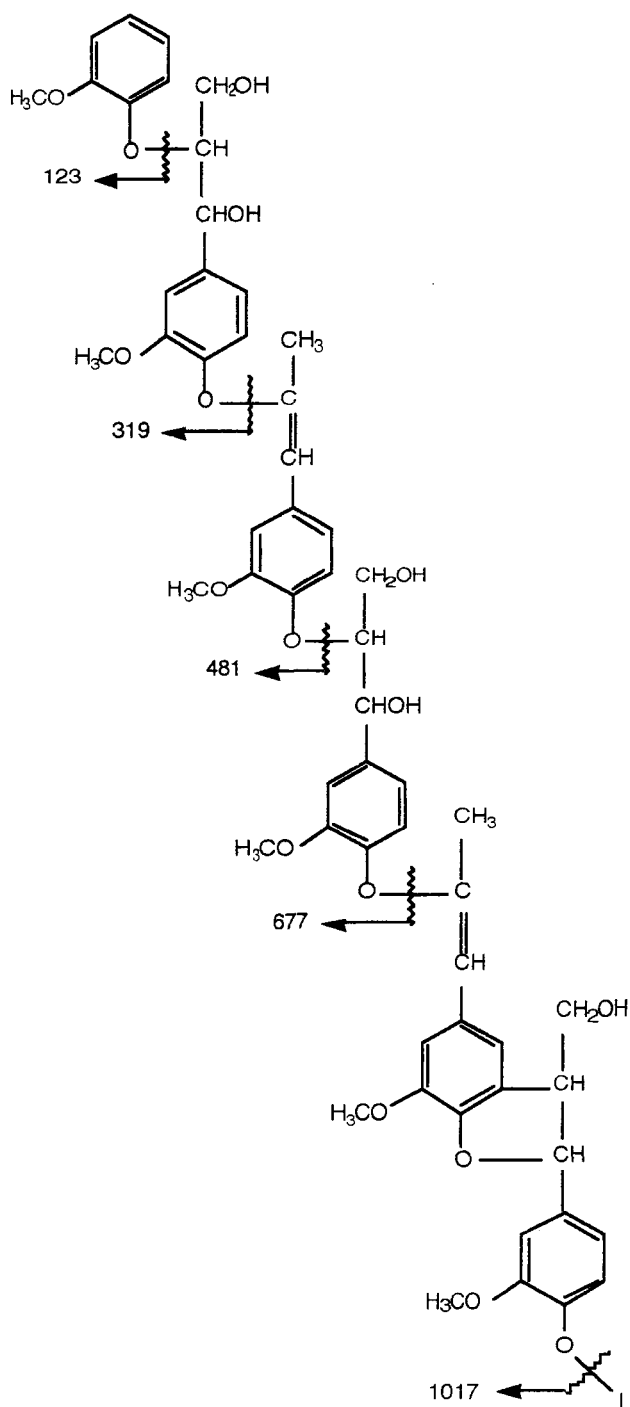


Figure17: Fragment de six (6) unités de type β -O-4' et β -5' de masse moléculaire égale à 1017.

3.4.4 Spectre RMN ^1H en solution dans le DMSO- d_6

Des analyses de RMN ^1H ont été effectuées sur les échantillons de lignine soluble. La figure 18 présente le spectre RMN ^1H en solution dans le DMSO- d_6 de la lignine alcaline de l'épinette noire précipitée par l'acide sulfurique.

Le spectre RMN du proton en solution nous permet de confirmer la présence des unités guaiacyles puisque tous les protons attachés au noyau aromatique des monomères de guaiacyles présentent des déplacements chimiques en accord avec ceux déjà cités dans la littérature (Ede, 1992; Fukagawa, 1991). Les protons présents sur les carbones 2, 5 et 6 des unités guaiacyles présentent des pics de résonance à 6,96, 6,63 et 6,88ppm.

La présence des unités dimériques $\beta\text{-O-4'}$ est aussi confirmée dans le spectre du proton par les hydrogènes situés sur les carbones α , β et γ de la chaîne latérale des unités $\beta\text{-O-4'}$. Ces protons apparaissent respectivement à 4,88, 4,37 et 3,41ppm. La comparaison des données expérimentales avec celles de la littérature (Ede, 1992; Fukagawa, 1991) nous permet de confirmer la présence de différentes structures modèles déjà caractérisées. Ces structures sont dessinées à la figure 19. Le tableau XVI présente une interprétation plus détaillée du spectre RMN du proton de la lignine alcaline de l'épinette noire en solution dans le DMSO- d_6 . Cette interprétation est une comparaison des données expérimentales obtenues avec celles déjà citées dans les travaux antérieurs (Ede, 1992; Fukagawa, 1991)

La faible quantité d'information déjà publiée sur le sujet limite beaucoup l'interprétation des spectres des lignines en solution. Cependant il est intéressant de constater que certaines parties du polymère peuvent être caractérisées par les différentes techniques et se confirment avec tous les types de spectre.

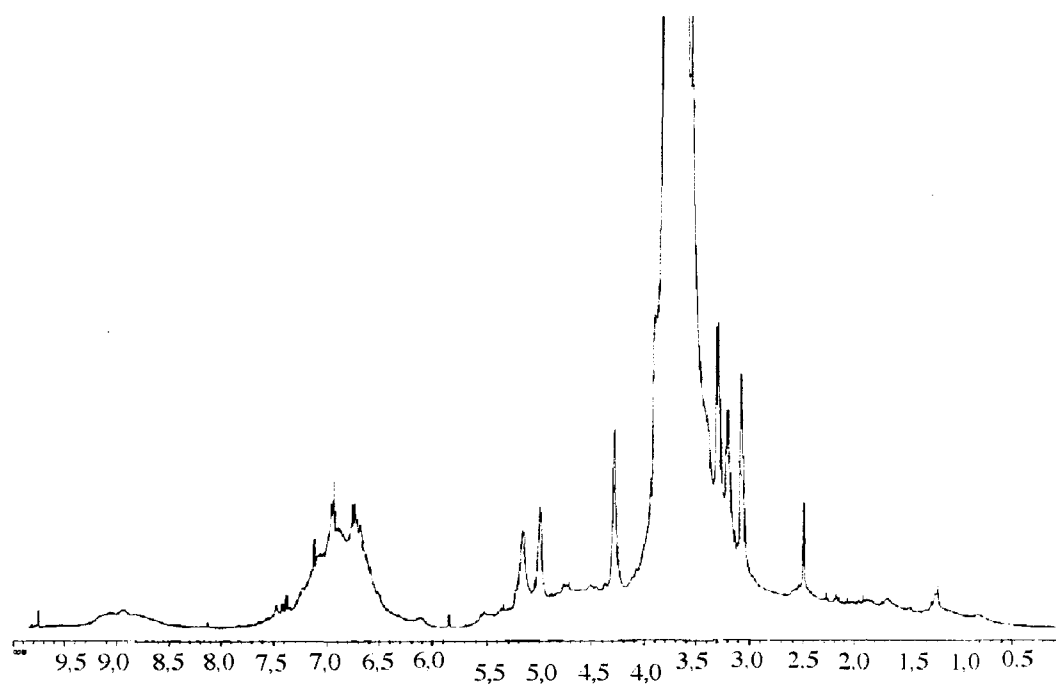
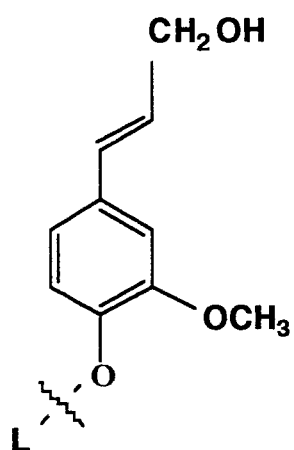


Figure 18 Spectre RMN ^1H en solution dans le $\text{DMSO}-d_6$ de la lignine alcaline de l'épinette noire.



a) Trans-coniférol

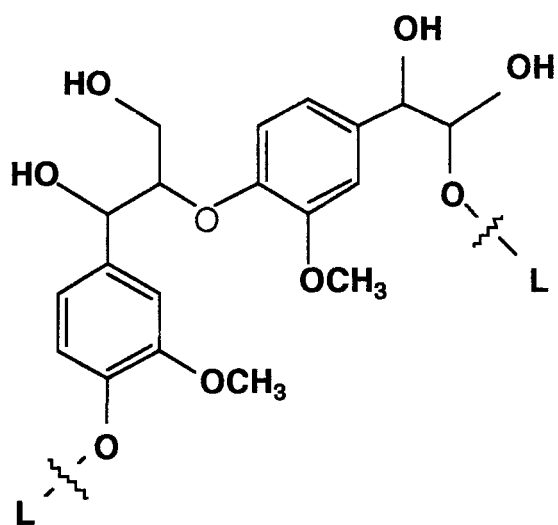
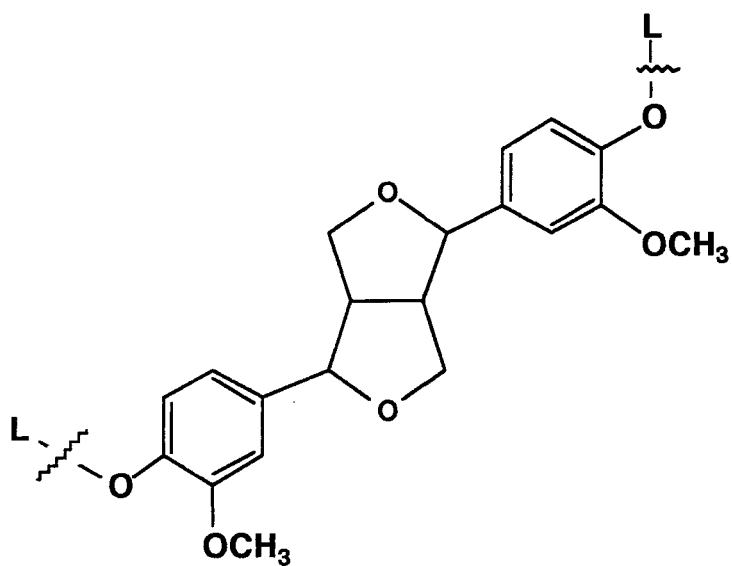
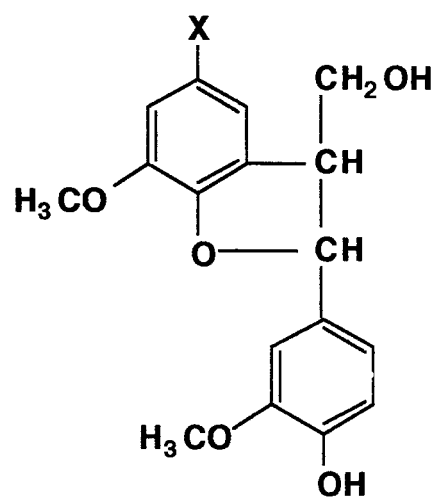
b) Éther guaiacylglycérol
(B-O-4)c) Structure de type résinol
(B-B')d) structure de type coumarane
(B-5')

Figure 19 Structures confirmées par le spectre RMN ^1H en solution de la lignine alcaline de l'épinette noire.

TABLEAU XVI

Spectre RMN ^1H de la lignine alcaline de l'épinette noire

No	Dépl. chim. (ppm)	Intensité	Interprétation
1	9,75	0,65	H aldéhydique
2	7,55	0,34	H-2 du biphényle, H- α coniféraldéhyde
3	7,41	0,88	H- β coniféraldéhyde
4	7,38	1,19	H aromatique
5	7,35	0,76	H aromatique
6	7,24	1,50	H aromatique
7	7,23	1,49	H aromatique
8	7,21	1,58	H aromatiques en para X, X = , COR, OH, OR
9	7,09	2,71	OH phénol
10	6,96	4,73	H-2 guaïacyle
11	6,95	4,85	H-2 guaïacyle
12	6,94	5,58	H-2 guaïacyle
13	6,91	3,81	H-2 guaïacyle
14	6,88	3,73	H-6 guaïacyle
15	6,72	4,13	H- β coniféraldéhyde
16	6,69	3,89	H-2-6 syringyle
17	6,64	2,92	H- α coniféraldéhyde
18	6,63	2,78	H-5 guaïacyle
19	6,51	1,31	H- α coniférol
20	6,11	0,38	H- β coniférol
21	6,09	0,32	H- α pinorésinol
22	5,84	0,42	CH dans $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}-\text{X}$, X = CHO, COOH, COOCH ₃ , OCOCH ₃ , Phényl
23	5,53	0,56	H- α phénylcoumarane
24	5,38	0,63	CH ₂ dans $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{X}$, X = CHO, COOH, COOCH ₃ , OCOCH ₃ , Phényl

TABLEAU XVI (suite)

Spectre RMN ^1H de la lignine alcaline l'épinette noire

No	Dépl, chim, (ppm)	Intensité	Interprétation
25	5,23	1,44	CH dans $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_3$
26	5,00	4,71	$\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$, R = alkyle
27	4,88	1,26	H- α unité β -O-4'
28	4,83	1,33	H- α résinol
29	4,72	1,76	H- γ et H- β structure coniférol
30	4,65	1,42	H- β unité β -O-4'
31	4,51	1,59	H- α et β dans éther cyclique insaturés $\alpha\beta$
32	4,49	1,57	H-1 des carbohydrates
33	4,45	1,55	H- γ phénylcoumarane
34	4,37	1,68	H- β unité β -O-4'
35	4,29	7,44	H- γ phénylcoumarane
36	4,28	7,56	H- γ pinorésinol (diastéréoisomère) et résinol
37	4,24	2,41	H- γ équatorial pinorésinol, H- γ résinol diastéréoisomère
38	4,11	1,93	H- γ pinorésinol (diastéréoisomère), H- γ structure #8
39	4,08	2,24	H- γ β -O-4' diastéréoisomère
40	3,89	13,10	H- γ pinorésinol axial
41	3,82	24,05	H-1 carbohydrates équatorial
42	3,81	31,85	R-O- CH_3 (R = alkyle)
43	3,69	102,84	H- β phénylcoumarane
44	3,53	20,85	H- β phénylcoumarane
45	3,41	8,44	H- γ β -O-4'
46	3,40	8,16	$\text{CH}_3\text{-X}$, X = OH, OR, OCOR, OCOPh
47	3,29	11,70	H-5 carbohydrates axial

TABLEAU XVI (suite)

Interprétation du spectre RMN ^1H de la lignine alcaline de l'épinette noire

No	Dépl, chim, (ppm)	Intensité	Interprétation
48	3,12	3,21	H-2 carbohydrates
49	3,11	3,19	H- β résinol
50	3,03	3,12	H- β pinorésinol
51	2,97	1,99	H sur carbone alcynique
52	2,56	1,48	CH ₂ dans CH ₂ CH ₂ -Ph, Ph-CH ₂ CH ₂ -Ph, (CH ₃) ₂ CH-Ph
53	2,54	1,60	>CH-X, X= CHO, COR, CPh, COOH, COOR
54	2,47	1,75	CH ₃ -X, X= CHO, COR, CPh, COOH, COOR
55	2,38	1,21	CH ₃ dans CH ₃ -Ph
56	2,29	1,09	R-(C=O-CH ₃), R = alkyle
57	2,20	1,05	CH ₂ -X, X= CHO, COR, CPh, COOH, COOR
58	2,16	1,16	CH ₂ dans CH ₂ -CO-
59	2,02	1,02	R ₃ CH, R = alkyle
60	1,95	1,04	H- β coniférol
61	1,90	1,40	CH ₃ dans les groupements acétyles
62	1,87	1,06	CH ₃ dans CH ₂ =C(CH ₃)X, X= CHO, COR, CPh, COOH, COOR
63	1,72	0,96	CH ₃ dans CH ₂ C(CH ₃) ₂
64	1,67	1,09	CH ₂ chaîne aliphatique
65	1,46	0,80	CH ₂ chaîne aliphatique
66	1,22	1,29	CH ₂ dans CH ₃ CH ₂
67	1,19	1,63	CH ₂ chaîne aliphatique
68	1,05	0,64	CH ₂ chaîne aliphatique

3.4.5. Spectre HMQC de la lignine alcaline de l'épinette noire

Les expériences HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Transfert) sont utiles pour les études structurales de la lignine. Dans les études de spectroscopie en une dimension, les pics dérivés de deux structures diastéréoisomères, *erythro* et *threo* β -O-4' ne sont pas discernables. La sensibilité utilisée sous les conditions HMQC est suffisamment élevée pour permettre de définir les structures des chaînes latérales principales.

Les spectres HMQC se divisent en deux grandes régions. La région des groupements des chaînes latérales aliphatiques qui sont comprises entre 50 et 100ppm pour le ^{13}C et 2 à 6ppm pour le ^1H . La région des groupements aromatiques se trouve comprise entre 100 et 150ppm pour le ^{13}C et 6 à 9ppm pour le ^1H (Fukagawa & Meshitska, 1991).

Le spectre HMQC présenté à la figure 20 nous permet de confirmer la présence des liaisons interunités β -O-4'. En comparant nos données expérimentales avec celles de la littérature, plus particulièrement celles de Fukagawa (1991), on constate que les carbones α , β et γ de la chaîne latérale du dimère β -O-4' sont présents dans nos échantillons et sont représentés sur le spectre HMQC par de nombreuses taches de corrélation. Les carbones β sont représentés par les connectivités 16 à 18, les carbone α par les connectivités 19 à 23 et les carbones γ par les connectivités 32 et 33. Les autres types de liaisons retrouvées dans la lignine comme celles de type coumarane, résinol et biphényle, sont confirmés dans le spectre HMQC par des connectivités ^1H - ^{13}C correspondantes (voir tableau XVII pour une interprétation détaillée du spectre HMQC).

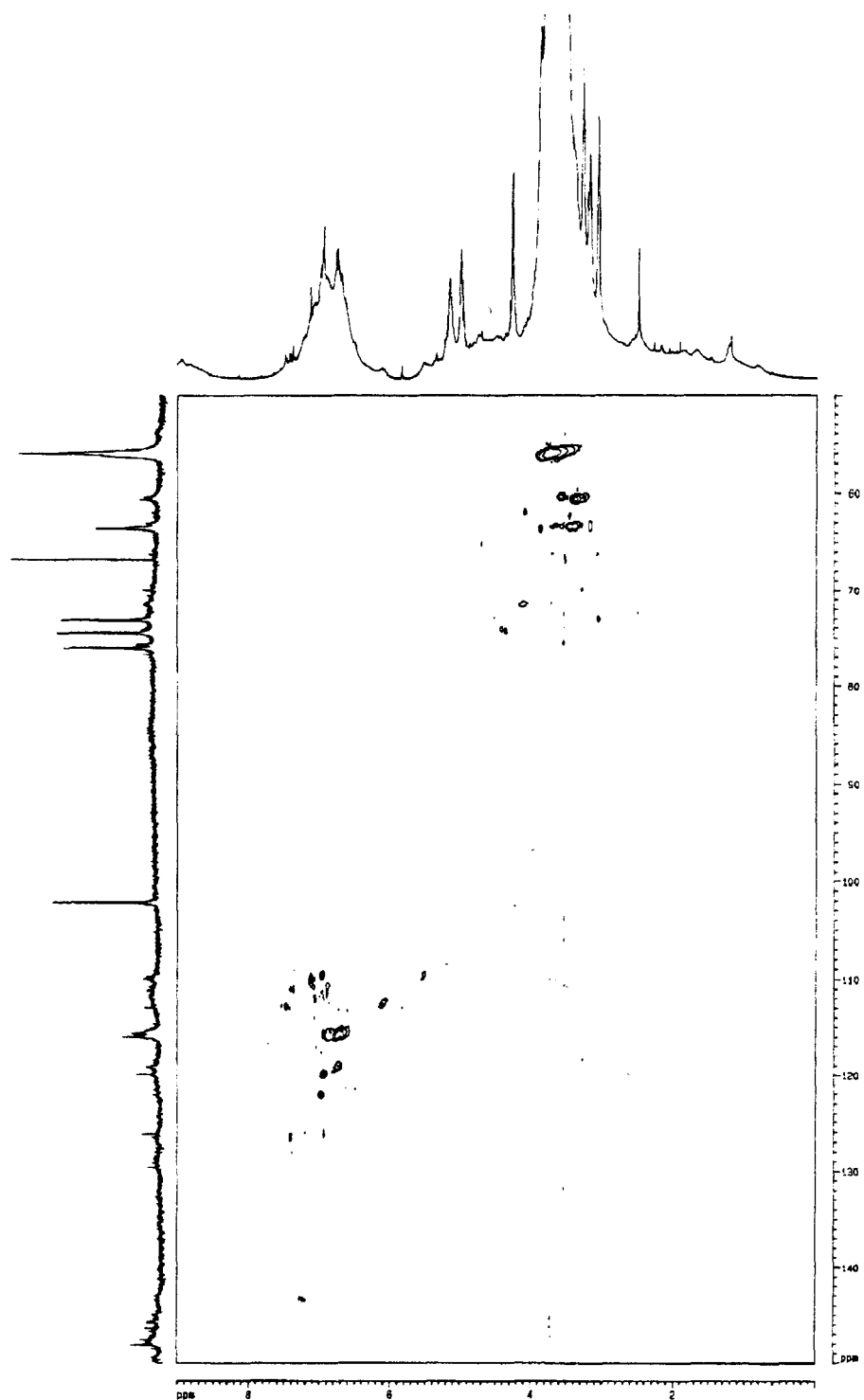


Figure 20 Spectre RMN 2D HMQC de la lignine alcaline de l'épinette noire.

TABLEAU XVII

Interprétation du spectre RMN ^{13}C - ^1H (HMQC)
de la lignine alcaline de l'épinette noire

Connectivités	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	Interprétation
1	3,70	147,20	coumarane-position β
2	3,70	146,10	coumarane-position β
3	7,38	126,60	biphényle-6
4	7,18	126,10	biphényle-6
5	6,91	126,10	biphényle-6
6	6,96	122,30	guaiacyle-2,5,6
7	6,59	121,60	guaiacyle-2,5,6
8	6,47	121,70	guaiacyle-2,5,6
9	6,91	120,20	guaiacyle-2,5,6
10	6,70	119,40	guaiacyle-2,5,6
11	3,30	118,70	guaiacyle-2,5,6
12	6,69	116,10	guaiacyle-2,5,6
13	6,10	112,90	guaiacyle-2,5,6
14	7,33	111,40	guaiacyle-2,5,6
15	6,91	109,90	guaiacyle-2,5,6
16	4,40	78,20	β -O-4': β
17	3,53	77,92	β -O-4': β

TABLEAU XVII (suite)

Interprétation du spectre RMN ^{13}C - ^1H (HMQC)
de la lignine alcaline de l'épinette noire

Connectivités	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	Interprétation
18	3,53	76,15	β -O-4': β
19	4,34	74,84	β -O-4': α
20	3,53	74,56	β -O-4': α
21	4,50	73,50	β -O-4': α
22	2,49	72,97	β -O-4': α
23	3,71	71,84	β -O-4': α
24	3,28	70,32	résinol: γ
25	3,70	66,47	résinol: γ
26	4,69	65,55	résinol: γ
27	3,88	63,85	résinol: γ
28	3,57	63,78	résinol: γ
29	3,17	63,78	résinol: γ
30	3,46	62,54	coumarane: α
31	4,08	62,37	coumarane: α
32	3,59	60,78	β -O-4': γ
33	3,36	60,95	β -O-4': γ
34	3,70	56,36	OCH_3

3.4.5. Spectre RMN-2D ^1H - ^1H ROESY de la lignine alcaline de l'épinette noire

Le spectre RMN 2D ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) illustré à la figure 21 permet de confirmer la présence de liaisons interunités de type β -O-4', coumarane (β -5') et coniféraldéhyde. Il s'agit ici d'un système de spins homonucléaires pour lequel on détermine les termes de relaxation croisée transversale, contrairement aux termes de relaxation croisée longitudinale détectés par la séquence NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Ces derniers peuvent en effet devenir très faibles, même négatifs dans certaines conditions de mobilité moléculaire comme celles rencontrées pour les molécules d'intérêt biologique. En revanche les termes de relaxation croisée transversale restent toujours positifs (Canet, 1991).

La comparaison des données expérimentales obtenues avec celles de la littérature permet d'identifier quelques unes des taches de corrélation. Le tableau XVIII en présente une interprétation détaillée. Afin d'alléger le tableau, les connectivités qui n'ont pu être interprétées ne sont pas répertoriées mais peuvent être observées sur le spectre de la figure 21.

La lignine est reconnue comme étant une structure qui s'assemble au hasard. Atalla et Agarwal (1985) proposaient la présence d'un certain degré de régularité dans la structure de la lignine. Ils suggèrent que les anneaux aromatiques de la lignine prennent une orientation parallèle. Ede et Brunow (1992) mentionnent que si la lignine possède quelque forme d'ordre dans sa structure, il devrait être possible de l'observer dans les interactions à travers l'espace en utilisant les techniques NOE. Ils observent des corrélations de magnétisation de transfert intra-unités (qu'il est possible d'observer sur le spectre de la figure 21) entre les groupements suivants: groupement méthoxyle et H2 aromatiques (connectivité 13) ; H γ dans

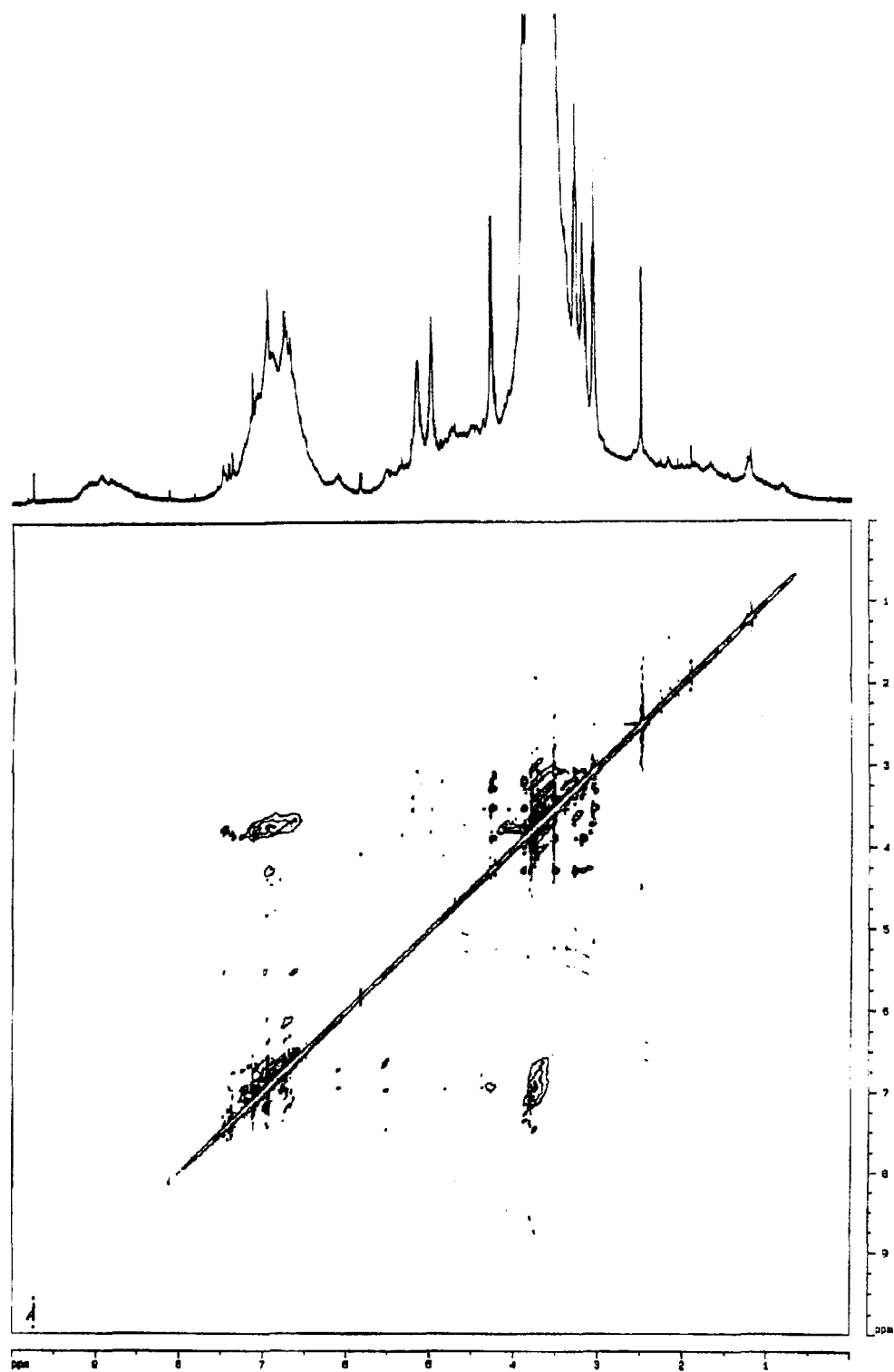


Figure 21 Spectre RMN 2D ROESY de la lignine alcaline de l'épinette noire.

TABLEAU XVIII

Spectre RMN ^1H - ^1H (ROESY) de la lignine alcaline de l'épinette noire

No	F ₁ ^1H (ppm)	F ₂ ^1H (ppm)	Interprétation (connectivités)
1	9,75	9,92	aldéhyde <--> acide carboxylique
2	3,74	8,74	coumarane: H- β <--> H alcénique conjugué
3	3,80	8,55	coumarane: H- β <--> H alcénique conjugué
4	6,96	7,40	coniféraldéhyde: H- α <--> H alcénique conjugué
5	5,52	7,46	coumarane: H- α <--> H alcénique conjugué
6	6,69	7,17	coniféraldéhyde: H- α <--> coniféraldéhyde: H- β
7	6,12	6,94	β -O-4' et coumarane: H- α <--> β -O-4': H-2 et H-6
8	5,54	6,96	coumarane: H- α <--> coumarane: H-6
9	4,83	6,96	β -O-4': H- β <--> β -O-4': H-2 et H-6
10	4,31	6,96	β -O-4' et coumarane: H γ <--> H-2 et H-6 aromatiques
11	4,28	6,96	β -O-4': -CH ₂ O-en β <--> β -O-4': H-2 et H-6
12	3,76	7,48	méthoxyle <--> coniféraldéhyde: H- β (inter-unité ou intra-unité: 9 liens)
13	3,76	6,96	β -O-4': CH ₃ O- <--> β -O-4': H-2
14	6,12	6,74	β -O-4': H- α <--> β -O-4': H-6
15	5,54	6,61	coumarane: H- α <--> coumarane: H-6

TABLEAU XVIII (suite)

Spectre RMN ^1H - ^1H (ROESY) de la lignine alcaline de l'épinette noire

No	F ₁ ^1H (ppm)	F ₂ . ^1H (ppm)	Interprétation (connectivités)
16	3,84	5,33	coumarane: H- β <--> coumarane: H- α
17	3,51	5,21	coumarane: H- β <--> coumarane: H- α
18	3,39	5,21	résinol: H- β <--> résinol: H- α
19	3,06	5,14	résinol: H- β <--> résinol: H- α
20	3,29	4,98	résinol: H- β <--> résinol: H- α
21	3,80	4,59	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
22	3,48	4,46	3-aryl-1-propanol: H- α <--> 3-aryl-1-propanol: H- γ
23	3,89	4,28	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
24	3,51	4,28	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
25	3,14	4,28	résinol: H- β <--> résinol: H- γ
26	3,18	3,9	résinol: H- β <--> résinol: H- γ
27	3,26	3,64	résinol: H- β <--> résinol: H- γ
28	3,06	3,55	résinol: H- β <--> résinol: H- γ

des structures de type β -O-4' et coumarane et H2 et H6 des groupements aromatiques (connectivité 10); H α dans la structure coumarane et H2/H6 (connectivité 8); H α dans la structure de type β -O-4' et trans coniférol, et H2/H6 (connectivité 5).

Les données présentées par Ede et Brunow (1992) sont les premières qui apportent de l'information sur la conformation de la lignine en solution. L'utilisation ultérieure de ces techniques pour la caractérisation de modèles de lignines synthétisées permettra de mieux définir chacune des connectivités retrouvées dans des échantillons de lignine de bois.

3.4.6. Spectre RMN-2D ^1H - ^1H TOCSY de la lignine alcaline de l'épinette noire

La séquence de pulsations TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), montre les connectivités entre les signaux d'un même système de spin (Schraml, 1988). Le spectre RMN-2D TOCSY est présenté à la figure 22.

La séquence de pulsations TOCSY permet de confirmer la présence des différents groupements de type β -O-4', coumarane (β -5'), coniféraldéhyde et résinol. Des interactions de magnétisation de transfert sont observées entre les H β des unités coumaranes et ses H γ , les H 2 et H 6 de ces mêmes unités. Il y a aussi des interactions entre les H α et H β (connectivité 19), entre H β et H γ (connectivité 30 à 32), et H α et H γ (connectivité 20) des unités résinols. La présence des unités β -O-4' est confirmée par les connectivités 12, 15 et 16 qui montrent des interactions de magnétisation de transfert entre les hydrogènes α , β , γ et H 2 /H 6 .

Les données expérimentales obtenues dans le spectre TOCSY ont été comparées avec celles de la littérature récente (Ede, 1992; Fukagawa, 1991) ce qui a permis l'interprétation des données du spectre TOCSY présentées au tableau XIX.

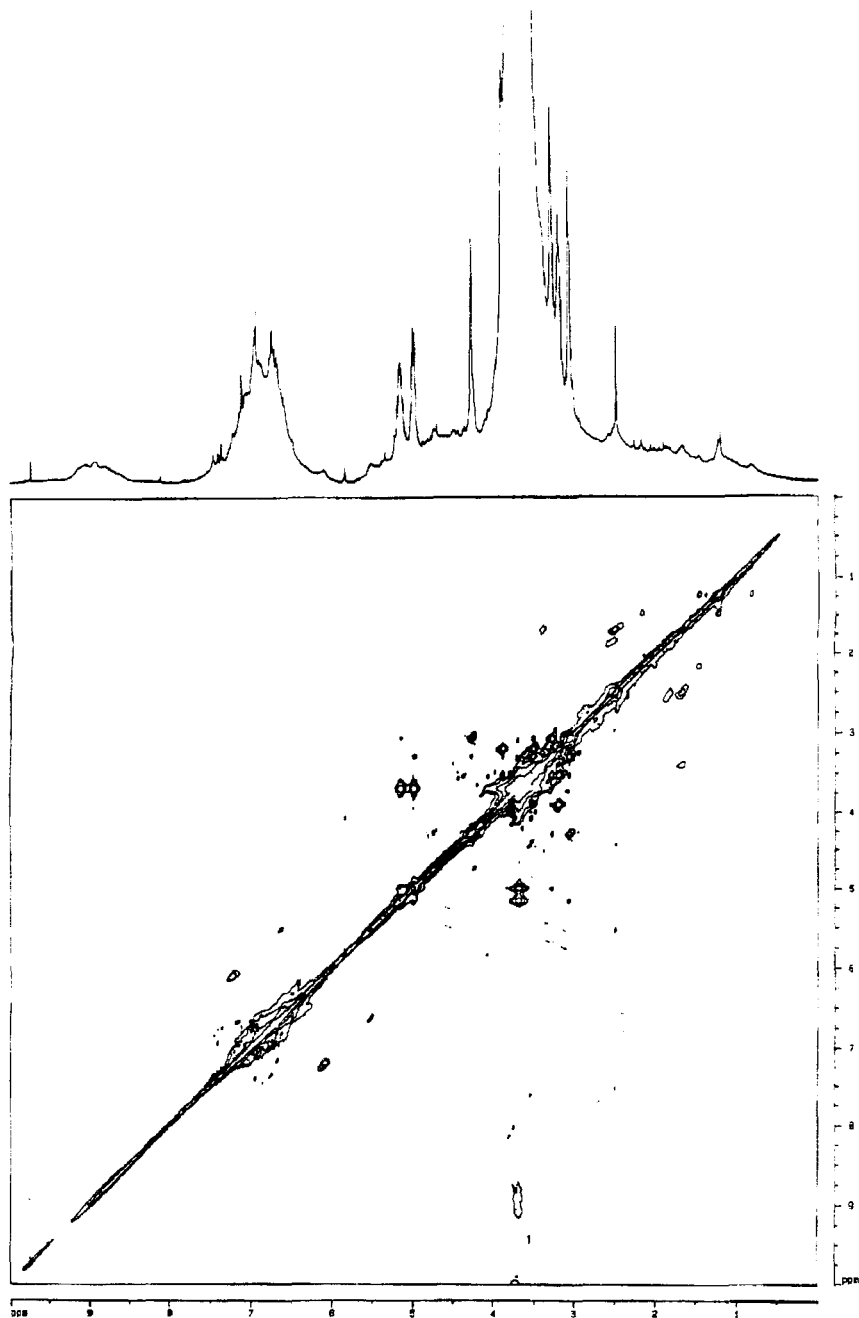


Figure 22 Spectre RMN-2D TOCSY de la lignine alcaline de l'épinette noire

Une fois de plus, la spectroscopie RMN-2D apporte de l'information sur la structure de la lignine alcaline de l'épinette noire. Il serait intéressant de pouvoir comparer les résultats obtenus dans ce travail sur la lignine alcaline de l'épinette noire avec ceux qui résulteraient de la caractérisation de la lignine de l'épinette noire dans sa structure native. La lignine peut maintenant être isolée sans l'intervention des techniques de dégradation chimiques ou mécaniques qui modifient la structure native de la lignine (Brunow *et al.*, 1990). La culture de cellules en suspension de *Picea abies* libère la lignine dans le milieu de culture, celle-ci peut, par la suite, être récupérée et caractérisée par les différentes techniques spectroscopiques (Brunow *et al.*, 1990). La même méthode de culture de cellules appliquée à l'épinette noire *Picea mariana* permettrait d'observer les différences structurales entre la lignine extraite par des procédés chimiques et mécaniques, et la structure native de la lignine de l'épinette noire.

TABLEAU XIX

Spectre RMN ^1H - ^1H (TOCSY) de la lignine alcaline de l'épinette noire

No	F ₁ ^1H (ppm)	F ₂ ^1H (ppm)	Interprétation (connectivités)
1	3,72	10,0	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ -aldéhyde, acide
2	3,70	9,89	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ -aldéhyde
3	3,53	9,38	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ -aldéhyde
4	3,70	8,92	CH ₃ O <--> OH phénolique
5	3,80	8,16	coumarane: H- β <--> H-arom. en para de OH, OR, COR
6	3,75	8,05	coumarane: H- β <--> H-arom. en para de OH, OR, COR
7	3,53	7,63	coumarane: H- β <--> H-arom. en para de OH, OR, COR
8	2,48	7,54	3-aryl-1-propanol: H- α <--> H-arom. en para de OH, OR, COR
9	6,94	7,43	coniféraldéhyde: H- α <--> coniféraldéhyde: H- β
10	6,85	7,47	coniféraldéhyde: H- α <--> coniféraldéhyde: H- β
11	6,74	7,37	coniféraldéhyde: H- α <--> coniféraldéhyde: H- β
12	6,09	7,25	β -O-4': H- α <--> Guaiacyl: H-2
13	6,67	7,16	coniféraldéhyde: H- α <--> coniféraldéhyde: H- β
14	5,52	6,63	coumarane: H- α <--> guaiacyl: H-2, H-6
15	4,07	9,58	β -O-4': H- β <--> aldéhyde: H- γ
16	2,48	9,55	β -O-4': CH ₂ -CHO <--> Aldéhyde: H- γ
17	3,68	9,51	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ -aldéhyde
18	3,06	5,19	résinol: H- β <--> résinol: H- α
19	3,28	5,02	résinol: H- β <--> résinol: H- α
20	4,24	4,77	résinol: H- γ <--> résinol: H- α

TABLEAU XIX(suite)

Spectre RMN ^1H - ^1H (TOCSY) de la lignine alcaline de l'épinette noire

No	F ₁ ^1H (ppm)	F ₂ ^1H (ppm)	(Interprétation) (connectivités)
21	3,68	4,71	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
22	3,39	4,55	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
23	3,55	4,44	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
24	2,48	4,46	3-aryl-1-propanol: H- α <--> 3-aryl-1-propanol: H- γ
25	3,29	4,31	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
26	3,06	4,31	résinol: H- β <--> résinol: H- γ
27	3,64	4,25	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
28	3,53	4,11	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
29	3,47	4,04	coumarane: H- β <--> coumarane: H- γ
30	3,18	3,92	résinol: H- β <--> résinol: H- γ
31	3,08	3,76	résinol: H- β <--> résinol: H- γ
32	3,06	3,43	résinol: H- β <--> résinol: H- γ
33	1,67	3,43	3-aryl-1-propanol: H- β <--> 3-aryl-1-propanol: H- γ
34	1,86	2,56	3-aryl-1-propanol: H- β <--> 3-aryl-1-propanol: H- α
35	1,69	2,52	3-aryl-1-propanol: H- β <--> 3-aryl-1-propanol: H- α
36	1,45	2,21	CH alcane <--> CH alcane, CH ₃ CO
37	1,22	1,50	CH ₂ alcane <--> CH alcane

3.5. Biotransformation

La dernière étape de cette étude sur la lignine alcaline de l'épinette noire est la biotransformation de la lignine par des champignons. Pour ce faire, la lignine alcaline est soumise à une dégradation par une moisissure blanche *Phanerochaete chrysosporium*. Les échantillons biotransformés sont analysés par chromatographie d'exclusion sur gel. Des échantillons sont retirés à tous les 24 heures de biotransformation de façon à permettre l'observation d'une cinétique de dégradation quotidienne. Les biotransformations se prolongent sur une période de 10 jours soit 240 heures.

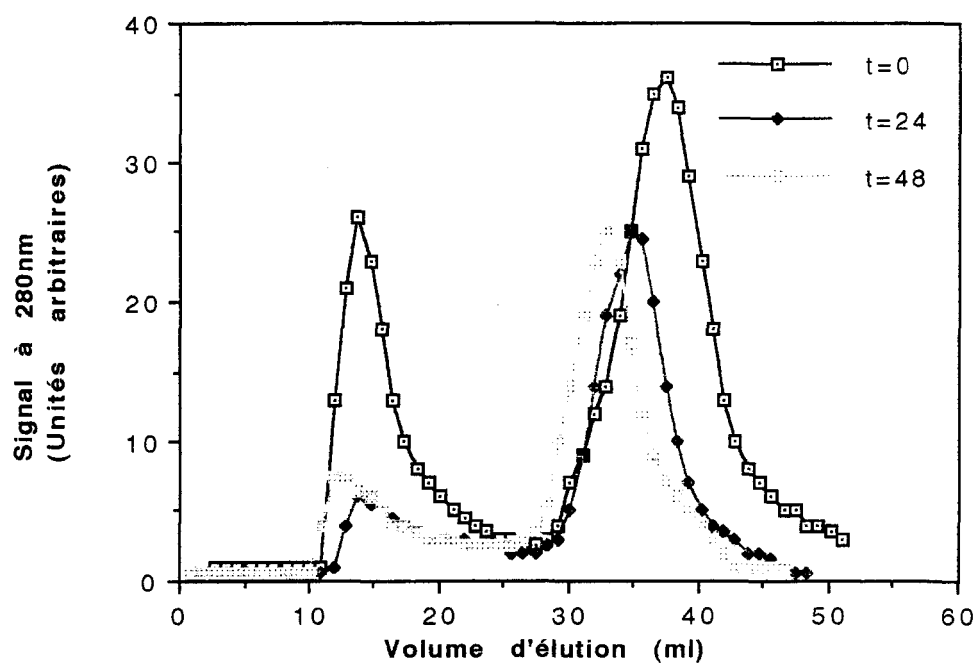
D'après Umezawa (1988), trois modes de dégradation sont suggérés pour intervenir dans la décomposition des macromolécules de lignine par les moisissures blanches.

i) Le premier mécanisme est une réaction d'oxydation. Dans ce cas, il se produit un bris dans la chaîne latérale entre les carbones α et β conduisant à la formation d'acide aromatiques.

ii) Le deuxième mécanisme est le bris de la liaison β -aryl-éther (β -O-4') et une modification de la chaîne latérale.

iii) Le troisième mécanisme est la dégradation du noyau aromatique qui se produit par une réaction d'oxydation qui provoque l'ouverture du noyau aromatique.

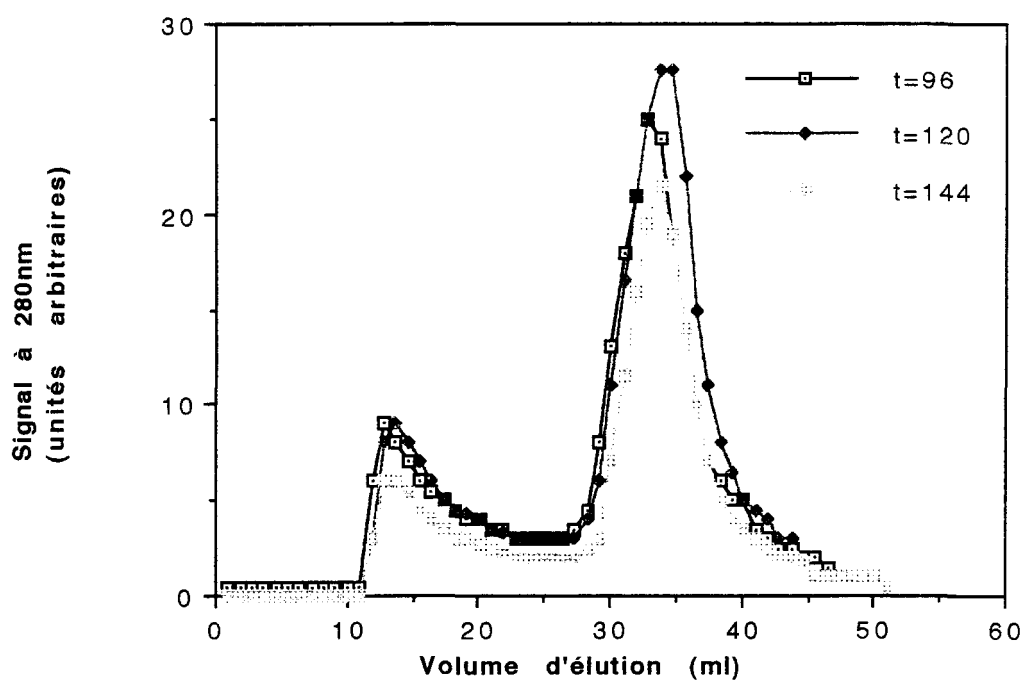
D'après les chromatogrammes obtenus et présentés aux figures 23 à 25, on observe avant les biotransformations ($t = 0$ heure) deux populations importantes de masses moléculaires très différentes soit 70 000 daltons et 450 daltons. Après 24 heures de biotransformation la population de 70 000 daltons diminue au profit d'une population de fragments de 600 daltons. Cette diminution des fragments de hautes masses moléculaires est



Légende:

t= temps de biotransformation (heures)

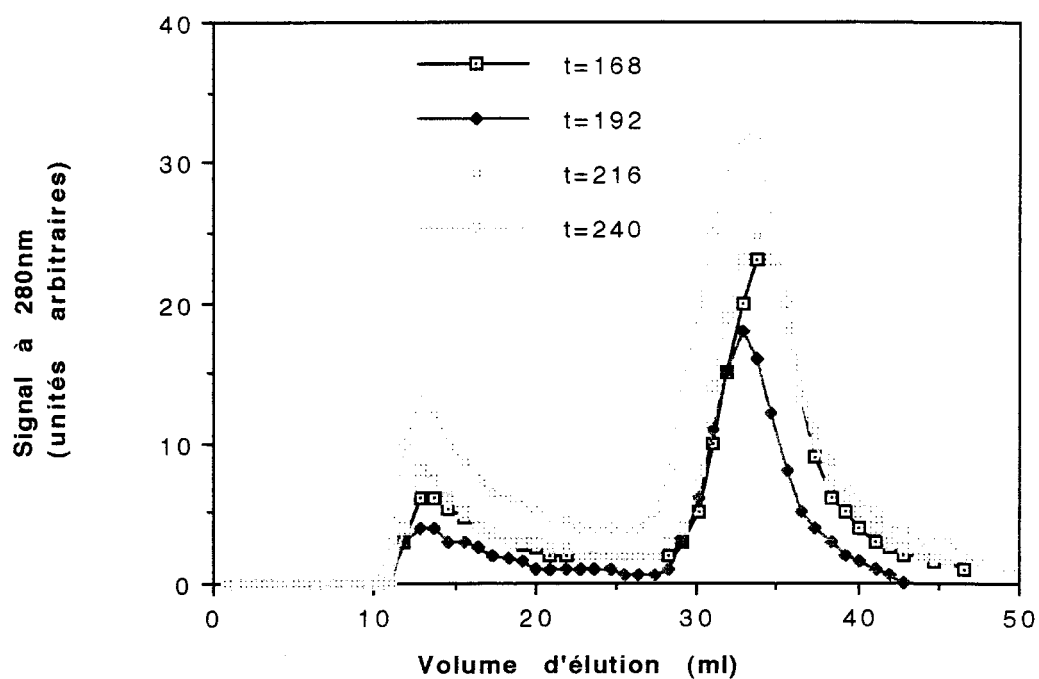
Figure 23 Chromatogrammes de la lignine alcaline de l'épinette noire entre 0 et 48 heures de biotransformation.



Légende:

t= temps de biotransformation (heures)

Figure 24 Chromatogrammes de la lignine alcaline de l'épinette noire entre 96 et 144 heures de biotransformation.



Légende:

t = temps de biotransformation (heures)

Figure 25 Chromatogrammes de la lignine alcaline de l'épinette noire entre 168 et 240 heures de biotransformation.

très accentuée pour les premiers 24 heures et semble se stabiliser légèrement pour les jours qui suivent malgré quelques variations beaucoup moins importantes. Cette diminution de la quantité de fragments de hautes masses moléculaires pourrait être due à une grande accessibilité de la lignine alcaline. La lignine alcaline étant plus soluble que la lignine acide, elle est plus accessible pour les champignons qui dégradent les fragments de hautes masses moléculaires en fragments plus petits par les différents mécanismes de dégradation cités plus haut. Le tableau XX présente les variations des proportions des masses moléculaires avec le temps de biotransformation.

La cinétique de dégradation quotidienne permet aussi l'observation de réaction de repolymérisation. En effet, la figure 23 montre un léger déplacement de la population de faible masse moléculaire vers les masses moléculaires plus élevées pour les courbes de 24 et 48 heures. Ainsi, la population de plus faible masse moléculaire de la lignine avant biotransformation est d'environ 450 daltons. Après 24 heures, la masse moléculaire de cette population augmente à 660 daltons et à 760 daltons après 48 heures. Ce phénomène déjà observé antérieurement (Chahal, 1990; Trojanowsky, 1987) est causé par les réactions de repolymérisation des petits fragments de lignine, ces réactions se produisent lors de la dégradation de la lignine par les moisissures blanches.

Pour les temps de biotransformation plus longs (96 à 240 heures), il y a de légères variations dans la distribution des masses moléculaires, cependant ces variations ne permettent pas d'affirmer une cinétique régulière de dégradation. On observe cependant une augmentation de la population de faible masse moléculaire en fonction du temps. Un plus grand nombre d'expériences devrait être effectué afin de vérifier le comportement de la lignine alcaline de l'épinette noire dégradée par *Phanerochaete chrysosporium*. Dans cette analyse, deux séquences de biotransformation ont été réalisées, ce qui n'est statistiquement pas significatif. Ces données constituent donc des données préliminaires.

TABLEAU XX

Distribution des masses moléculaires de la lignine alcaline de l'épinette noire lors de la
biotransformation par *Phanerochaete chrysosporium*

Temps (heures)	Masses moléculaires élevées (kDa)	Proportion (%)	Masses moléculaires faibles (kDa)	Proportion (%)
0	70	32	0,4	68
24	70	12	0,7	88
48	85	16	1,2	84
96	70	14	0,8	86
120	70	20	1 0	80
144	80	17	1 0	83
168	78	13	1 0	84
192	74	14	1 0	86
216	74	18	1 0	82
240	76	23	1 0	77

Un échantillon prélevé après 58 heures de biotransformation a été soumis au spectre de masse par bombardement d'atomes rapides (FAB/MS). Les résultats sont présentés à la figure 26. Le spectre de masse permet d'identifier certaines structures présentes dans les échantillons biotransformés. Ces résultats devraient être confirmés avec les spectres RMN, mais au moment de rédiger ce mémoire, ces résultats ne sont pas encore disponibles. D'après le premier mécanisme cité par Umezawa et Higuchi (1991), les réactions d'oxydation qui ont lieu lors de la dégradation de la lignine par les moisissures blanches conduisent à la production d'acides aromatiques. Cette affirmation permet de supposer la présence de certains monomères et dimères de lignine déjà présents dans la lignine non-biotransformée et dont les fonctions alcools des chaînes latérales seraient transformées en fonctions acides. Les masses moléculaires de ces structures apparaissent à la figure 27 sur le spectre de masse de la lignine biotransformée.

Les structures retenues sont présentées à la figure 27 et pourraient être présentes dans la lignine alcaline de l'épinette noire biotransformée par les moisissures blanches. Le fragment majoritaire du spectre de masse ayant un m/z de 181 serait un monomère de guaiacyl avec la fonction CH_2COOH comme chaîne latérale. Les structures proposées sont en accord avec les résultats antérieurs (Fukagawa, 1991; Ede, 1991; Watanabe, 1988).

Le spectre de masse par bombardement d'atomes rapides de la lignine biotransformée montre un plus grand nombre de fragments de masses moléculaires différentes de ceux de la lignine alcaline non-biotransformée. De plus le spectre de masse de la lignine biotransformée présente des m/z beaucoup plus élevés que ceux de la lignine non-biotransformée. En effet, les plus gros fragments observés pour la lignine non-biotransformée ont un rapport m/z d'environ 2 000. Chez la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation, les plus gros fragments observés ont un rapport m/z de 3 500 (figure 26). Cette observation permet de

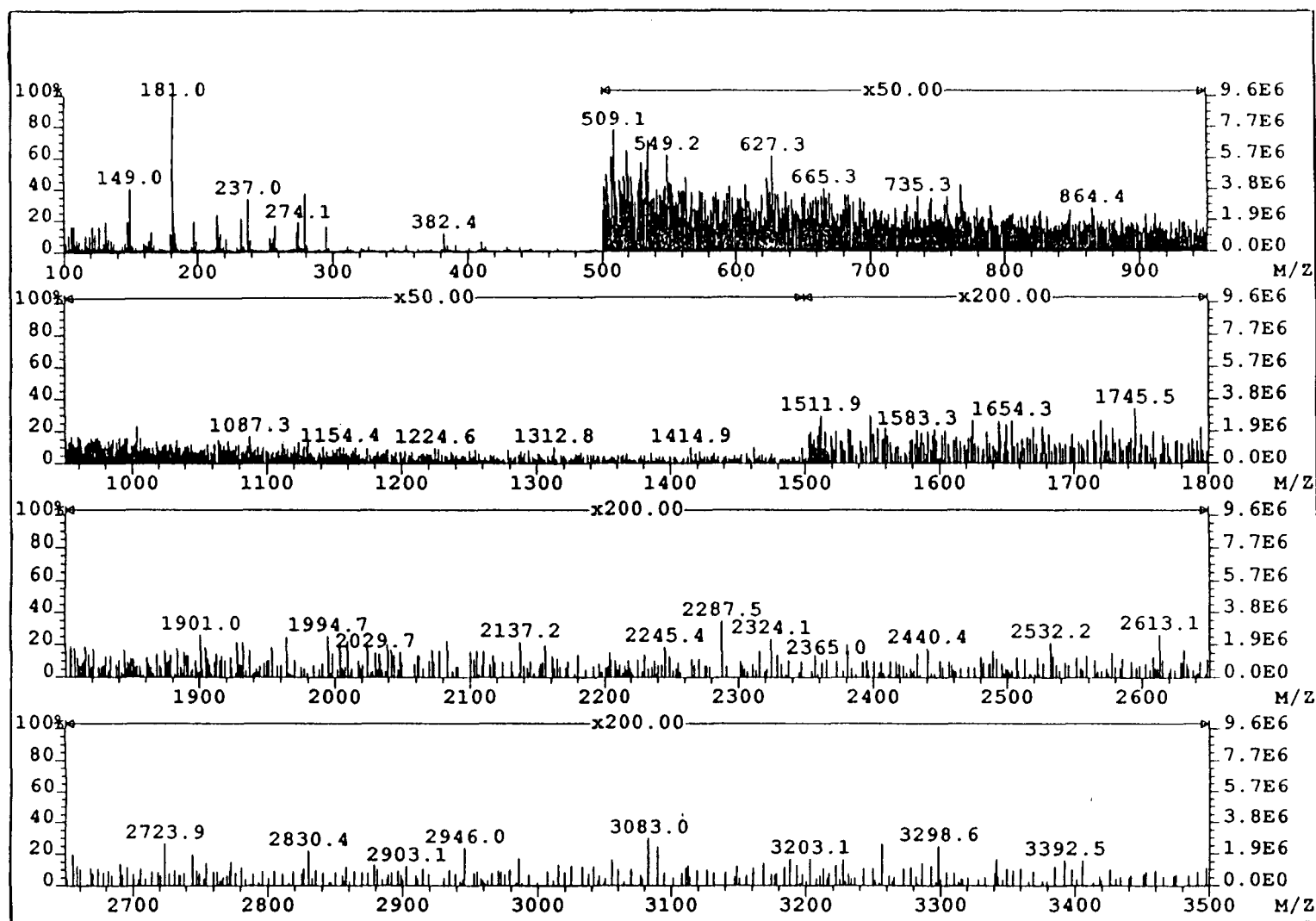


Figure 26 Spectre de masse avec atomes rapides (FAB/MS) de la lignine alcaline de l'épinette noire après 58 heures de biotransformation par *Phanerochaete chrysosporium*.

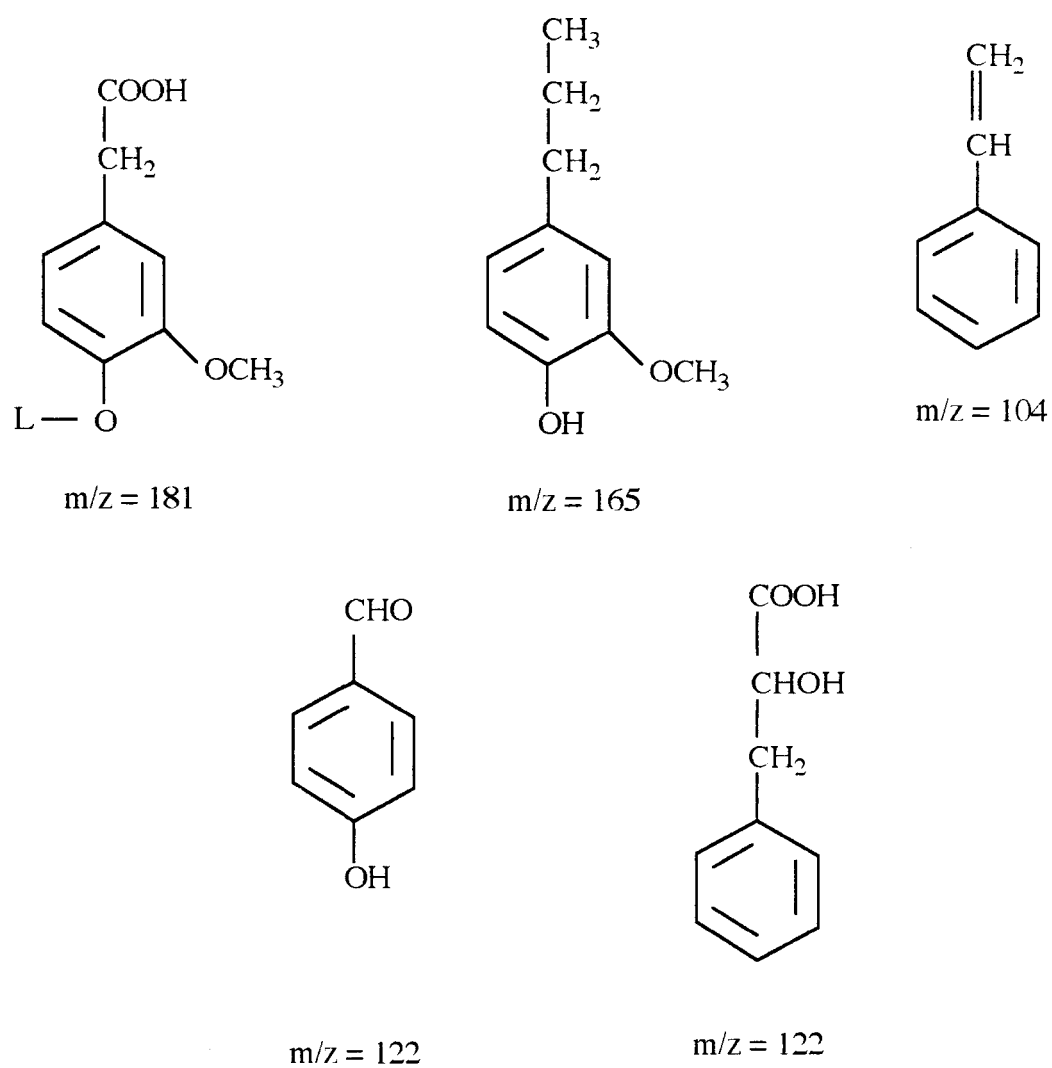


Figure 27: Fragments retrouvés dans la lignine alcaline de l'épinette noire après 58 heures de biotransformation par *Phanerochaete chrysosporium*.

constater les réactions de repolymérisation qui ont lieu lors des fermentations de la lignine par *Phanerochaete chrysosporium*.

La fermentation de la lignine produisant des réactions d'oxydation, des fragments plus importants peuvent être proposés en remplaçant les fonctions alcools des chaînes latérales par des fonctions acides. Cette opération permet donc de proposer des fragments de lignine ayant des masses moléculaires de 714, 801 et 1 149 (figures 29 à 31). Ces fragments sont les formes oxydées des structures élaborées à l'aide des spectres RMN ^{13}C et du spectre de masse pour la lignine alcaline non-biotransformée.

Chen *et al.* (1982) ont démontré la présence de cinq (5) acides aromatiques (figure 31) dans la fraction de faible masse moléculaire de la lignine d'épinette dégradée par *Phanerochaete chrysosporium*. Il n'est pas possible de confirmer la présence de ces acides aromatiques dans les échantillons de lignine alcaline d'épinette noire avant biotransformation. Cependant, les masses moléculaires de ces acides aromatiques sont retrouvées dans le spectre de masse de la lignine biotransformée. Le spectre RMN ^{13}C à l'état solide de cet échantillon permettra de confirmer la présence de ces acides aromatiques et fera l'objet d'analyses ultérieures.

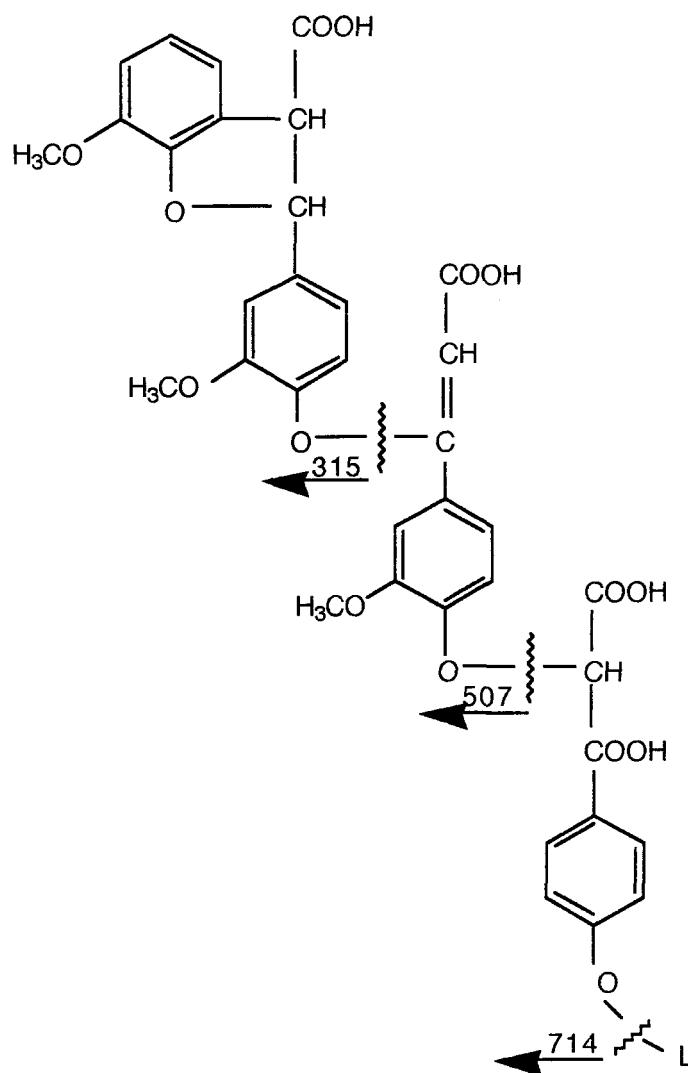


Figure 28 Fragment de masse moléculaire égale à 714 pour la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation

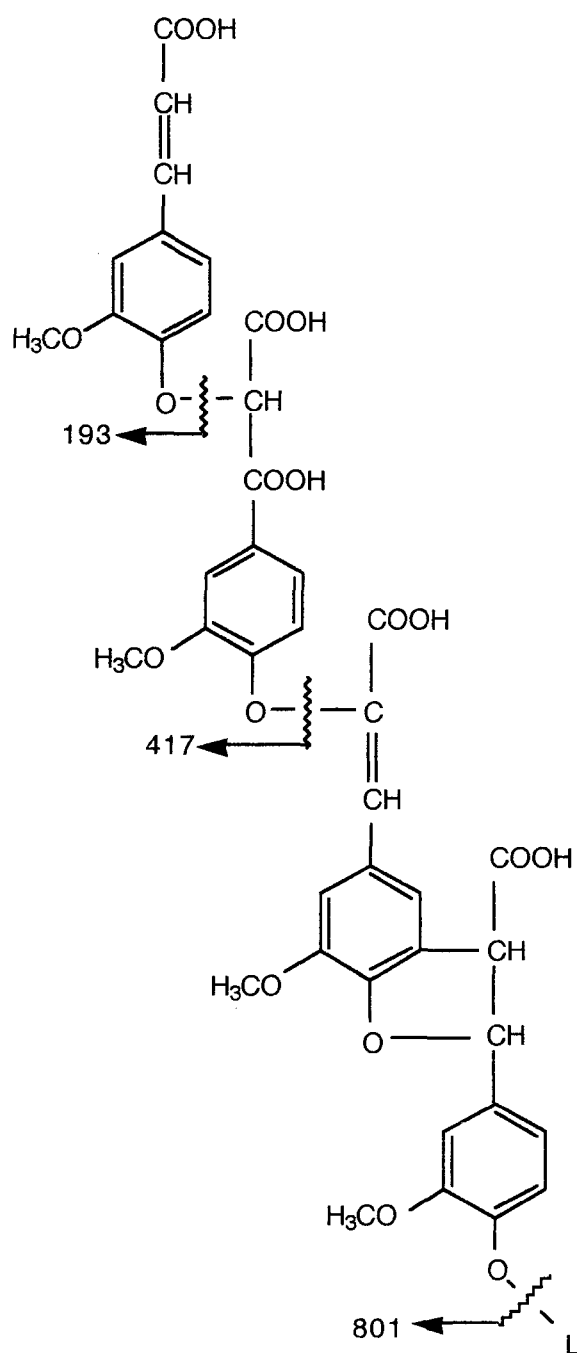


Figure 29 Fragment de masse moléculaire égale à 801 pour la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation

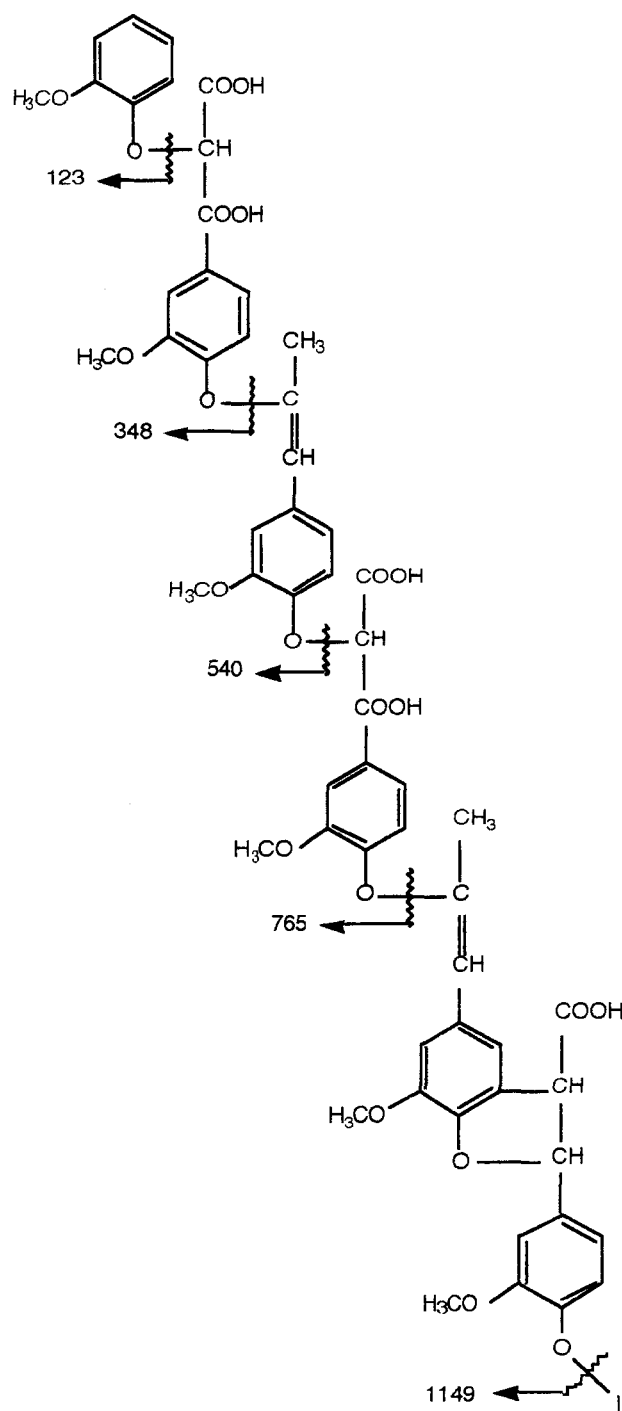
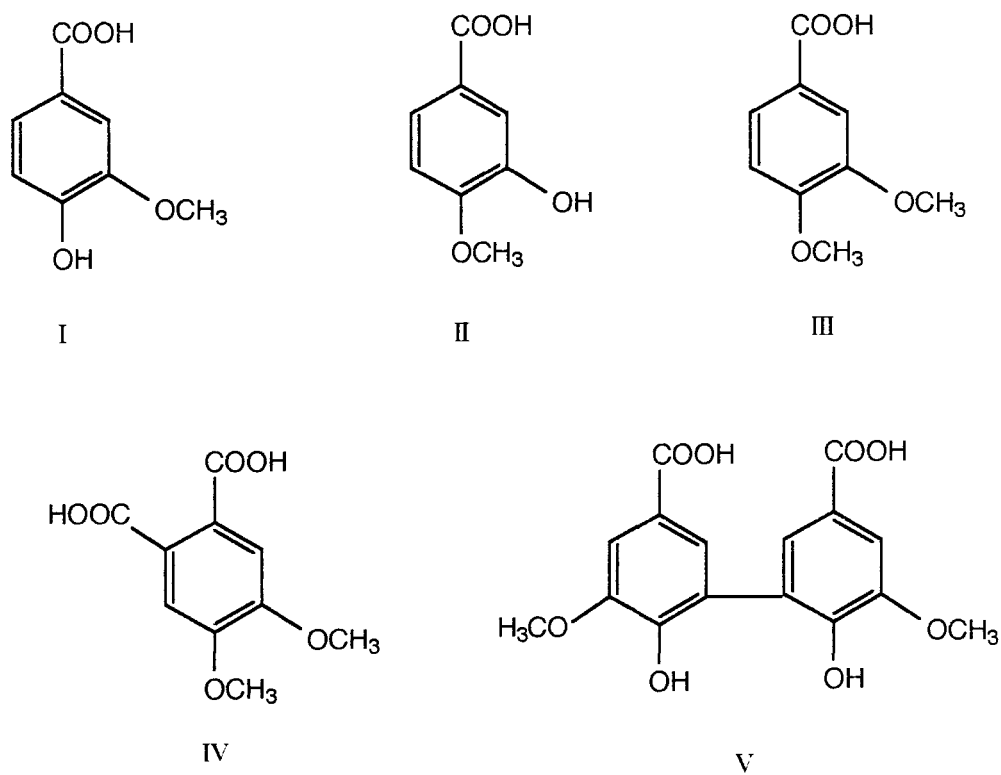


Figure 30 Fragment de masse moléculaire égale à 1 149 pour la lignine alcaline après 58 heures de biotransformation



Légende:

- | | |
|-----|---------------------------|
| I | Acide vanillique |
| II | Acide isovanillique |
| III | Acide vératrique |
| IV | Acide m-hémipinique |
| V | Acide dehydrodivanillique |

Figure 31: Produits les plus communs retrouvés dans la fraction de faible masse moléculaire après la dégradation du bois d'épinette par *Phanerochaete chrysosporium*.⁴

⁴ Chen *et al.*, 1982

CHAPITRE IV

CONCLUSION

Afin de procéder à l'analyse d'un polymère aussi complexe que la lignine alcaline de l'épinette noire *Picea mariana* (Mill) B.S.P., une combinaison de techniques a dû être utilisée. Les résultats de ces analyses conduisent à l'identification de certains fragments de base présents dans les polymères de lignine alcaline.

La méthode d'extraction basée sur le procédé KRAFT s'est avérée efficace pour l'extraction de la lignine alcaline de l'épinette noire. Les analyses spectroscopiques infrarouges ont permis la confirmation de la présence des groupements guaiacyles et de l'absence des groupements syringyles qui sont caractéristiques des bois durs comme les feuillus. Les données de l'analyse élémentaire de la lignine alcaline de l'épinette noire ont permis d'élaborer une formule moléculaire qui se compare très bien aux résultats disponibles dans la littérature.

Les résultats obtenus par spectrométrie à résonance magnétique nucléaire, permettent de confirmer la présence des unités dimériques éther guaiacylglycérol β -aryle (β -O-4'), phénylcoumarane (β -5') et pinorésinol (β - β'). Une grande diversité de chacun de ces composés a été identifiée par la spectrométrie à résonance magnétique nucléaire du carbone-13 à l'état solide et en solution dans le DMSO-d₆.

La spectrométrie de masse par bombardement d'atomes rapides a aussi été d'un grand secours afin de confirmer la présence des différents composés retrouvés dans la lignine alcaline. Cette technique a aussi permis de proposer des trilignols, tétralignols et pentalignols comme étant des structures composant la lignine alcaline de l'épinette noire.

La spectroscopie à RMN¹³C à l'état solide a permis de constater la différence entre les échantillons de bois brut, sans extractibles et de la lignine alcaline de l'épinette noire, la différence majeure étant la présence de cellulose et d'hémicellulose dans les échantillons de bois. Ces fonctions cellulosiques atténuent beaucoup la présence des fonctions aromatiques et des groupements méthoxyles de la lignine qui sont présents dans les échantillons de bois.

Les techniques de spectroscopie RMN en deux dimensions viennent confirmer la présence des liaisons interunitées majeures comme β -O-4', coumarane et résinol.

L'étude de la biodégradation de la lignine alcaline de l'épinette noire par *Phanerochaete chrysosporium* confirme les résultats obtenus dans la littérature. Des réactions de polymérisation et dépolymérisation sont observées dans les échantillons biotransformés à l'aide de la technique de chromatographie d'exclusion sur gel qui permet de suivre la distribution des masses moléculaires en fonction du temps de biodégradation.

On observe deux populations de masses moléculaires très différentes; la première ayant une masse moléculaire de 70 000 Daltons et la seconde varie de 1 000 à 450 Daltons. Une forte diminution des populations de hautes masses moléculaires est observée au cours des premières 24 heures de biotransformation. Par la suite, des séquences de polymérisation et dépolymérisation sont constatées selon le temps.

Le spectre de masse (FAB/MS) d'un des échantillons biotransformés permet de proposer quelques structures qui devraient être présentes dans les échantillons biotransformés sachant qu'il se produit des réactions d'oxydation qui donnent des acides aromatiques. La présence des acides vanillique, isovanillique, véricique, hémipinique, déhydrodivanillique est donc proposée, et pourra éventuellement être confirmée par les analyses des spectres RMN de ce même échantillon lors de travaux futurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Almendros, G.; Martinez, A.T.; Gonzalez, A.E.; Gonzalez-Vila, F.J.; Fründ, R.; Lüdemann, H.D., 1992. CPMAS 13-C NMR Study of lignin preparations from wheat straw transformed by five lignocellulose-degrading fungi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40,7, 1297-1302.
- Bassham, J.T., 1975. Cellulose as a chemical and energy resource. *Biotech. Bioeng. Symp.*,5, 9-19.
- Bellamy, L.J., 1964. *The infrared spectra of complex molecules*, Wiley, New York, pp.161-177.
- Bissaria, V.S.; Ghose, T.K., 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme microb. Technol.*, 3, 90-104
- Bock, K.; Pedersen, C., 1983. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 41, 27-65.
- Browning, L., 1967. *Methods of wood chemistry*, volume 2. Interscience Publishers, New York, 880 pages.
- Brunow, G.; Ede, R.M.; Simolam L.K.; Lemmetyinenm J., 1990. Lignins released from *Picea abies* suspension culture-true native spruce lignin? *Phytochemistry*, 29, 8, 2535-2538.

- Canet, D., 1991. La RMN, concepts et méthodes, InterEditions, Paris, 274 pages.
- Chahal, D.S.; Hachey, J.-M., 1990. Use of hemicellulose and cellulose and degradation of lignin by *Pleurotus sajor-caju* grown on corn stalk; In agricultural and synthetics polymers: Biodegradability and utilisation. ACS Symposium series 433, Glass, J.E. et Swift, G. (Eds), American Chemical Society, Washington, 304-310.
- Chahal, D.S. et Khan, S.M., 1991. Production of mycelial biomass of oyster mushrooms on rice straw. Mushroom science vol.13.
- Chen, C.-L. ; Chang, H.M.; Kirk, T.K., 1982. Aromatic acids produced during degradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung*, 36, 3-9.
- Dean, J.F.D., and Eriksson, K.E.L. 1992. Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung* 46,2, 135-147.
- Ede R.M.; Brunow, G.; Simola, L.K.; Lemmetyinen, J., 1990. Two-dimensional ^1H - ^1H chemical shift correlation and j-resolved NMR studies on isolated and synthetic lignins. *Holzforschung*, 44, 2, 95-101.
- Ede, R.M.; Brunow, G., 1992. Application of two-dimensional homo- and heteronuclear correlation NMR spectroscopy to wood lignin structure determination. *J. Org. Chem.*, 57, 5, 1477-1480.

- Eriksson, K.-E.L.; Blanchette, R.A.; Ander, A., 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood components. Springer series in wood science, éditeur: T.E. Timell, New York, 407 pages.
- Evilya, E., 1989. C13-NMR studies of a dehydropolymer (DHP) from isoeugenol: comparison with spruce lignin. *Holzforschung* 43, 1, 61-64
- Faix, O.; Beinhof, O., 1988. FTIR spectra of milled wood lignins and lignin polymer model (DHP's) with enhanced resolution obtained by deconvolution. *J. of wood chemistry and technology*, 8, 4, 505-522.
- Fengel, D.; Wegener, G., 1984. Wood, chemistry, ultrastructure, reaction. Walter de Gruyter, New York, 613 pages.
- Fenner, R.A.; Lephard, J.O., 1981. Examination of the thermal decomposition of Kraft pine lignin by fourier transform infrared evolved gas analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 846-849
- Fukagawa, N.; Meshitsuka, G.; Ishizu, A., 1991. A two dimensional NMR study of birch milled wood lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 11,3, 373-396.
- Fukagawa, N.; Meshitsuka, G.; Ishizu, A., 1992. Isolation of a rich end-wise lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 12, 1, 91-109.
- Garver, T.M.; Sarkanen, S., 1986. Kraft lignins: the legacy of native structural characteristics. *Holzforschung*, 40, 93-100.

- Glasser, W.G.; Sarkanen S., 1989. Lignin properties and materials, ACS symposium series 397 American Chemical Society, Washington, DC.
- Goljer, I.; Brezny, R.; Pranda, J.; Vodny, S., 1991. The ATP pulse sequence in C-13 NMR studies of lignin structure. *Holzforschung*, 45, suppl. 29-33.
- Hassi, H.Y.; Aoyama, M.; Tai, D.; Chen, C.L.; Gratzl, J.S., 1987. Substituent effects on ^{13}C chemical shifts of aromatic carbons in β -O-4 and β -5 type lignin model compounds. *J. Wood Chem.* 7,4, 555-581.
- Hawkes, G.E.; Smith, C.G.; Utley, J.H.P.; Vargas, R.R.; Viertler, H., 1993. A comparison of solution and solid state ^{13}C NMR spectra of lignin and lignin model compounds. *Holzforschung*, 47,4, 302-312.
- Higuchi, T.; Shimada, M.; Nakatsubo, F.; Tanahashi, M., 1977. Differences in biosynthesis of guaiacyl and syringyl lignins in woods. *Wood Sci. Technol.* 11, 153-167.
- Higuchi, T., 1983. Biosynthesis and microbial degradation of lignin. The new frontier in plant biochemistry, Japan Scientific Society Press Tokyo, 23-46.
- Higuchi, T., 1985. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls; In lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications, vol. 1. CRC Press, Inc., Kirk, T.K., Higuchi, T. et Chang, H.-M. (Eds), 1985, 237 pages.

- Higuchi, T. 1993. Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. J. of biotechnol., 30, 1-8.
- Himelsbach, D.S.; Barton II, F.E., 1980. ^{13}C nuclear magnetic resonance of grass lignins. J. Agric. Food Chem., 28, 1203-1208.
- Janshekar, H.; Fiechter, 1982. On the bacterial degradation of lignin. European J Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 47-50.
- Janshekar, H.; Haltmeier, T.; Brown, C., 1982. Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 174-181.
- Kirk, T K ; Schultz, E.; Connors, W.J.; Lorenz, L.F.; Zeikus, J.G., 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochate chrysosporium* Arch. Microbiol., 117, 277-285.
- Kosikova, B.; Joniak, D.; Hricovini, M.; Mlynar, J.; Zakutna, L., 1993. ^1H and ^{13}C NMR characterization of lignins from NSSC cooking with lignin additive. Holzforschung, 47, 2, 116-122.
- Kringstad, K.P. et Mörk, R., 1983. C-13 NMR spectra of Kraft lignins. Holzforschung 37, 5, 237-244
- Kringstad, K.P.; Mörk, R., 1985. ^{13}C NMR spectra of Kraft lignins, Kraft lignin acetates. Holzforschung 39, 109-119

- Labidi, A.; Robert, D.; Pla, F., 1993. Alkaline delignification of hardwood in flow-through reactor working at a low residence time, part V. Characterization of soda lignins by ^{13}C NMR. *Holzforschung* 47,3, 133-140
- Lapierre, C.; Monties, B., 1987. RMN C-13 bidimensionnelles des lignines de peuplier: Étude des corrélations entre atomes de carbone et réexamen par la méthode INADEQUATE des attributions des signaux du spectre. *Holzforschung*, 41,1, 51-58.
- Larouche, R., 1993. Extraction, caractérisation et biotransformation de la lignine de Klason de l'épinette blanche *Picea glauca*(Moench) Voss, Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, 188 pages.
- Larouche, R.; Hachey, J.M.; Chahal, D.S., 1991. Extraction et caractérisation physicochimique de la lignine extraite de conifères. *Annales de l'ACFAS*, Sherbrooke, 192 pages
- Larouche, R.; Hachey, J.M., 1993. Lignine RMN ^{13}C (v 1.06). Un logiciel appliqué à la caractérisation de la lignine par résonance magnétique nucléaire (RMN) du carbone-13. Communication privée.
- Leary, G.J.; Newman, R.H.; Morga, K.R., 1986. A carbon-13 nuclear magnetic resonance study of chemical processes involved in the isolation of Klason lignin. *Holzforschung*, 40, 5,267-272.

- Lee, D.S.; Perlin, A.S., 1983. Use of methanolysis in the characterisation of O-(2-hydroxypropyl)cellulose by C-13 NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 124, 172-175.
- Lundquist, K., 1991. ^1H NMR spectral studies of lignins, quantitative estimates of some types of structural elements. *Nordic pulp and paper research journal*, 3, 140-146.
- Lundquist, K.; Kirk, T.K., 1980. Fractionation-purification of an industrial Kraft lignin. *Tappi*, 63, 1 80-82.
- Mandels, M.; Weber, J., 1969. The production of cellulase. *Adv, Chem. Ser.*, 95, 391-414.
- Mansour, O.Y.; Nagaty, A.; Nsagieb, I.A., 1984 Structure of alkali lignin fractionated from *Racinus communis* and Bagasse, IR spectra. *J. Macromol. SCI.-CHEM.*, A21(6&7), 801-823.
- Matsumoto, Y.; Ishizu, A.; Nakano, J., 1983. Studies on chemical structure of lignin by ozonation. Department of forest products faculty of agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 113 pages.
- Miyakoshi, T.; Chen, C.L., 1992. ^{13}C NMR spectroscopic studies of phenylcoumaran and 1,2-diarylpropan type lignin model compounds. *Holzforschung*, 46, 1, 39-46.

- Mörck, R.; Kringstad, K.P., 1985. ^{13}C -NMR spectra of Kraft lignins. Part II, Kraft lignin acetates. *Holzforschung*, 39, 2, 109-119.
- Mörck, R.; Yoshida, H.; Kringstad, K.P., 1986. Fractionation of Kraft lignin by successive extraction with organic solvents. *Holzforschung*, 40, suppl., 51-60.
- Pasto, D.J.; Johnson, C.R., 1979. Laboratory text for organic chemistry. Prentice-Hall, New Jersey, 542 pages.
- Peters, D.G.; Hayes, J.M.; Hieftje, G.M.; 1974. Chemical separations and measurements, theory and practice of analytical chemistry. WB Saunders Company, 749 pages.
- Pharmacia, 1970. Sephadex, gel filtration theory and practice. Appelbergs Boktryckeri, 64 pages.
- Pilipchuk, Y.S., et al. 1986. The identification of absorption frequencies of the hydroxyl and ester groups of lignin. *Izvestia Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Lesnoi Zhurnal*, 11, 1, 131-133.
- Pla, F.; Dolk, M.; Yan, J.F.; McCarthy, J.L., 1986. Lignin 23 macromolecular characteristics of alkali lignin and organosolv lignin from black cottonwood. *Macromolecules*, 19, 1471-1477.

- Preston, C.M.; Rusk, A., 1990. A bibliography of NMR applications for forestry research. Pacific Forestry Centre Information Report BC-X-332, Forestry Canada, Victoria, 24 pages.
- Ralph, J., 1993. ^1H NMR of acetylated β -ether lignin model trimer. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 31, 357-363.
- Robert, D.; Chen, C.L., 1989. Biodegradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium* : quantitative analysis of biodegraded spruce lignin by C-13 NMR spectroscopy. *Holzforschung*, 43, 5, 323-332.
- Robert, D.; Mollard, A.; Barnoud, F., 1989. ^{13}C NMR qualitative and quantitative study of lignin structure synthesised in *Rosa galuca* calluses. *Plant Physiol. Biochem.*, 27, 2, 297-304.
- Sakagami, H.; Kawazoe, Y.; Komatsu, N.; Simpson, A.; Nonoyama, M.; Konno, K., Yoshida, T.; Kuroiwa, Y.; Tanuma, S., 1991. Antitumor, antiviral and immunopotentiating activities of pine cone extract: potentiel medicinal efficacy of natural and synthetic lignin-related materials. *Anticancer Research*, 11, 881-888.
- Salud, E.C.; Exconde, A.M., 1984. Production of lignin derivatives from philippine woods. *FPRDI Journal*, 13, 3-4.
- Sanders, J.K.M.; Hunter, B.K., 1988. Modern NMR spectroscopy: A guide for chemist. Oxford University Press, 308 pages.

- Sarkanen, K.V.; Ludwig, C.H., 1971. "Lignins", Wiley Interscience, New York, 292 pages.
- Schaefer, J.; Sefcik, M.D.; Stejskal, E.O.; McKay, R A., 1981. Characterization of catabolic transformation of lignin in culture using magic-angle carbon-13 NMR, *Macromolecules*, 14, 557-559.
- Schoemaker, H.E.; Meijer, E.M.; Leisola, M.S.A.; Haemmerli, S.D.; Waldner, R.; Sanglard, D.; Schmidt, H.W.H., 1989. Oxydation and reduction in lignin biodegradation, In plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation, ACS Symposium series 399, Lewis, Norman G., Paice, Michael G. (Eds) American chemical society, Washington, 454-471.
- Schraml, J.; Bellama, J.M., 1988. Two dimensional NMR spectroscopy. *Chemical Analysis*, volume 97. Wiley-interscience publication, New York, 220 pages.
- Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morill, T.C., 1991. Spectrometric identification of organic compounds. 5 ed, Ed. John Wiley & sons, New York, 419 pages.
- Sjöholm, R.; Holmbom, B.; Akerback, N., 1992. Studies of photodegradation of spruce lignin by NMR spectroscopy. *J. of Wood Chem. and Technol.*, 12, 1, 35-52.

- Umezawa, T., 1988. Mechanisms for chemical reactions involved in lignin biodegradation par *Phanerochaete chrysosporium*. Wood Research Institute Kyoto University, Uji, Japan, 79 pages.
- Trojanowsky, A.; Milstein, O.; Majcherczyk, A. & Haars, A., 1987. Colloq. INRA 40 (Lignin Enzymic Microb. degrad.), 223-229
- Umezawa, T.; Higuchi, T., 1991. Chemistry of lignin degradation by lignin peroxidases. Dans ACS symposium series 460, enzyme in biomass conversion. American Chemical Society, Washington, DC, 236-246.
- Watanabe, T.; Koshijima, T., 1988. Application of ATP pulse sequence to facilitate C-13 NMR analysis of lignin. Wood Res., 75, 41, 13-20.

ANNEXE 1

La lignine étant un polymère très complexe, la caractérisation de ce type de molécule est un travail de longue haleine. Les résultats de l'interprétation des spectres RMN ^{13}C à l'état solide (CP/MAS) ont été présentés dans le texte sous forme de structure avec les déplacements chimiques associés à chacun des carbones représentés. Avant d'arriver à ce type de résultats, une interprétation beaucoup plus détaillée a été réalisée. Les tableaux qui suivent présentent les résultats de cette analyse des données qui a été réalisée en comparant les données expérimentales avec celles de la littérature. Les références cités dans ces tableaux sont les suivantes:

- 1- Kringstad, K.P. & Mörk, R., 1983.
- 2- Silverstein, R.M. *et al.*, 1991.
- 3- Lee, D.S., & Perlin, A.S., 1983.
- 4- Lapierre, C., & Monties, B., 1987.
- 5- Mörk, R., *et al.*, 1986.
- 6- Watanabe, T., & Koshijima, T., 1988.
- 7- Eviliya, E., 1989.
- 8- Robert, D., & Chen, C.L., 1989.
- 9- Hassi, H.Y., *et al*, 1989
- 10- Himmselbach, D.S., & Barton, II, F.E., 1980.
- 11- Fukagawa, N., *et al*, 1991.
- 12- Robert, D., *et al* 1989.
- 13- Leary, G.J., *et al*, 1986.
- 14- Sjöholm, R., *et al.*, 1992.
- 15- Fukagawa, N., *et al.*, 1992.
- 16- Bock, K., & Pedersen, C., 1983.

TABLEAU 1

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(192 à 184 ppm)

Aldéhydes et cétones conjugués $>C=O$

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
1	192,195	7	C-alpha aldéhydes (isoeugénol)
2	190,470	2	carbone du carbonyle (conjugué ou saturé)
3	189,673	2	carbone du carbonyle (conjugué ou saturé)
4	188,817		---
5	188,215		---
6	187,651		---
7	187,024		---
8	186,684		---
9	186,333		---
10	185,542		---

TABLEAU 2

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(183 à 159 ppm)

Acides carboxyliques -COOH

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
1	177,634		---
2	176,564	10	CO (esters aliphatiques ou acétyl) C6 des acides uroniques, Cg de l'acide uronique
3	176,162	10	CO (esters aliphatiques ou acétyl) C6 des acides uroniques, Cg de l'acide uronique
4	175,384	1	Cγ composé #29
5	174,874	1	Cγ composé #29
6	174,645	1	Cγ composé #29
7	174,431	1	Cγ composé #27
8	173,916	1	Cγ composé #27
9	173,538	1	Cγ composé #27
		5	COOH (guaiacyl-CHOH-COOH)
10	172,682	1	Cβ composé #17 Cβ composé #19
11	172,128	1	Cβ composé #19
12	171,510	8	C=O dans R-O-CH ₂ COOH
13	170,476	14	C=O dans les COOH non conjugués
14	170,028	14	C=O dans les COOH non conjugués
15	169,596	8	C=O dans R-O-CO-CH ₃
16	169,018	6	C=O dans acetoxy phénolique
17	168,545		

Les numéros de composé font référence à ceux cités par l'auteur dans la référence

TABLEAU 2

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(183 à 159 ppm)

Acides carboxyliques -COOH

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
18	167,543		
19	167,354		
20	167,087		
21	166,625		
22	166,188		
23	165,713		
24	165,348		
25	165,178		
26	164,754		
27	164,190		
28	163,404		
29	162,810		
30	162,505		
31	161,814		
32	161,595		
33	161,036		
34	160,216	--	---
35	159,487		
36	159,176		

TABLEAU 3

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(156 à 125 ppm)

Carbones aromatiques quaternaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	interprétations
1	158,485	9	C-1 dans I-OCH ₃
2	158,290		---
3	158,058	10	C-4 dans p-coumaryle avec C-4 étherifié ou non -substitué et CO dans l'acétyl
4	157,597	9	C-1 dans I-OH
5	157,135	9	C-1 dans I-OH
6	156,522	8 et 14	C-4 des unités aromatiques
7	155,968	8 et 14	C-4 des unités aromatiques
8	155,725	10	C-4 dans p-coumaryle avec C-4 étherifié ou non-substitué et CO dans l'acétyl
9	155,331		---
10	155,204	10	C-4 dans p-coumaryle avec C-4 étherifié ou non-substitué et CO dans l'acétyl
11	154,851	7	guaïacyle avec x-CO
12	154,572		---
13	154,213		---
14	154,073	2	Carbone aromatique oxygéné en C-3 et C-4 pour le guaïacyle
15	153,727		---

TABEAU 3 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(156 à 125 ppm)

Carbones aromatiques quaternaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	interprétations
16	153,066	9	C-3 dans composé VI, VII et VI-CHOH-CH ₃
17	152,469	9	C-3 dans composé VI-CHOH-CH ₃
18	152,269	---	---
19	152,08	4	C-3 /C-5 de l'unité 4-O-5'
20	151,789	1	C-4 des composés (no,13 et 31)
21	150,933	---	---
22	150,671	1	C-4 des composés (no,3 et 43,2) C-3 du composé (no,49,2)
23	150,258	---	---
24	150,136	1	C-3 des composé (no,2, 31 et 57,1) C-4 des composés (no.3, 8, 14, 43.1 et 43.2)
25	149,810	---	---
26	149,761	1	C-3 des composé (no. 2, 31, 43.1 et 57.1} C-4 des composés (no.8 et 14)
27	149,664	---	---
28	149,324	1	C-3 dans composé (3, 31, 43,1, 43.2)
		8	C-3 dans les unités guaiacyl éthérifiées
		9	C-3 et C-4 de l'unité A du composé no.28 et 31
29	149,116	---	---

TABLEAU 3 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(156 à 125 ppm)

Carbones aromatiques quaternaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	interprétations
30	149,081	---	
31	148,765	---	
32	148.508	---	
33	148.376	---	
34	148.041	---	
35	147.363	9	C-3 unité A composés no.27 et 30
36	147.258	9	C-3 composé no.5 C-1 composé no.9
37	146.796	9	C-4 composé no.27
38	146.237	1	C-4 dans composé (no.39, 42.2, 57.2)
		9	C-3 unité B du composé no.27 et no.28 C-4 unité A composé no.30
39	146.043	---	
40	145.859	1	C-4 dans composé (no. 17, 20, 42.1 et 52.2)
41	145.422	1	C-4 dans composés (17, 20, 27, 39, 56.2, 57.2)
		4	Unités guaiacyle non-éthérifiée en C-4
42	145.009	1	C-3 dans composés (14, 27, 55) C-4 dans composé 56.2
		9	C-3 unité B composé no.30 et 31
43	143.940	1	C-alpha du composé 31 C-3 du composé 57.2
		9	C-4 unité B du composé no.28

TABLEAU 3 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(156 à 125 ppm)

Carbones aromatiques quaternaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	interprétations
44	143.613	1	C-4 composé 27, C-β composé 42.1
		9	C-4 unité B du composé no.27, 30 et 31
45	141.971	1	C-4 composés (12, 54, 56.1)
			C-1 composé 52
46	140.173	1	C-β composés (39 et 42.2)
			C-4 composé no.55
		6	unités guaiacyle acétylée (alpha-OR)
47	139.809	12	C-4 dans l'unité guaiacyle
48	139.360	12	C-4 dans l'unité guaiacyle
49	139.007	1	C-1 dans composé (no.20)
		7	C-1 dans syringyle
50	138.496	1	C-1 composé (no. 29)
51	138.024	1	C-1 composé (no.26, 29)
		4	C-1 dans unités syringyle étherifiées, syringarésinoles
52	137.757	1	C-1 composé (no.26, 29)
		4	C-1 dans unités syringyle étherifiées, syringarésinoles
53	137.416	9	C-4 composé VI
54	137.076	1	C-alpha composé no.26
55	136.420	1	C-1 composé no.8
56	136.261	1	C-1 composé no.8
57	135.788	1	C-1 composé no.57.1
		9	C-5 unité B composés no.30 et 31

TABLEAU 3 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(156 à 125 ppm)

Carbones aromatiques quaternaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	interprétations
58	135.084	1	C-1 composé no.19
		8	C-1 dans les unités guaiacyle étherifiées
59	134.535	9	---
60	134.098	1	C-5 composé no.57.2
61	133.577	1	C-1 composé no.57.2
		9	C-5 unité B composé no.27
62	133.212	9	C-5 unité B composé no.28 et 31
63	132.994	1	C-1 composé no.56.2
		9	C-1 unité B composé no.30
			C-1 unité A composé no.31
64	132.678	1	C-1 composé no.27
		9	C-1 unité A composé no.28
65	132.203	1	C-1 composé 43.1
66	131.754	9	C-1 unité A composé no.28
67	131.609	9	C-1 unité B composé no.27
68	130.953	9	C-1 unité A composé no.27 et 30
		12	C-2/C-6 dans unités aromatiques
69	130.637	8	C-1 dans les unités guaiacyle non-éthérifiées
70	130.448	6 et 7	C-1 dans phénylcoumaran
71	130.102	---	
72	130.064	---	

TABLEAU 3 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(156 à 125 ppm)

Carbones aromatiques quaternaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	interprétations
83	126.238	1	C-1 composé no.17 C-2 composé no.26 C-4 composé no.29 C-5 composé no.55
84	125.642	1	C-1 composé no.42.1
85	125.515		---
86	125.291	1	C-alpha composé no.39

TABLEAU 3 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire

(156 à 125 ppm)

Carbones aromatiques quaternaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	interprétations
73	129.349	1	C-2 composé no.19 C-3 composé no.29
		10	C2/C6 de l'alcool p-coumaryle et C-β de l'alcool cinnamyl
74	129.057	1	C-1 composé no.12 C-3 composé no.26
75	129.184		---
76	128.460	1	C-3 composé no.19 C-2 composé no.29 C-1 composé no.55 et 56.1
77	128.072	1	C-5 composé no.12 C-3 composé no.22
78	127.872		---
79	127.707	1	C-4 composé no.26 C-1 composés no.31 et 54 C-5 composé 56.1
80	127.526	1	C-5 composé no.55
81	127.172	1	C-1 composé no.42.2
82	126.724	1	C-4 composé no.19 C-2 compos. no.22

TABLEAU 4

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(124 à 107 ppm)
Carbones aliphatiques tertiaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
1	124.513	10	C-1 dans l'alcool cinnamyl, les acides et les esters
2	124.348		---
3	124.246	1	C-1 composé no.13
4	124.027		---
5	123.711	14	C-6 dans les unités guaiacyl avec un CO
6	123.468		---
7	123.133		---
8	122.836	1	C-1 composé no.14 C-6 composés no.54 et 56.1
9	122.788		---
10	122.496	1	C-6 composés no. 13, 14, 31, et 39
11	122.38		---
12	122.021	1	C-1 composés no.3, 14 et 43.2 C-6 composé no.17
13	121.500		---
14	121.262		---
15	121.135	1	C-1 composé no.2 C-6 composés no.43.2, 55 et 56.2
16	120.795	1	C-6 composé no.12
17	120.660		---
18	120.285		---
19	120.382	1	C-6 composé 43.1 et 52
		9	C-4 composés no.2 et 3
20	119.882		---

TABLEAU 4 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(124 à 107 ppm)

Carbones aliphatiques tertiaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
21	119.774	1	C-6 composé no.8
		9	C-6 composé no.5
22	119.580		---
23	119.386		---
24	119.045	1	C-6 composé no.27
		9	C-6 composé no.27, 28 et 30
25	118.802		---
26	118.413	1	C-6 composé 42.1
27	118.224	1	C-6 composé no.20
28	118.195		---
29	117.938		---
30	117.720		---
31	117.466	1	C-6 phénylcoumarane
32	117.374		---
33	117.247	10	C-5 dans coniféryl, C-3/5 dans p-coumaryl avec alpha-β insaturé et C-β dans cinnamic
34	117.015	1	C-1 unité B composé no.27
35	116.645		---
36	116.494		---
37	116.262		---
38	116.164	1	C-5 composés no. 3, 17, 42.2, 43.2 et 56.2
			C-2 composé no.27
		9	C-5 unité A composé no.30

TABLEAU 4 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(124 à 107 ppm)

Carbones aliphatiques tertiaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
39	115.940		---
40	115.873	1	C-5 composés no.8, 13, 20, 27,39, 42.1 et 56.2
		9	C-5 unité A composé no.30 C-5 unité B composé no.31 C-2 composé 1
41	115.581		---
42	115.206		---
43	115.168		---
44	114.925		---
45	114.841	1	C-2 composés no. 17 et 55
		9	C-5 composé no.5
46	114.623		---
47	114.598	1	C-2 composés no.43.2 et 56.2
48	114.415		---
49	114.112	1	C-2 composés no.3, 13 et 14 C-β composé no.26 C-5 composé 57.1
		9	C-2 composés no.2 et 3
50	113.821		---
51	113.510		---
52	113.335	1	C-2 composés no.3, 14, 39,57.1 C-5 composé no. 43.1
		9	C-6 composés no.27 et 28
53	113.262		---

TABLEAU 4 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(124 à 107 ppm)
Carbones aliphatiques tertiaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
54	112.835	1	C-2 composés no.43.1 et 57.1 C-5 composé no.57.1
55	112.606	1	C-2 composés no.8 et 12 C-5 composé no.31 C-Alpha composé no.42.1
		9	C-2 composé no.30 C-5 composé no.31
56	112.509		---
57	112.228		---
58	112.120		---
59	111.912	1	C-2 composés no.31 et 57.2
		9	C-5 composé no.28
60	111.644		---
61	111.377	1	C-2 composés 54, 56.1 et 57.2 C-2 II-CH ₂ OH
62	111.256		---
63	111.086	1	C-2, composé no.20 C-alpha composé no.42.2
		9	C-2 composés no.27, 30, 31
64	110.880		---
65	110.521		---
66	110.176	1	C-2 composé no.42.1
		9	C-2 composés no.28, 30 et 31

TABLEAU 4 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
 (124 à 107 ppm)
 Carbones aliphatiques tertiaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
67	109.871	9	C-2 composé no.27
68	109.646		---
69	109.568	1	C-2 composé no.42.2
70	109.336		---
71	109.287	1	C-2 composé no.42.2
72	108.888		---
73	108.961		---
74	108.510		---
75	108.28		---
76	108.037		---
77	107.527		---
78	107.308	9	C-2 composé V(R-H)
79	107.149	9	C-2 composé VI(R-H) et VII(R-H)

TABLEAU 5

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(107 à 58 ppm)
Carbones aliphatiques oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
1	106.566	9	C-2 composés V(R-H), VI(R-H)
2	106.263	9	C-2 composé VII(R-H)
3	106.069	9	C-2 composé V
4	105.777	9	C-2 composé VI
5	105.253	9	C-2 composé VII
		5	C-2 et C-6 unités syringyles
6	105.132		---
7	105.024	9	C-2 composé VII
8	104.927	5	C-2 et C-6 unités syringyles
9	104.233	12	C-2/C-6 dans les unités syringyles étherifiées ou non
10	104.014	5	C-2 et C-6 unités syringyles
11	103.066	9	C-2 composé VI-CHOH-CH ₃
12	102.837		---
13	102.375		---
14	102.205	11	unité d'hydrates de carbone
15	101.973	5	C-2 unités syringyles
16	101.754		---
17	101.317		---
18	100.966		---
19	100.893	5	unités d'hydrate de carbone
20	100.771		---
21	100.199		---
22	99.932		---
23	99.678	5	C-1 unité hydrate de carbone
24	99.130		---

TABLEAU 5 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(107 à 58 ppm)
Carbones aliphatiques oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
25	99.081		---
26	98.900		---
27	98.498		---
28	98.268		---
29	98.196		---
30	98.074		---
31	97.661		---
32	97.326		---
33	97.005		---
34	96.981		---
35	96.335		---
36	95.984		---
37	95.868		---
38	95.304		---
39	93.759		---
40	93.273		---
41	92.739	1	C- α composé no.57.1
42	92.048		C- α composé no. 57.1
43	91.961		---
44	91.305		---
45	90.833		---
46	90.066		---
47	89.642		---
48	89.410	6	C- β de l'unité β -aryl éther (thréo-1)
49	89.399		---

TABLEAU 5 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(107 à 58 ppm)
Carbones aliphatiques oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
50	89.253		---
51	89.132		---
52	88.754		---
53	88.292		---
54	88.049		---
55	87.989	6 et 11	C- α dans phénylcoumarane
56	87.879		---
57	87.611		---
58	87.587	12	C- β de l'unité syringyle de type β -O-4
59	87.368	14	C- β de l'unité β -O-4 (thréo), - β dans les unités β - β
60	86.980	6	C- β de l'unité β -aryl éther (érythro-1)
		8	C- α de l'unité β - β
61	86.799	2	C- β , CHO dans l'unité guaïacyle de type β -O-4 (thréo)
		8	C- α dans l'unité β - β
62	86.118	8	C- β dans l'unité guaïacyle de type β -O-4 (thréo)
63	85.959		---
64	85.827	4	C- β dans β -O-4
65	85.438		---
66	85.279		---
67	84.787	12	C- β dans l'unité guaïacyle de type β -O-4
68	84.660		---
69	84.525		---
70	82.296		---
71	83.942		---

TABLEAU 5 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(107 à 58 ppm)
carbones aliphatiques oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
72	83.834		---
73	83.772	8 et 14	C-β dans l'unité guaïacyle de type β-O-4 (érythro)
74	83.383		---
75	83.286	6	C-α dans β-éther
76	82.935		---
77	82.595	6	C-β dans β-aryl éther (érythro-2)
78	82.425		---
79	82.060		---
80	81.939	1	C-α dans composé no.43.1
81	81.526		---
82	81.318		---
83	81.210		---
84	80.953		---
85	80.880		---
86	80.710	6	C-β dans β-O-4 (thréo)
		14	C-β dans β-O-4 avec α-CO
87	80.578		---
88	80.383		---
89	80.103		---
90	79.995	6	C-β dans β-O-4 (thréo)
		14	C-β dans β-O-4 avec α-CO
91	79.849		---
92	79.509	15	C-β dans β-O-4' (érythro et thréo)
93	78.998		---
94	77.953		---
95	75.134		---

TABLEAU 5 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(107 à 58 ppm)
carbones aliphatiques oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
96	75.086	6 et 12	C- α dans β -O-4 (thréo)
97	74.891	3	C-3 dans " α (méthyl O-(2-hydroxypropyl)- α,β -D-glucopyranosides C-2 dans " β (méthyl O-(2-hydroxypropyl)- α,β -D-glucopyranosides
98	74.027	1	C- β du composé no.43.1
99	73.541	3	C-5 dans " α (méthyl O-(2-hydroxypropyl)- α,β -D-glucopyranosides
100	72.461	---	---
101	72.316	---	---
102	71.830	8 12 14	C- α dans unité guaiacyle de type β -O-4 (érythro) C- γ dans unité β - β C- α dans unité β -O-4 (érythro)
103	70.917	3 8 et 14	C-4 dans " α (méthyl O-(2-hydroxypropyl)- α,β -D-glucopyranosides C-4 dans " β (méthyl O-(2-hydroxypropyl)- α,β -D-glucopyranosides C- α dans les unités guaiacyles de type β -O-4 (thréo)
104	70.115	8	C- α OCH ₂ - dans l'unité Ar-OCH ₂ -CH ₂ OH
105	69.508	---	---
106	68.779	---	---
107	68.268	---	---
108	68.136	1	C- α du composé no.20
109	67.990	---	---
110	67.456	1	C- γ du composé no.39

TABLEAU 5 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(107 à 58 ppm)

Carbones aliphatiques oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
111	66.872	1	C- γ du composé no.39
112	66.459		---
113	65.682	6	C- γ dans phénylcoumarane et alcool cinnamyle
114	65.425	8	C- α dans l'unité Ar-OCH ₂ -COOH
		12	C- γ dans unité β -5
115	65,317		---
116	65.279		---
117	64.953		---
118	64.429		---
119	63.932		---
120	63.578	1	C- α composé no.8
121	36,422		---
122	63.349	14	C- γ dans unité β -O-4 avec α -CO
123	63.203		---
124	62,984		---
125	62,606		---
126	62.595		---
127	62.266		---
128	61.974		---
129	61.464		---
130	61,065		---
131	60.687		---
132	60.093		---
133	59,704		---
134	59.655		---
135	58.500		---

TABLEAU 6

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(57 à 54 ppm)
Carbones aliphatiques tertiaires

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
1	57,771	---	
2	57,541	---	
3	57,139	---	
4	56,556	---	
5	56,385	---	
6	56,264	---	
7	55,961	---	
8	55,864	---	
9	55,632	---	
10	55,438	---	
11	54,771	---	
12	54,163	---	

TABLEAU 7

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(54 à 31 ppm)
Carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
1	53.726		---
2	53,677		---
3	53.143		---
4	52,861		---
5	52.74		---
6	52.303		---
7	52.171		---
8	51,938		---
9	51.598		---
10	51.039		---
11	50.942	6	C-β dans β-1 et dans phénylcoumarane
12	50.591		---
13	50.372		---
14	50,154		---
15	49.965		---
16	49.508		---
17	49.314		---
18	49.265		---
19	49.120	5	-CH-
20	48.744	5	-CH-
21	48.512		---
22	48.477		---
23	48.088		---

TABLEAU 7 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
 (54 à 31 ppm)
 Carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
24	47.918		---
25	47.564	5	-CH-
26	47.419		---
27	46.981		---
28	46.762	5	-CH-
29	46.630		---
30	46.314		---
31	46.168		---
32	45.707	1	C-β du composé no.57.1
33	45.318		---
34	45.134	5	-CH-
35	44.905		---
36	44.794	5	-CH-
37	44.370	5	-CH-
38	43.890		---
39	43.555		---
40	43.312		---
41	43.142		---
42	43.058		---
43	42.693		---
44	42.315		---
45	42.091		---
46	41.902	2	C-3 dans l'unité isohexane
47	41.538		---
48	41.489	1	C-alpha composé no.19

TABLEAU 7 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
 (54 à 31 ppm)
 Carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
49	40.944	1	C-alpha composé no.17
50	40.876		---
51	40.371	1	C-alpha composé no.29
52	40.099		---
53	39.705		---
54	39.437		---
55	39.340		---
56	38.538	2	C-3 dans 2,2,3-triméthylbutane
57	38.174		---
58	37.966		---
59	37.372	1	C-alpha composé no.57.2
60	37.007		---
61	36.672	5	carbone aliphatique
62	36.545		---
63	36.235		---
64	36.035	1	C-alpha composé no.27
65	35.816	2	C-3 dans 2,3-diméthylpentane
66	35.676		---
67	35.074	1	C-alpha composé no.56.2
68	34.637	2	C-3 du pentane
69	34.067	1	C-alpha composé no.52
70	33.854		---

TABLEAU 7 (suite)

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(54 à 31 ppm)

Carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés)

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
71	33.459	5	carbone aliphatique
72	33.241		---
73	32.930		---
74	32.790	2	C-3 des alcanes aliphatiques
75	32.425	2	C-3 des alcanes aliphatiques
76	32.377		---
77	32.026	2	C-3 des alcanes aliphatiques
78	31,964		---
79	31.842	1	C-B composé no.52
80	31.521		---
81	31.224	2	C-1 des alcanes aliphatiques
82	31.102		---

TABLEAU 8

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(30 à 13 ppm)
Carbones aliphatiques non-oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
1	30.908	2	C-2/C-4 des alcanes aliphatiques
2	30.749		---
3	30.651	2	C-4 /C-5 des alcanes aliphatiques
4	30.451		---
5	30.325	1	C-β composé no.27
6	29.825		---
7	29,655		---
8	29.571	2	C-4 des alcanes aliphatiques
9	29,334		---
10	28.969	2	C-1 du 2,2-diméthylbutane
11	28.756	2	C-2 alcanes aliphatiques
12	28.308	2	C-2 alcanes aliphatiques
13	27.919		---
14	27.808	2	C-2 alcanes aliphatiques
15	27.606		---
16	27.384	2	C-1 dans 2,2,3-triméthylbutane
17	27.049		---
18	26.612		---
19	26.520		---
20	25.975		---
21	25.878	1	C-β composé no.20
22	25.343		---
23	25.076	2	C-2 alcanes aliphatiques
24	24.916	2	C-2 2,3 diméthylpentane

TABLEAU 8

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
 (30 à 13 ppm)
 (Carbones aliphatiques non-oxygénés)

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
25	24.722		---
26	24.236	1	C-β composé no.57.2
27	23.788	2	C-2 nonane
28	23.599		---
29	23.283	2	C-2 al canes aliphatiques
30	23.088		---
31	22.924	2	C-2 al canes aliphatiques
32	22.476		---
33	22.219		---
34	22.014	2	C-2 al canes aliphatiques
35	21.868		---
36	21.601		---
37	21.509	2	C-1 al canes aliphatiques
38	21,077		---
39	20.896		---
40	20,785		---
41	20.683	1	C-alpha composés no.12, 54, 55 et 56.1
42	20.299		---
43	19.924		---
44	19.570	2	C-1 dans 2,3-diméthylbutane
45	19.103	2	C-4 dans 3-méthylpentane
46	19.036		---
47	18.963	5	carbone aliphatique

TABLEAU 8

Déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 pour l'épinette noire
(30 à 13 ppm)

Carbones aliphatiques non-oxygénés

No du signal	Dépl. chimique (ppm)	Réf.	Interprétation
48	18.782		---
49	18.49		---
50	18.204	1	C-gamma composé no.57.1
51	17.475		---
52	17.032		---
53	16.722		---
54	16.314		---
55	16.041		---
56	15.750		---
57	13.223		---

