

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

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

PAR
JOSETTE ROSS
B.Sc. Chimie

ÉTUDE DES COMPOSÉS CHIMIQUES EXTRAITS DES LIXIVIATS ISSUS DE LA
THERMOTRANSFORMATION DU PIN GRIS (*Pinus banksiana Lamb.*)

Mai 2004



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.

À Arianne, Emmanuel et Rémi

« *Cultiver les sciences et ne pas aimer les hommes, c'est allumer un flambeau et fermer les yeux* »

proverbe chinois

RÉSUMÉ

Le bois de structure doit être protégé en vue de prolonger sa durée de vie utile en résistant aux intempéries et à la dégradation biologique. Jusqu'à tout récemment, des agents chimiques de préservation du bois tels que l'arséniate de cuivre chromatée (ACC) ou le créosote furent abondamment utilisés, autant au niveau industriel que chez les particuliers. Plus particulièrement, les bois traités à l'ACC, fréquemment mis à profit dans la construction d'aires de jeux récréatives pour enfant, ont attiré l'attention des différentes instances décisionnelles de nombreux pays. En ce sens, le gouvernement du Canada, appuyé dans sa décision par des recherches sur la toxicité des bois traités à l'ACC, émettait en avril 2002 une note de réévaluation des produits du bois traité à l'ACC visant son élimination progressive. Devant cette conjoncture d'interdiction, plusieurs groupes de recherches concentrent leur effort vers une voie de traitement du bois plus verte, il s'agit du traitement par haute température ou thermotransformation.

La thermotransformation du bois a lieu lorsque celui-ci est soumis à des températures avoisinant 200 °C pendant plusieurs heures. Il existe diverses méthodes pour arriver à une thermotransformation du bois et celle qui fait l'objet d'une implantation tant au niveau industriel que dans la recherche au Saguenay est la technologie « Perdure ». Le procédé « Perdure » se distingue, en partie, des autres technologies par l'utilisation d'eau dans la phase de refroidissement. Cette eau est pulvérisée dans le four directement sur le bois et ruissèle pour ensuite se récupérer par un tuyau d'évacuation. Cette eau se charge en matériel organique et ce résidu est appelé lixiviat. Au niveau chimique, plusieurs réactions ont cours sur les constituants du bois lors de son traitement à haute température. De plus, les principaux polymères du bois, soient l'hémicellulose, la cellulose et la lignine subissent des modifications chimiques qui génèrent des produits de dégradation thermique. La récupération par l'eau de ces produits peut, elle aussi occasionner un effet sur l'identité chimique des constituants du lixiviat et les modifier suffisamment pour leur attribuer de nouvelles propriétés. Compte tenu de son caractère récent, il n'existe que très peu de littératures sur ce sujet précis de la composition chimique du lixiviat issus de la thermotransformation. Dans le cadre de ce travail, le lixiviat généré par la thermotransformation du pin gris (*Pinus banksiana Lamb.*) sera l'objet d'étude.

L'analyse chimique sommaire du lixiviat nécessite une extraction des composés présents par extraction liquide-liquide. Les composés de faible polarité et ceux de polarité intermédiaire sont extraits respectivement avec de l'hexane et de l'acétate d'éthyle. Les rendements d'extraction atteignent 0,099 g par 500 ml de lixiviat pour l'hexane et 0,685 g par 500 ml de lixiviat pour l'acétate d'éthyle. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse révèle que les extraits du lixiviat de pin gris (*Pinus banksiana Lamb.*) se constituent principalement de composés phénoliques simples, de phénylpropanes, de furanes, de furanones, de pyranones, de lactones et de quelques terpènes. Les composés phénoliques et les phénylpropanes présents dans le lixiviat, tels que le guaiacol et le coniferaldehyde, originent de la partielle dégradation thermique de la lignine. Les furanes, furanones, pyranones et lactones proviennent quant à eux de

l'hémicellulose et de la cellulose ayant subit une dislocation de leurs chaînes polymériques dû aux conditions extrêmes qui ont cours dans un four « Perdure ». Simultanément à ce phénomène, s'ajoute la possibilité de réactions de brunissement non-enzymatiques ou réactions de Maillard qui expliqueraient la présence de composés du genre furfural, maltol et lactones observés dans les extraits provenant du lixiviat. L'identification (confirmée par GC/MS) des composés présents dans les extraits du lixiviat atteint près de 90 % dans certains cas.

L'évaluation du potentiel biopharmaceutique des composantes chimiques du lixiviat constitue la voie de valorisation retenue dans ce travail. Les tests effectués avec le lixiviat intégral et les extraits permettent de mettre en lumière un effet inhibiteur de la croissance cellulaire sur des lignées de type DLD-1 (cancer du colon humain) et A-549. (cancer du poumon humain) avec une prédominance pour les cellules de type DLD-1. Le fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle par chromatographie éclair à haute performance (High Performance Flash Chromatography ou HPFC) a permis d'identifier une molécule responsable de l'activité cancéreuse. Il s'agit du coniferaldehyde, un phénylpropane provenant de la dégradation thermique de la lignine qui atteint des valeurs d' IC_{50} de 66 μM sur les DLD-1. Il est important de mentionner qu'une activité anticancéreuse a été observée avec la phase aqueuse résiduelle de l'approche d'extraction. Les composés responsables de cette bioactivité n'ont pas été identifiés dans le cadre de cette étude.

Cette étude s'insère dans le cadre d'un vaste projet de recherche concernant l'implantation dans notre région (Saguenay Lac St-Jean) de la technologie de thermotransformation du bois nommée « Perdure » et son adaptation aux essences de la forêt boréale.

REMERCIEMENTS

Sans la moindre hésitation, mes remerciements vont en premier lieu à mon conjoint Rémi Morel et à mes deux enfants Emmanuel et Arianne Ross-Morel. Sans eux, il m'aurait été beaucoup plus ardu de maintenir ma motivation au travail. Ils ont su être patients et tolérants face à une présence plus effacée à la maison. Ils m'ont permis de garder l'équilibre tout en orientant mes volontés dans l'atteinte des buts fixés dans ce travail.

Dans un deuxième temps, je remercie d'une façon toute particulière, mon directeur de recherche, le docteur André Pichette, professeur chercheur à l'université du Québec à Chicoutimi. M. Pichette a su me faire confiance dans une optique de retour dans le domaine de la chimie après une absence prolongée. Grâce à lui, je ressorts de l'expérience de la maîtrise avec un bagage varié de connaissance et d'enseignement, empreinte subtilement d'une note de pragmatisme essentielle à la science. Je tiens également à dire un merci bien spécial à mon codirecteur de recherche, le docteur Jean Legault, également professeur à l'UQAC. En plus d'être une personne douée d'un dynamisme communicant, il s'est avéré au moment opportun être d'une grande motivation dans la poursuite de mes objectifs de travail. À eux deux, mes deux directeurs ont formé une paire idéale me permettant d'atteindre pleinement, et ce à plusieurs niveaux, les buts fixés dans cette étude.

En terminant, je souhaite démontrer ma plus sincère gratitude à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet. En l'occurrence, Angélique Longtin, Serge Lavoie, Annie Girard, Hélène Gagnon, Dominic Dufour, France-Ida Jean, André Barrette, Stéphane Bergeron (PCI), Kelly Laurent (stagiaire, France) et le dernier sans être le moindre, Tommy Perron. Tommy, en plus de devenir un ami fidèle digne de confiance, s'avère être un excellent scientifique dont le jugement mérite qu'il soit davantage reconnu.

TABLE DES MATIÈRES

• RÉSUMÉ	Page i
• REMERCIEMENTS	Page iii
• TABLE DES MATIÈRES	Page iv
• LISTE DES TABLEAUX.....	Page v
• LISTE DES FIGURES	Page vi
• LISTE DES ANNEXES	Page vii
• Chapitre 1 :Introduction.....	Page 1
1.1 La problématique	Page 2
1.2 Revue de littérature	Page 6
1.2.1 Les constituants chimiques du bois	Page 6
1.2.2 Modification du bois par thermotransformation.....	Page 15
1.2.3 Composition chimique et potentiel de bioactivité du lixiviat ...	Page 18
1.3 Objectifs de la publication.....	Page 23
• Chapitre 2 : la publication: PRELIMINARY ANALYSIS OF THE LIXIVIATE STEMMING FROM THE HEAT TREATMENT BY PERDURE PROCESS OF JACK PINE (<i>Pinus banksiana Lamb.</i>)	Page 24
• Chapitre 3: Résultats et discussion	Page 45
3.1 Extraction par solvant	Page 46
3.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).....	Page 49
3.3 Évaluation de l'activité anticancéreuse des lixiviats	Page 54
• Chapitre 4 : Conclusion.....	Page 60
• Bibliographie	Page 62
• Annexes.....	Page 67

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.1 : Caractéristiques d'opération des principaux procédés de thermotransformation du bois.....Page 17
- Tableau 3.1 : Rendement d'extraction et aspect physique des extraitsPage 47
- Tableau 3.2: Composés majeurs des extraits à l'hexane des lixiviats 1 et 2. Identifiés par GC/MSPage 51
- Tableau 3.3: Composés majeurs des extraits à l'acétate d'éthyle des lixiviats 1 et 2. Identifiés par GC/MS Page 53
- Tableau 3.4 : Résultats des tests de bioactivité sur le lixiviat, les extraits de lixiviats et les fractions des extraitsPage 58
- Table 3.5: Composés majeurs des fractions obtenus par HPFC. Fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle. Identifiés par GC/MS Page 59

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1 : Constituants macroscopiques et microscopiques du bois.....Page 8
- Figure 1.2 : Structure générale des trachéides du bois.....Page 9
- Figure 1.3 : Constituants chimiques des parois secondaires d'une cellule de bois
.....Page 10
- Figure 1.4 : Structure moléculaire de la cellulosePage 11
- Figure 1.5 : Projection plane d'une section de cellulosePage 12
- Figure 1.6 : Structure moléculaire d'hémicellulose du bois de gymnospermes
.....Page 13
- Figure 1.7 : Structure moléculaire d'une section de lignine du bois de gymnospermes ..Page 14
- Figure 1.8 : Réaction acido-catalysée de la dégradation du D-Glucose en furfural et en 5-furaneméthanol.....Page 20
- Figure 1.9 : Similitude entre les produits de dégradation thermique de la lignine et le cinnamaldehyde.....Page 22
- Figure 3.1 : Approche de criblage du lixiviat pour en évaluer sa bioactivité
.....Page 55

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 Chromatogrammes des extraits du lixiviat de pin gris (*Pinus Banksiana Lamb.*) Page 68
- Annexe 2 Chromatogrammes des fractions obtenus par HPFC. Fractionnement d'extrait à l'acétate d'éthyle issu du lixiviat de pin gris (*Pinus Banksiana Lamb.*) Page 70

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1.1 La problématique

Le bois est sans aucun doute l'un des matériaux les plus utilisés dans un grand nombre d'applications. On retrouve des traces de son utilisation par l'espèce humaine qui date de plus de 300 000 ans. Les arbres peuplaient déjà la terre avant même que les ébauches de notre espèce se mettent en place. C'est pourtant en partie grâce au bois des végétaux que l'être humain s'est développé en favorisant l'éclosion des nombreuses utilités de celui-ci, gravissant les échelons de l'évolution un à un. Dans un autre sens et de part ses caractéristiques chimiques et physiques, il peut être considéré encore aujourd'hui comme un matériau moderne, servant tout aussi bien de charpente que de support papier pour l'encre de ce document.

Cependant ce matériau anisotrope n'est pas sans faille et le bois employé dans le domaine de la construction peut se dégrader plus ou moins rapidement lorsque soumis à des intempéries et aux attaques de micro-organismes. Il devient alors largement avantageux de procéder à un traitement lui permettant de maintenir une durée de vie utile accrue. Les traitements chimiques effectués sur le bois ont cours depuis des centaines d'années. Jusqu'à tout récemment, des produits antiparasitaires tels que la créosote et l'arséniate de cuivre chromatée (ACC) étaient abondamment employés en tant qu'agent préservateur du bois à long terme [1]. Ces produits limitent la pénétration de l'eau à l'intérieur de la matrice ligneuse et empêchent également une dégradation par les moisissures en raison de leur action pesticide. Les bois ainsi traités ont une durée de vie prolongée et leur usage réduit la pression sur la demande forestière. Malheureusement, ils ne sont pas sans danger et quelques études semblent indiquer qu'il existe un danger potentiel pour la population à les employer [2]. Le risque s'accroît d'autant plus concernant la contamination environnementale engendrée aux abords des usines destinées aux traitement chimique du bois [3-4].

L'arséniate de cuivre chromatée (ACC) faisait figure de proue en matière de traitement chimique. Ce dernier était jusqu'à tout dernièrement l'agent préservateur le plus commun autant en Amérique du Nord que sur les autres continents [5]. Les bois traités à

l'ACC se retrouvent principalement dans les structures soumises aux intempéries tels que les constructions en milieu aquatique ou les aires de jeux extérieurs pour enfants [2,5-6]. Il devient alors aisément de comprendre l'importance de limiter les sources potentielles de contamination sur les enfants qui jouent sur les structures fabriquées à partir de bois traités à l'ACC. Il a également été rapporté des empoisonnements à l'arsenic sur du bétail ayant ingéré des cendres issues de l'incinération de pièce de bois traités à l'ACC [7]. Quoique les preuves d'un danger prédictible et tangible de la circulation de l'ACC dans notre environnement ne soient pas encore suffisamment éloquentes, il demeure néanmoins des risques à plusieurs niveaux et en ce sens, la prudence demeure toujours de mise.

En avril 2002, le gouvernement canadien via l'agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) publiait une note de réévaluation concernant l'utilisation de l'arséniate de cuivre chromatée (ACC) [8]. Cet avis faisait état de la transition volontaire des fabricants d'agents de préservation du bois vers l'abandon des produits à base d'ACC. Par conséquent, les industries de traitement du bois ne sont plus en mesure de se procurer ce produit de préservation et doivent donc procéder autrement pour le traitement du bois à des fins non industrielles. Parallèlement, les bois traités à l'ACC continueront d'être utilisé dans le secteur industriel (construction d'autoroute ou dans la fabrication de poteaux de lignes de transmission). Cette approche d'élimination progressive de produits de préservation à risque va dans une direction semblable tant en Amérique du Nord qu'en Europe [9]. Cette étape de transition vers une interdiction des bois traités à l'ACC ouvre donc la porte à une émergence de nouveaux traitements du bois plus sécuritaires pour l'environnement et pour la population.

C'est précisément en raison de ce contexte socio-économique que plusieurs groupes de recherche orientent des efforts soutenus dans le développement de nouveaux procédés de traitement de préservation du bois. L'une des avenues possibles vers laquelle se tournent certaines industries et chercheurs se nomme la thermotransformation du bois ou traitement à haute température. Plusieurs techniques de traitements à haute température sont à l'étude présentement un peu partout sur la planète. Parmi ces procédés de traitement, certains d'entre eux font l'objet d'une commercialisation plus poussée. Notamment en France

(procédé de rétification « Now ») [11] et en Finlande où la technologie VTT permet de produire une vaste gamme de bois thermotransformé dans plus de 10 usines réparties à la grandeur du pays. La Finlande est de plus aujourd’hui le premier pays producteur en volume de bois traité par haute température [12].

Certaines technologies de thermotransformation sont présentement en voie d’implantation au Québec. Ainsi, le groupe de recherche sur la thermotransformation du bois (GRTB) de l’université du Québec à Chicoutimi travaille en étroite collaboration avec la compagnie Pluri-Capital Inc. (PCI) de Jonquière à adapter la technologie française « Perdure » à nos essences régionales. Il va sans dire que cette nouvelle voie de traitement du bois présente un intérêt bien particulier puisque l’industrie forestière au Québec joue un rôle prépondérant dans l’économie québécoise. De plus, le secteur forestier œuvre principalement dans la transformation primaire et les produits du bois issus de la deuxième et troisième transformation (produits finis) font l’objet de peu d’exploitation jusqu’à maintenant. Il devient alors évident qu’il existe des opportunités économiques réelles visant l’exploitation de la technologie « Perdure ».

Ce procédé de traitement se distingue considérablement des techniques conventionnelles de séchage du bois. Les séchoirs actuels de bois opèrent à des températures avoisinant 100 °C. Cette étape de séchage conventionnel n’a d’autre but que de réduire le taux d’humidité dans la matrice ligneuse afin d’éviter en grande partie les possibilités de torsion et de travail du bois. Le procédé « Perdure » est quant à lui axé davantage sur des transformations physico-chimiques des constituants du bois ayant comme objectif de le rendre imperméable et résistant à la dégradation microbienne [13]. Bien que le bois traité par procédé « Perdure » subisse une perte considérable d’eau, synonyme de séchage, on parlera non pas de séchage mais plutôt de traitement ou thermotransformation. L’appellation est fort à-propos puisque le bois acquiert littéralement une structure chimique modifiée de ses polymères qui le constituent. C’est précisément les transformations chimiques et physiques obtenues par traitement thermique se situant autour de 200 °C qui confèrent au bois une coloration foncée, une stabilité dimensionnelle et une

dureté bonifiée. En plus de son aspect physique remanié, le bois ainsi traité offre une résistance face à la dégradation causée par les microorganismes et les insectes [13-14].

Le but principal recherché du traitement thermique est de réduire la quantité de groupements hydroxyles dans les entités macromoléculaires du bois, réduisant de ce fait son hygroscopicité ainsi que son hydrophilicité [13-14]. Cette transformation est nécessaire pour permettre au bois de résister au déperissement biologique mais ne doit pas être abusive puisque au-delà de 260 °C, la pyrolyse s'amorce de façon beaucoup plus agressive et les propriétés physiques du bois sont alors irrémédiablement atténuées quant sa résistance dimensionnelle [15]. Il existe différentes façons d'éviter ou d'atténuer la pyrolyse du bois. Certains procédés utilisent comme agent régulateur de pyrolyse ménagée, l'azote, la vapeur d'eau ou l'huile [16]. Il est essentiel dans ce type de traitement de limiter la présence d'oxygène puisque cette dernière favorise la combustion du bois, évènement à éviter dans les fours.

L'une des distinctions majeures du procédé « Perdure » comparativement à d'autres technologies de thermotransformation est l'utilisation d'eau en grand volume en guise de gaz écran de même qu'à l'étape du refroidissement. Chaque séquence de séchage (de 6 à 8 m³ de bois) génère plus 250 litres d'eau [17]. Cette eau ayant ruisselée sur les pièces de bois chauffés, entraîne une certaine quantité de produits chimiques susceptibles d'avoir subit des transformations issues de la dégradation thermique du bois, principalement la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Or ces mécanismes de dégradation des composantes polymériques du bois sont bien connus mais les réactions [15-18] possibles des produits de dégradation avec l'eau sont peu connues. Parallèlement, certaines études détaillées [16] démontrent qu'il y aurait davantage de transformations chimiques lors d'un traitement thermique en présence d'eau comparativement à la transformation thermique seule. En fait, ce type de réactions chimiques sur les composantes polymériques du bois origine en partie d'une hydrolyse acide. En réponse à une dégradation partielle de l'hémicellulose plus spécialement, certains constituants formés aux températures de traitement imposées (autour de 200 °C) réagiraient au contact de l'eau pour produire de l'acide formique et de l'acide acétique. La présence de ces acides dans le milieu réactionnel abaisserait le pH

considérablement ayant pour effet de catalyser le traitement en favorisant l'hydrolyse des constituants principaux du bois, soient la cellulose, l'hémicellulose et la lignine [16-19].

Cette eau de refroidissement est nommée lixiviat. Selon sa provenance, elle pourra contenir une certaine quantité de composés chimiques naturels susceptibles de présenter un intérêt de valorisation biopharmaceutique d'un rejet industriel. Également, de part le caractère nouveau de l'utilisation de la technologie «Perdure» aux essences québécoises, aucune étude n'a été publiée dans ce domaine précis de l'analyse du lixiviat de thermotransformation. Par conséquent, le principal objectif de cette étude préliminaire est d'analyser l'extrait de lixiviat issu du traitement «Perdure» du pin gris (*Pinus banksiana Lamb.*) et d'évaluer sommairement de son potentiel de bioactivité.

1.2 Revue de littérature

1.2.1 Les constituants chimiques du bois

Afin de bien saisir les différents changements physiques et chimiques qui ont cours lors du processus de thermotransformation du bois, il importe tout d'abord de connaître les principaux constituants chimiques dont il est composé. Le bois est un matériel anisotrope c'est-à-dire que son apparence est différente en fonction du plan d'observation. Ces différences observables visuellement selon que le bois est coupé de manière transversale, radiale ou tangentielle découlent directement de l'orientation des cellules ligneuses [20]. Ce fait est tout à fait particulier aux végétaux. L'une des grandes différences qu'il existe entre une cellule animale et une cellule végétale se perçoit dans la constitution structurale des parois cellulaires. Les plantes supérieures que sont les arbres évoluent en hauteur parce que les cellules qui forment leur charpente permettent de supporter une masse critique par la rigidité dont sont dotées leurs parois cellulaires. Cette rigidité engendrée par la composition chimique des parois cellulaires s'avère essentielle et joue d'abord et avant tout un rôle mécanique en préservant la forme de l'arbre. Elle définit également l'allure d'une cellule végétale en lui imposant une configuration bien précise au niveau tridimensionnel. Outre le rôle de support structural, les parois cellulaires contribuent aux échanges ioniques, particulièrement au niveau des racines. Elle empêche de plus l'éclatement de la

cellule (cytolysé) en contrignant la pression de turgescence (pression interne) tout en permettant à la cellule végétale de croître et de prendre de l'expansion. Les parois cellulaires représentent la plus grosse partie en masse sèche de la quantité totale de biomasse végétale [20-21].

En guise de rappel, la figure 1.1 présente un modèle général de l'anatomie macroscopique d'un arbre et les différentes parties microscopiques dont il est composé. Afin de retracer l'endroit exact où l'on retrouve les constituants chimiques à l'origine des composés récupérés dans les lixiviats, il convient au préalable d'identifier les structures macroscopiques du bois et plus particulièrement des conifères puisque les lixiviats étudiés sont relatifs à des traitements thermiques effectués sur du pin gris (*Pinus banksiana Lamb.*). À la figure 1.1 A), un schéma général introduit cinq grandes parties de l'arbre [18,20-21]. La première partie, l'écorce, se compose principalement de cellules mortes et joue un rôle de barrière de protection limitant les dégâts provenant des attaques externes et empêche la dessiccation. Le caractère anisotrope de l'écorce se démarque beaucoup moins comparativement aux parties internes du bois. Chimiquement, elle se distingue du bois par une forte présence en polyphénols (dont font partie les flavonoides et les tannins) et en subérine, un plus faible pourcentage d'hydrate de carbone et une grande quantité d'extractibles. C'est d'ailleurs en raison de ces caractéristiques qu'il était d'usage autrefois de tanner les peaux d'animaux à l'aide de solution provenant d'écorce d'arbres. D'où l'expression « tannage » de la peau dérivant des tannins présents dans l'écorce. Les tannins présentent la capacité de précipiter les protéines de la peau et la rendent de ce fait plus imperméable, conséquemment ils la préservent contre la détérioration due aux microorganismes [18,20-21].

La zone cambiale se traduit par une mince couche de cellules vivantes délimitées de part et d'autre par l'écorce et l'aubier. C'est là qu'a lieu la division cellulaire et la croissance radiale. À ce niveau, la cellule végétale se constitue d'une seule paroi primaire remplie de protoplasme et d'un noyau cellulaire. La composition chimique de la paroi cellulaire des cellules du cambium comprend seulement la cellulose et l'hémicellulose. Au fur et à mesure que l'on se rapproche de l'aubier, la lignification s'amorce et les parois

secondaires sont constituées. La lignine n'est donc pas présente au niveau du cambium [18,20-21].

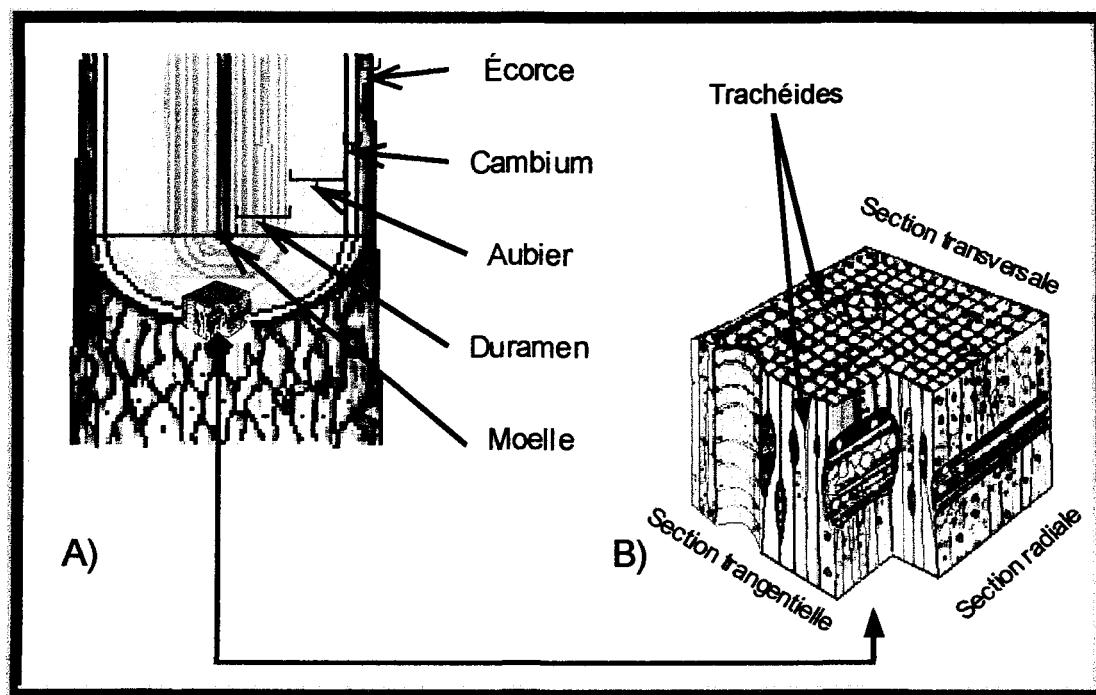


Figure 1.1 : Constituants macroscopiques du bois en A) et microscopiques en B)
[18,21]

Le bois d'aubier se distingue du bois de duramen par ses fonctions, sa constitution et sa couleur parfois très différente. Dans le bois d'aubier, les trachéides sont vivantes et rendent aussi possibles le transport de la sève brute. Bien qu'il procure une stabilité dimensionnelle et mécanique, le bois d'aubier est moins dense que le bois de duramen [18,21-22]. Ce dernier contient une plus faible quantité de lignine et de cellulose, de surcroît, des dépôts d'extractibles amènent souvent une coloration plus foncée dans cette zone [18,21-22]. Le duramen s'en trouve d'autant plus recherché en raison de cette couleur mais aussi par sa résistance mécanique et sa capacité à résister aux moisissures. Cette résistance se réalise grâce à une imperméabilité accrue et à la présence d'extractibles

démontrant des actions fongicides. Quant à la moelle, seule demeure les vestiges des toutes premières cellules de bois.

L'aspect microscopique du bois présenté à la figure 1.1B) illustre bien l'anisotropie du bois. En effet puisque selon la coupe, qu'elle soit transversale, tangentielle ou radiale, l'allure visuelle du bois se perçoit différemment. Le bois de conifère, d'une structure relativement simple, est composé de 90 à 95 % de trachéides, ce sont ces cellules qui procurent la stabilité mécanique et qui contiennent la plus grande quantité de polymères. Ces cellules pouvant atteindre de 1 à 7 mm de longueur, se composent de paroi primaire, de trois parois secondaires et d'une lamelle mitoyenne (figure 1.2) [18,21-22].

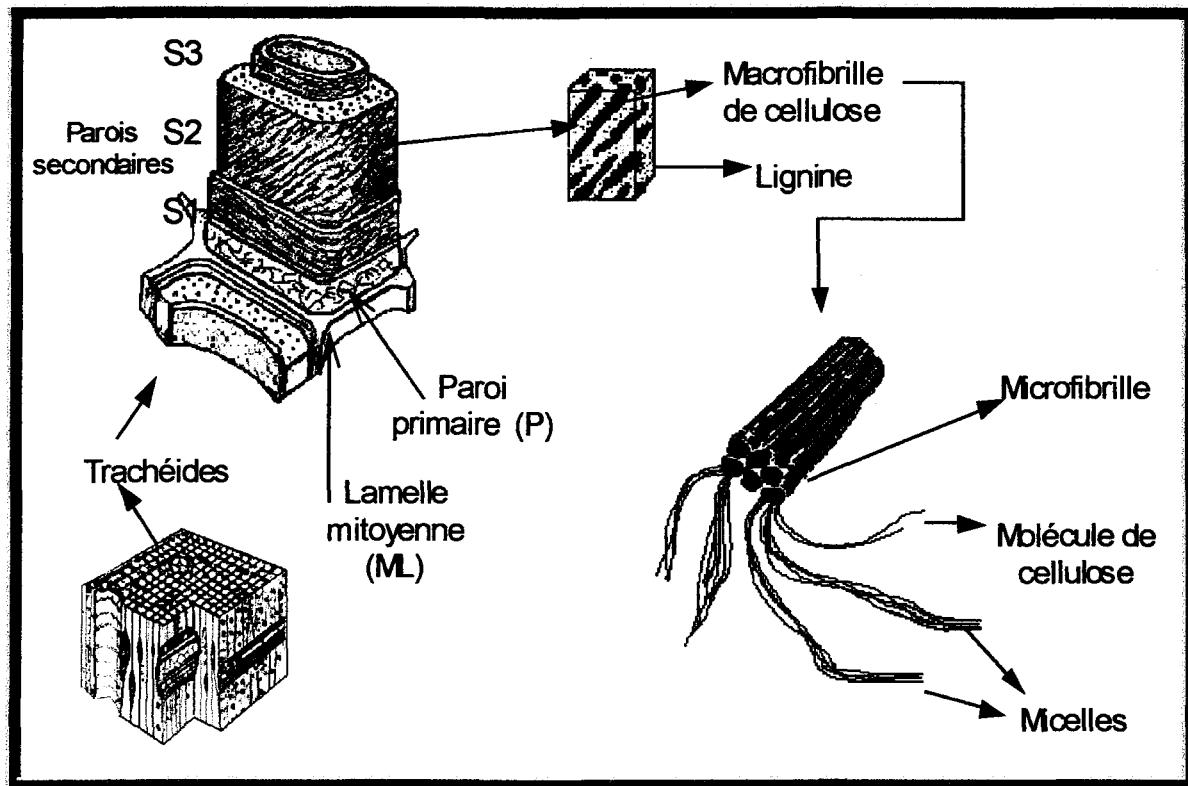


Figure 1.2 : Structure générale des trachéides du bois [18-21]

La proportion des trois polymères du bois soit la lignine, la cellulose et l'hémicellulose, varie d'une paroi à l'autre de même que l'orientation de ces derniers. Les

différents agencements et superpositions de macrofibrilles cimentées par la lignine interstitielle favorisent la rigidité des trachéides. Comme l'illustre la figure 1.2, la cellulose est le constituant majoritaire des macrofibrilles. Ceux-ci sont en fait un assemblage de fibres orientées parallèlement, plus petites et composées de plusieurs brins de cellulose et d'hémicellulose (micelles) que l'on nomme microfibrilles (voir figure 1.3). Les micelles sont maintenues ensemble par la lignine et forme alors un complexe hydrate de carbone-lignine (« lignin carbohydrate complex » ou LCC). La cohésion du complexe ainsi érigé est rendue possible par des liaisons chimiques de type éther (C-O-C) et de type ester (C-CO-O-C). La forte tendance de la cellulose à former des ponts hydrogènes est également responsable de la stabilité thermodynamique de cette dernière et par conséquent de sa solidité avantageusement mise à profit dans la fabrication du papier [18,21-22].

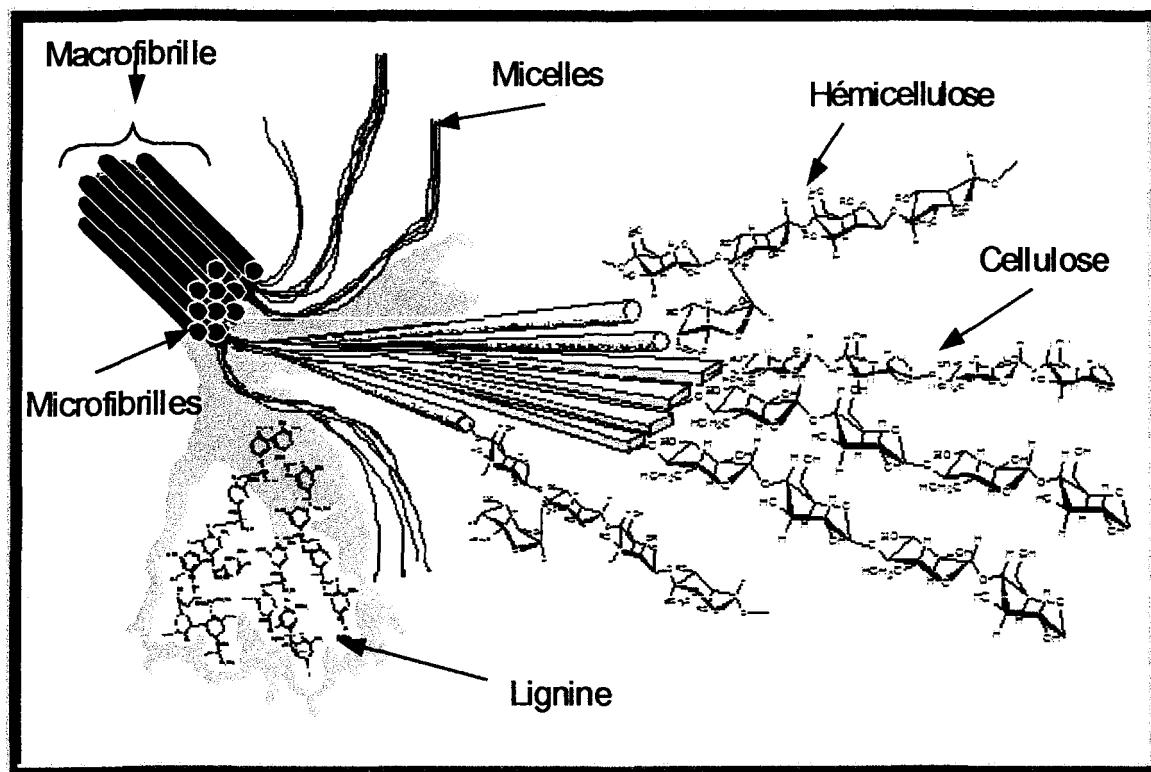


Figure 1.3 : Constituants chimiques des parois secondaires d'une cellule de bois
[18,21]

Cette caractéristique de la cellulose (1) peut se visualiser à la figure 1.4 où il est possible de percevoir les groupements hydroxyles en position équatoriale. Puisque la cellulose est un polymère linéaire, il devient alors aisément de comprendre pourquoi les ponts hydrogène peuvent être favorisés. La cellulose est un homopolysaccharide composé de plusieurs unités de β -D-glucopyranose qui sont plus concrètement des anomères β du D-glucopyranose. Ces unités sont unies par des liaisons glycosidiques en position 1-4 de part et d'autre des glucopyranoses. L'union en position équatoriale confère à la chaîne ainsi formée une linéarité rendant accessible la formation de ponts hydrogène lorsque plusieurs brins sont associés [18,21-23].

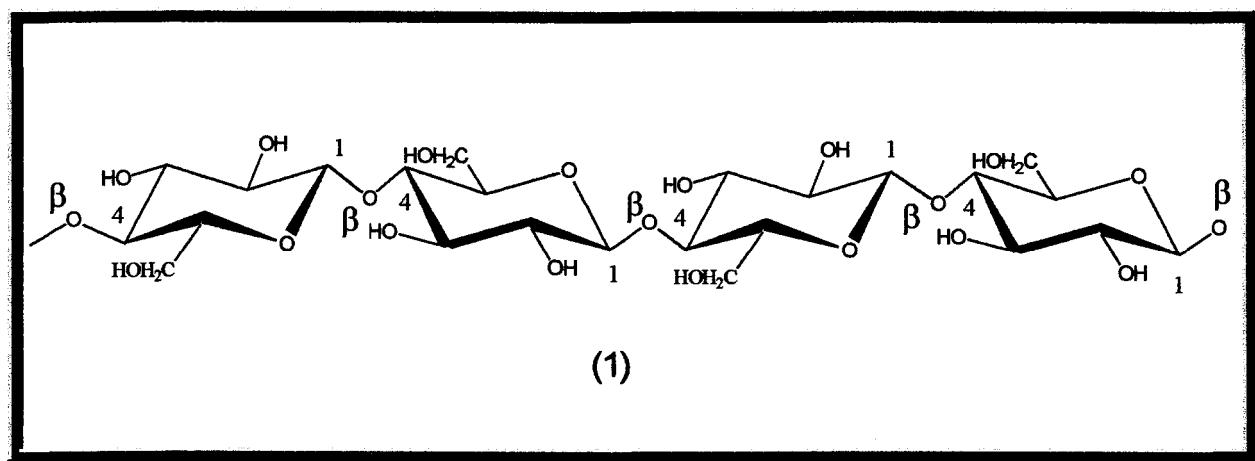


Figure 1.4 : Structure macromoléculaire de la cellulose (1) [18,21]

La juxtaposition en parallèle des chaînes de cellulose permet donc de former des liens intermoléculaires mais également des liaisons intramoléculaires. Comme le démontre la figure 1.5, la projection plane de la structure d'une partie de cellulose rend visible les deux types de ponts hydrogène existant au sein d'une macromolécule de cellulose. Comme conséquence de la forte cohésion qui maintient ce polymère, les propriétés chimiques et physiques en sont grandement affectées. Si bien que la cellulose possède une force de tension élevée et se solubilise peu dans bons nombres de solvants. L'amidon, qui comme la cellulose, est aussi un homopolysaccharide constitué des mêmes résidus de D-

glucopyranose. Ce polymère, contrairement à la cellulose, est affecté d'une solubilité beaucoup plus grande. La raison est stéréochimique puisque que les unités de base de l'amidon sont des anomères α de D-glucopyranose, le résultat étant une structure branchée éliminant la proximité d'un hydrogène appartenant à un groupement hydroxyle et d'un oxygène. Par conséquent, l'agrégation ne peut avoir lieu au niveau macromoléculaire comme c'est le cas pour la cellulose et fragilise de ce fait le polymère [18,21-23].

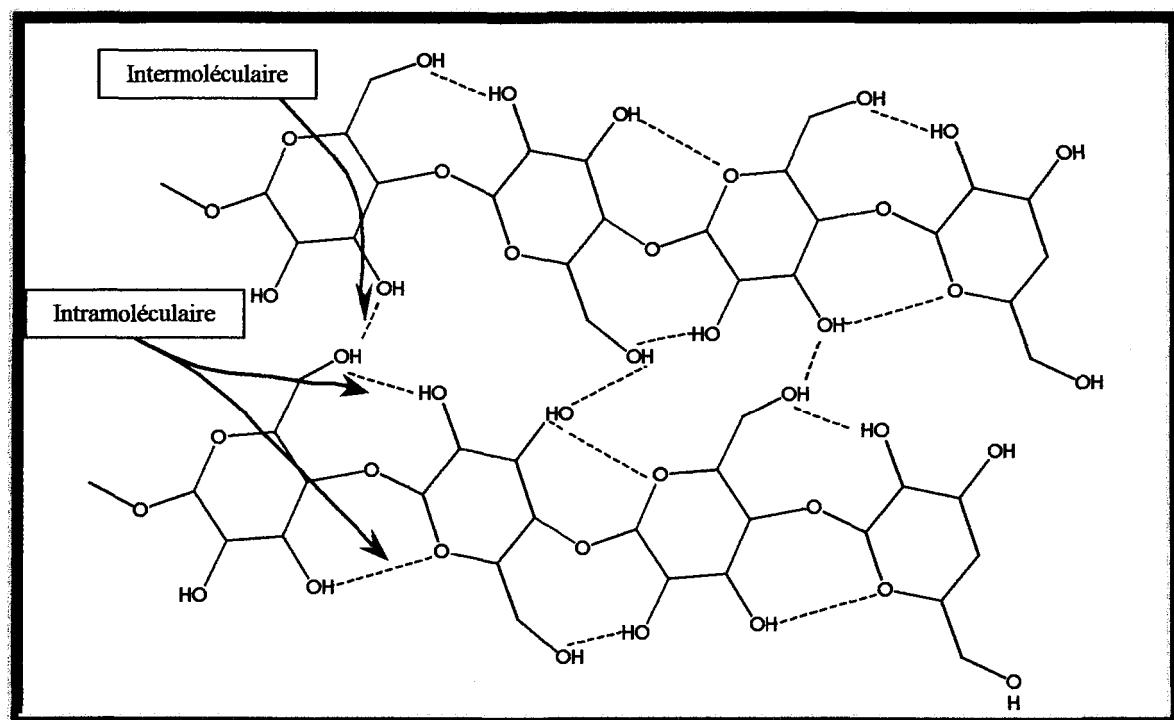


Figure 1.5 : Projection plane d'une section de cellulose

La cellulose est le constituant le plus important du bois. Le pourcentage oscille entre 40 et 45 % en masse sèche de matériel végétal dans la plupart des essences de bois [18,21]. Sa localisation se situe au niveau des parois cellulaires avec une prédominance pour les parois secondaires. Les agencements cellulosiques au sein des trachéides ont une influence décisive sur les propriétés du bois. De telle sorte que selon l'essence, il existe de grandes variations dans les patrons d'organisation des microfibrilles occasionnant des propriétés élastiques et mécaniques distinctes. Qui plus est, le comportement physico-

chimique du bois face à un traitement thermique devient dépendant de la structure chimique des ses constituants majoritaires. Les réactions et résultats qui ont cours lors de la thermotransformation du bois deviennent fonction de la complexité du patron chimique des parois cellulaires des trachéides dont il est construit [18,21].

L'hémicellulose quant à elle est un hétéropolysaccharide, c'est-à-dire que son édification inclue des monomères distincts tels que le D-glucose, le D-mannose, le D-galactose ainsi que d'autres aldoses du même genre [18,21-22]. Ce polymère se distingue de la cellulose du fait que sa structure branchée le rend fragile et rapidement hydrolysable par les acides. Sa fonction au niveau de l'arbre est également reliée au support. Le type d'hémicellulose retrouvé en proportion étendue dans les gymnospermes est le galactoglucomannans [18,21] (environ 20 % en masse sèche), dont sa configuration chimique est représentée à la figure 1.6. Force est de constater que la liaison 1-6 qui unit le β -D-mannopyranose à l'anomère α du D-galactopyranose est de type axial. Or, précédemment, il a été démontré que les liaisons axiales des anomères α se brisent avec une plus grande facilité. D'ailleurs la dépolymérisation de l'hémicellulose se fait d'abords par la rupture du lien entre le α -D-galactopyranose et le reste de la chaîne. Il est le premier polymère du bois à se décomposer lors d'un traitement thermique et son altération est accélérée par des réactions acido-catalysées [15,18].

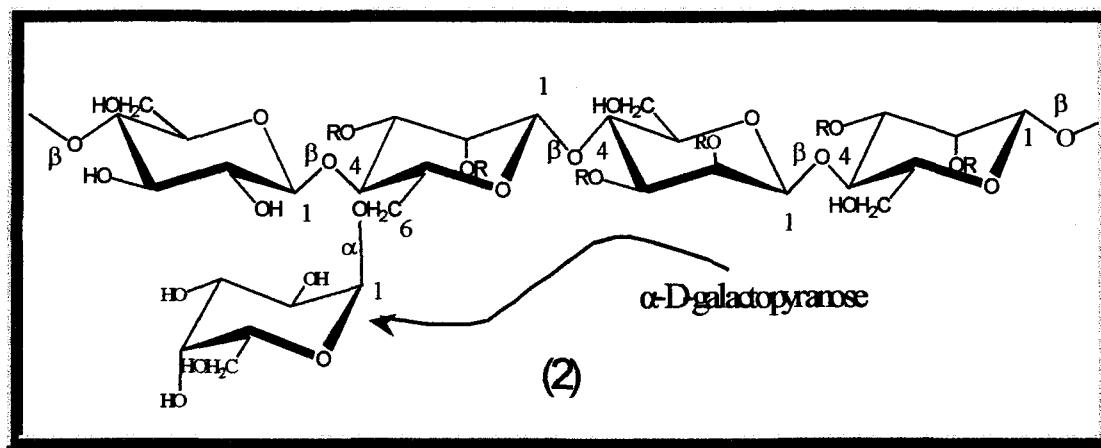


Figure 1.6 : Structure moléculaire d'hémicellulose (2) du bois de gymnospermes [18,21]

La lignine (figure 1.7) est le troisième composant macromoléculaire du bois. Sa structure émerge de la voie de synthèse de l'acide shikimique et elle consiste en un système aromatique construit à l'aide des unités de base de type phénylpropane [18,21-22]. D'un point de vue morphologique, la lignification apparaît comme le processus le plus important pour l'arbre au niveau mécanique et cette étape est déterminante lors de sa progression aérienne [18,20-21]. Durant le processus de développement cellulaire, la lignine est lentement biosynthétisée à l'intérieur des parois cellulaires, interpénétrant les microfibrilles, et ainsi conférant aux trachéides une force dimensionnelle. Un peu comme le ciment dans le béton armé. La quantité de lignine en matériel sec peut dépasser 30 % dans le cas des résineux [18,21-22]. Sa présence constitue encore aujourd'hui un défi à surmonter dans les procédés de fabrication de pâte à papier. Souvent responsable du jaunissement du papier, sa résistance aux produits chimiques est réelle et sa stabilité thermique également [21]. C'est de loin, le polymère le plus complexe du bois en regard de sa structure et de son hétérogénéité.

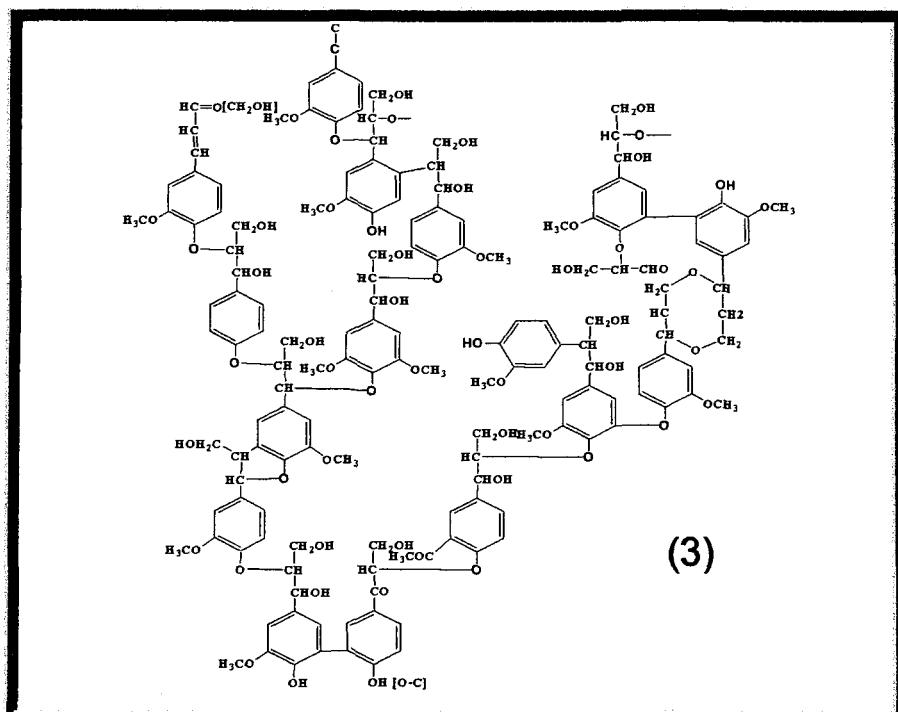


Figure 1.7 : Structure moléculaire d'une section de lignine (3) du bois de gymnospermes [18,21]

La lignine n'apparaît pas strictement entre les microfibrilles mais forme littéralement des liens avec les polysaccharides présents en donnant naissance au complexe LCC. Ce sont ces liaisons dont il a été question précédemment qui sont responsables de la solidification des parois cellulaires[18,21-22].

Cette macromolécule est considérée comme le polymère du bois le plus résistant à la température, cependant elle n'en est pas moins susceptible de subir la détérioration due aux microorganismes tels que les champignons [21,22,24]. Comme le suggère la figure 1.7, chaque groupement hydroxyle dans le squelette est un point d'attaque pour un microorganisme, phénomène à éliminer dans l'optique de préservation du bois. Suivant cette ligne de pensée, la thermotransformation du bois engage obligatoirement une modification chimique de la lignine dans un but ultime d'élimination des groupements hydroxyles, sans toutefois atteindre le stade de la pyrolyse qui affecterait drastiquement les propriétés mécaniques du bois.

1.2.2 Modification du bois par thermotransformation

Il est connu depuis de nombreuses années que le bois chauffé à haute température (entre 160 °C et 260 °C) subit des modifications physiques et chimiques lui permettant de perdurer dans le temps en résistant à la dégradation microbienne. Des observations scientifiques à cet effet datant des années quarante concluaient positivement sur le potentiel de stabilisation du bois en le chauffant à des températures élevées [25]. La thermotransformation du bois ne date donc pas d'hier, cependant beaucoup d'améliorations plus récentes dans les techniques accentuent l'efficacité de l'action préservatrice du traitement thermique. Plus encore, les technologies d'aujourd'hui procurent une grande capacité de production, favorisant l'émergence de sites de thermotransformation à vocation industrielle [16].

Poussée par la volonté environnementale de voir naître des procédés de traitement plus verts, des groupes de recherche se penchent activement sur les modifications qui ont cours dans le bois lors de sa thermotransformation. La façon d'obtenir un niveau de traitement permettant au bois de résister à la dégradation consiste en une élimination

partielle des points d'attaque potentiels sur lesquels s'attardent principalement les champignons. Ces points névralgiques correspondent aux différents groupements hydroxyles attachés tant sur la cellulose et l'hémicellulose que sur la lignine. La thermotransformation entraîne également une déshydratation du bois qui s'opère en fait en début de traitement mais qui n'affecte pas à cette étape les structures polymériques du bois. Après le départ de l'eau libre de la matrice végétale (après un certain temps à une température supérieure à 100 °C), l'hémicellulose commence à libérer de l'acide acétique, autocatalysant son propre clivage sur les groupements acétyle et réduisant son degré de polymérisation [13]. Cette catalyse acide est grandement favorisée par la présence de vapeur d'eau dans le réacteur en solubilisant les acides carboniques volatilisés lors du chauffage. La plupart des groupements acétyle de l'hémicellulose sont brisés pendant la thermotransformation.

L'autocondensation de la lignine joue également un rôle prépondérant dans la réduction des groupements hydroxyles. La rupture a lieu sur les liaisons éther et les connexions intercycles aromatiques sont rendus possibles par des liaisons méthyléniques. Cette réaction thermique sur la lignine n'est pas abusive et elle a pour conséquence directe d'augmenter la stabilité dimensionnelle du bois. Un effet additionnel se traduit par la diminution de son hygroscopicité due à une augmentation des liens entrecroisés dans la structure polymérique. La cellulose subit tout autant de modifications et le but recherché consiste toujours à limiter les points d'attaque (groupements hydroxyles) et d'accroître la capacité du bois à limiter la pénétration de l'eau.

En Europe, plusieurs brevets ont été déposés et tous se basent sur le même principe de chaleur élevée de traitement [11-12,26-27]. Certaines conditions de traitement distinguent les différentes techniques telles que le type de gaz écran pour éviter la pyrolyse (vapeur d'eau, azote gazeux ou oxygène), la présence ou l'absence d'eau lors du refroidissement, l'utilisation d'huile et encore le temps de traitement. En fait, il existe beaucoup d'autres paramètres permettant de modifier des aspects bien concrets du produit fini. Par exemple, un temps de traitement long combiné au facteur température de chauffe influenceront considérablement sur le critère visuel du bois soit, en le gratifiant d'une

couleur allant de pâle à très foncée. La conséquence de ce même traitement se répercute également sur la stabilité dimensionnelle du bois de même que sur les modifications chimiques ayant cours au niveau des polymères du bois. Ainsi, le désir d'obtenir une caractéristique précise (comme la couleur du bois) peut entraîner d'autres conséquences au niveau chimique qui par la suite s'observe lors de l'évaluation mécanique des planches de bois traitées. En conséquence, une simple modification dans les paramètres de traitement du bois relative aux différentes technologies entraîne la possibilité de voir des résultats différents qui sont à l'origine de réactions chimiques elles aussi différentes. Le tableau 1.1 résume les caractéristiques d'opération des technologies de traitement par haute température qui produisent du bois thermotransformé présentement de façon industrielle.

Tableau 1.1 : Caractéristiques d'opération des principaux procédés de thermotransformation du bois [11-12,16,26-27]

Procédé Paramètres	« NOW » Rétification® (France)	« Menz Holz » À l'huile (Allemagne)	« Thermowood» VTT (Finlande)	« Plato® » (Pays-Bas)	« Perdure » (Québec- France)
Énergie de chauffe utilisée	Électricité	Électricité	Électricité	Vapeur d'eau	Propane et gaz d'émission
Température maximale	250 °C	220 °C	230-240 °C	190-200 °C	240 °C
Agent régulateur de pyrolyse	Azote	Huile végétale brute	Vapeur d'eau	Vapeur d'eau	Gaz d'émission et vapeur d'eau
Durée d'un cycle de traitement	7-13 heures	~18 heures	~3 jours	3,5- 4,5 jours	Variable Fonction de l'essence
Phase de refroidissement	Azote ou injection d'eau	Huile végétale	Injection d'eau	En présence de vapeur d'eau	Injection d'eau
Capacité de production	Faible	Faible	Grande	Grande	Faible

1.2.3 Composition chimique et potentiel de bioactivité du lixiviat

Il existe très peu d'information concernant l'analyse chimique des lixiviats issus de la technologie de thermotransformation du bois par le procédé Perdure. En fait, aucune étude n'a été répertoriée en littérature sur ce sujet précis de la composition chimique du lixiviat obtenu par la technologie « Perdure » et encore moins concernant sa valorisation par une possible bioactivité. Concrètement, la littérature est riche d'informations ayant trait à la pyrolyse du bois et à sa valorisation chimique et énergétique, comme par exemple la fabrication du charbon [28]. De ce fait, les réactions physico-chimiques sur les constituants polymériques du bois chauffé ont été abondamment étudiées avec comme point de mire la pyrolyse [28-29]. De plus récentes études ayant pour sujet la thermotransformation du bois, dont beaucoup ont été effectuées dans les pays scandinaves, ajoutent davantage d'éclaircissements et de confirmations sur les réelles conséquences du traitement thermique et sur la durée de vie du bois [11-12,16,26-27].

Brièvement, il ressort de ces études quelques faits intéressants concernant l'aspect préservation du bois. Il a été précisé que la température de traitement de 220°C constitue celle qui permet au bois de mieux résister à différents types de moisissures soient, *Coniophora puteana*, *Gleophyllum trabeum*, *Poria placenta* et *Coriolus versicolor* [13,24]. Par contraste, une température de traitement proche de 200 °C et moins occasionne plutôt une polymérisation des sucres non-cellulosiques présents dans le bois, essentiellement des monosaccharides et des oligosaccharides. Cette polymérisation donne naissance à des polymères branchés du genre dextrine. Or, ce dernier composé constitué de moins de 10 unités de D-glucopyranose lié en position axiale est affecté d'une hydrophilicité appréciable, ce qui accentue les possibilités à subir une dégradation par les champignons.

Il appert également que les conditions de traitement, par exemple la durée et la présence ou non de vapeur d'eau, n'apparaissent pas comme les principaux critères dans la résistance du bois aux moisissures. L'atteinte d'une température minimale de 220 °C serait, selon ces études, le facteur déterminant. À ce stade de chauffage, que le traitement dure six ou vingt-quatre heures, le résultat semble à peu de chose près le même. Les réactions chimiques se produisant dans la matrice végétale sont premièrement une dégradation

partielle de l'hémicellulose, libérant de ce fait des composés de type furane (par exemple le furfural) et deuxièmement une très légère altération de la lignine confirmée par la présence de composés phénoliques simples. La présence dans la matrice ligneuse de ces constituants chimiques, tel que le furfural et les phénols simples, participerait activement à ralentir la prolifération des moisissures par leur effet fongicide déjà documenté. Toutefois, les études ne spécifient pas si ces composés se retrouvent à la surface du bois ou s'ils sont distribués également dans les pièces de bois traitées [13,24].

L'ajout d'eau, comme il a été déjà mentionné à la section 1.2.1, accentue la catalyse acide et davantage de produits d'hydrolyse de l'hémicellulose se solubilisent dans la fraction aqueuse [13,16,24]. Ce fait n'a pas que des conséquences sur les produits solubilisés lors de la lixiviation mais aussi sur le niveau de modification de l'hémicellulose. Cette dernière démontre un caractère hydrophile préjudiciable pour la durée de vie mécanique du bois et pis encore, constitue une nourriture beaucoup plus accessible pour différents microorganismes. L'eau catalyse et conséquemment convertit l'hémicellulose pour la rendre moins attrayante à la dégradation biologique.

Maintenant, qu'en est-il du lixiviat ? Le lixiviat, comme il a été expliqué à la section 1.1, tire sa provenance à l'étape du refroidissement du bois thermotransformé. Dès que le bois atteint une température de traitement variant entre 200 et 230 °C, il y demeure pendant un nombre d'heure prescrit selon l'essence et la couleur désirée. À la fin du traitement, de l'eau est pulvérisée à l'intérieur du four et ruissèle au travers des planches de bois, lixiviant de ce fait une grande partie des produits de dégradation de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine. Cette eau (lixiviat) s'en trouve donc chargée en matériel organique divers, et d'une façon plus particulière, des composés polaires et fonctionnalisés seront solubilisés dans l'eau. De plus, l'acidification de l'eau qui se produit lorsque celle-ci prend contact avec le bois cause une hydrolyse acide partielle des polymères du bois. Puisque la cellulose et l'hémicellulose sont sensiblement constituée des mêmes unités de base (le D-glucose pour la cellulose et le D-glucose et d'autres aldoses pour l'hémicellulose), il est probable que les réactions acido-catalysées de ces deux polymères aboutissent à des produits de dégradation assez similaires. La figure 1.8 propose un mécanisme réactionnel en projection

de Fischer largement documenté concernant la dégradation du D-glucose en milieu acide à haute température [21].

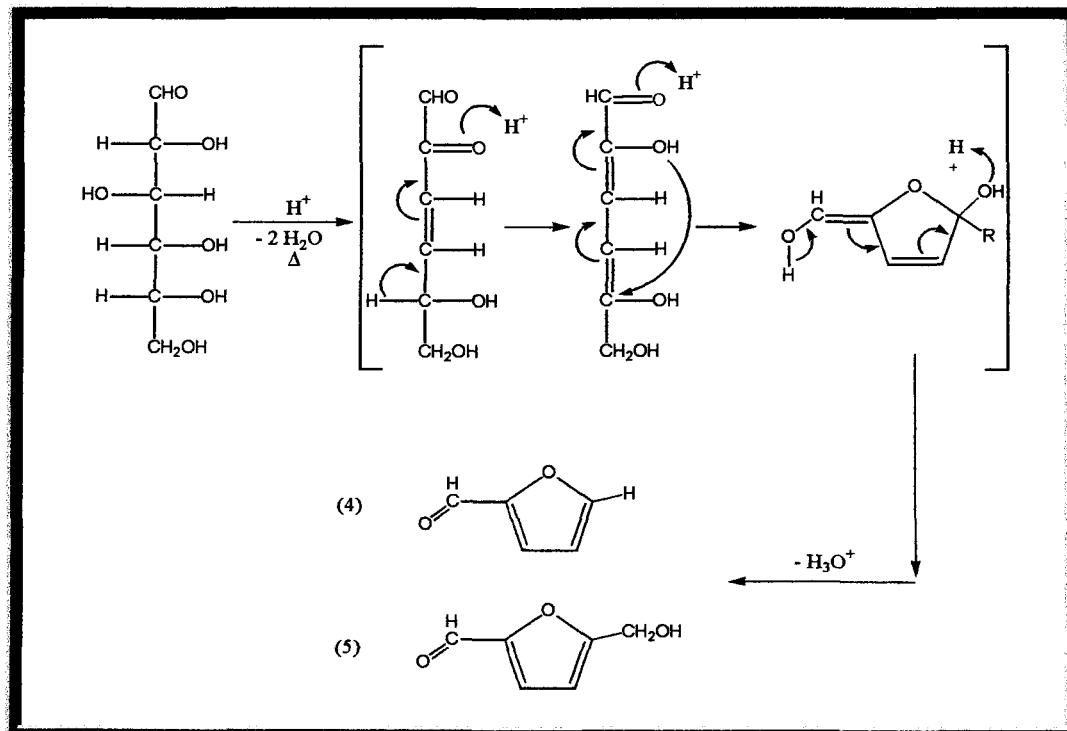


Figure 1.8 : Réaction acido-catalysée de la dégradation du D-Glucose en furfural (4) et en 5-furaneméthanol (5) [21]

Tel que présenté à la figure 1.8, le furfural (4) et le 5-furaneméthanol (5) proviennent de la thermodégradation des résidus de glucose, eux-même issus d'une rupture des liaisons glycosidiques causés par une augmentation de la température et d'une catalyse acide en milieu aqueux. Il s'agit dès lors d'une déshydratation intramoléculaire du D-glucose en formation ouverte (forme plus fréquente en milieu aqueux) [30] suivis de la cyclisation en un motif de type furane par formation d'une liaison éther intramoléculaire. Par conséquent, il devient plus que probable de rencontrer la présence de composés analogues au furfural (4) dans le lixiviat. De plus, les réactions possibles d'isomérisation ou encore de recombinaisons intra et intermoléculaires lors de l'étape de refroidissement autant que lors du traitement thermique lui-même peuvent créer un nombre appréciable de produits différents. Il est bien connu qu'une différence minime sur une molécule peut avoir

des conséquences énormes sur ses propriétés. Il suffit de se souvenir des propriétés physiques très contrastantes entre l'amidon et la cellulose, deux polymères constitués essentiellement des mêmes unités de glucose. Le lien glycosidique axial dans un cas et équatorial dans l'autre définit leur stabilité thermodynamique fort dissemblable.

Il est intéressant de mentionner que la présence du furfural dans des gaz d'émission atmosphérique d'usine de thermotransformation du bois a déjà été détectée [31], or ce dernier est déjà utilisé comme pesticide [32]. En outre, des sous-produits provenant de la dégradation thermique partielle de la lignine tels que le guaiacol (6) et l'eugénol (7) ont également été identifiés dans les gaz d'émission lors du chauffage à haute température du bois (figure 1.9) [18,31] par une technologie similaire à « Perdure ». Leur structure phénolique en confirme d'ailleurs la provenance. Dès lors, il devient possible de déduire la présence de quelques composés éventuels dans le lixiviat comme le phénol ou les créosols.

Quant à l'alcool *trans*-coniferylique (8), il est le précurseur principal du processus de biosynthèse de la lignine du bois de gymnosperme [18,20-21]. Il représente un des constituants de base dans l'édification de la lignine et son motif phénylpropane est clairement visible tout comme pour l'eugénol (7). Bien qu'il n'ait pas été détecté dans les lixiviats, il explique la présence d'autres molécules du même type dans l'eau de refroidissement du bois thermotransformé par la technologie « Perdure ». Les molécules à motif phénylpropane peuvent présenter un intérêt du point de vue de leur bioactivité.

À ce sujet, de récentes études relatives à un autre composé de type phénylpropane et de structure très similaire à l'alcool coniferylique (8), le *trans*-cinnamaldehyde (9), concluaient positivement sur son activité antitumorale [33-34]. Il a été démontré que le *trans*-cinnamaldehyde, un phénylpropane proche de l'alcool coniferylique, possède une activité antitumorale. Ce composé est l'un des produits majeurs de l'huile essentielle de cannelle (extraite de l'écorce de *Cinnamomum cassia*) [33]. Outre son activité antitumorale, le *trans*-cinnamaldehyde est reconnu comme vasodilatateur, antifongique, cytotoxique et antimutagénique [34-35].

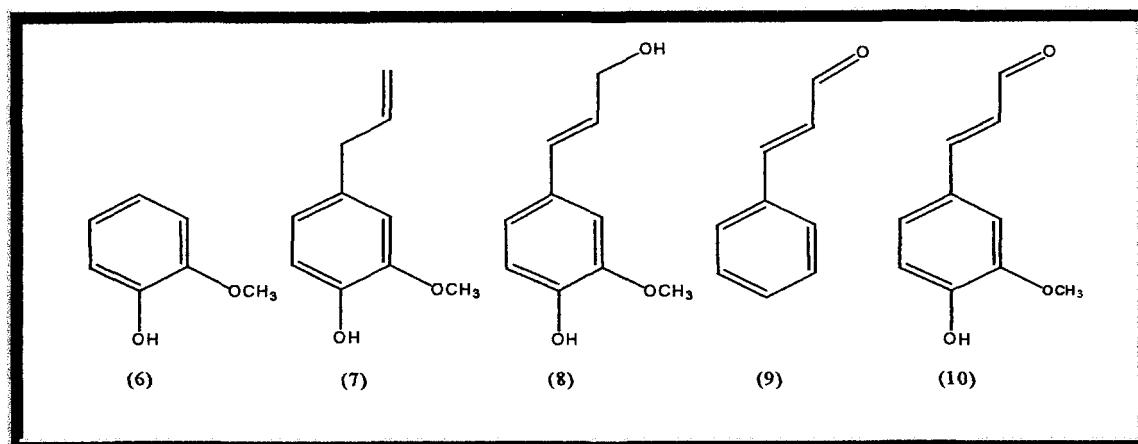


Figure 1.9 : Similitude entre les produits de dégradation thermique de la lignine et le cinnamaldehyde (9) [18]

Les similitudes structurales entre le cinnamaldehyde (9) et plusieurs produits de dégradation (6-7) de la lignine permettent de penser que certains composés de type phénylpropane présents dans le lixiviat pourraient présenter une activité biologique. Il est intéressant de mentionner que la présence du coniferaldehyde (10) dans le lixiviat pourrait originer de l'oxydation de l'alcool coniférylique (8). Bien que cet alcool ne soit pas détecté dans les lixiviats, sa formation pendant la thermotransformation est probable et son oxydation peut être expliquée par les conditions oxydatives du four « Perdure » (présence d'eau, d'oxygène et température élevée).

L'intérêt d'évaluer l'activité biologique des composés organiques du lixiviat est justifié par le nombre limité d'études sur le sujet. De plus, aucune étude portant sur la valorisation bio-pharmaceutique des sous produits résultants de la thermotransformation du bois par la technologie « Perdure » n'a été rapportée dans la littérature jusqu'à maintenant.

1.3 Objectifs de la publication

L'objectif premier de la publication présentée ci-après, est de rapporter les résultats obtenus des travaux de recherche effectués dans le cadre de l'analyse chimique du lixiviat issus de la thermotransformation du pin gris (*Pinus banksiana Lamb.*) par le procédé « Perdure ». Dans un deuxième temps, la vérification de la bioactivité, basée sur l'hypothèse de retrouver des composés analogues au *trans*-cinnamaldehyde affichant une bioactivité, confirmera ou infirmera le potentiel de valorisation du lixiviat. La publication présentée ci-après concerne l'analyse chimique du lixiviat. Les résultats concernant la bioactivité feront l'objet d'un deuxième article.

CHAPITRE 2
LA PUBLICATION

**PRELIMINARY ANALYSIS OF THE LIXIVIATE STEMMING FROM THE HEAT TREATMENT OF
JACK PINE (*Pinus banksiana* Lamb.) BY PERDURE PROCESS**

Josette Ross¹, Jean Legault¹, D.Kocaefe², André Pichette¹

¹ Université du Québec à Chicoutimi, LASEVE, Département des sciences fondamentales,

Chicoutimi, Québec, Canada,

G7H 2B1

² Université du Québec à Chicoutimi,, Département des sciences appliquées, Chicoutimi,

Québec, Canada,

G7H 2B1.

ABSTRACT

This paper outlines the preliminary results of the study on the lixiviate stemming from the heat treatment by the Perdure process. The results are obtained using the lixiviate of heat treated jack pine (*Pinus banksiana*). The major products identified with solvent extraction method using hexane and ethyl acetate as solvents are: 5-methyl-furfural, o-guaiacol, borneol, α-terpineol, 2-hydroxy-5-methoxy-benzaldehyde, vanillin, coniferaldehyde, furfural, 1-acetyloxy-2-propanone, phenol, propanoic acid-3-ethoxy ethyl ester, 2-hexyloxy-ethanol and 5-hydroxymethyl furfural. The extraction yields 0,1372 g/L with hexane and 0,8078 g/L with ethyl acetate. This research is within the framework of a vaster project covering the adaptation of the Perdure process to regional species in the Saguenay-Lac-St-Jean region of Quebec.

INTRODUCTION

It is well known that wood treated chemically presents a danger for human health [1-2]. Many countries have already set up restrictive measures regarding the use of chemically treated wood, in some cases banning all sales of the aforementioned wood [3]. One of the main agents responsible for the toxic potential of chemically treated wood is chromated copper arsenate or CCA [4]. It has been demonstrated that CCA presents a risk factor for both human health and environment [1-5-6]. There are different studies reported in the literature on the development of new wood treatment processes which do not use additional chemical compounds affecting human health or environment [7-8-9-10]. Most of the time, these processes require a treatment temperature higher than the temperatures used in conventional wood drying. Usually, the purpose of applying a high temperature treatment is to reduce the amount of hydroxyl groups in wood constituent, thus reducing its hygroscopicity as well as its hydrophilicity and, consequently, minimizing wood rot [11]. This transformation is necessary to render wood more resistant to biological decay, but the temperature should not exceed 260 °C. Above this temperature, the wood pyrolysis takes place aggressively; as a result, the physical properties of the wood are modified irreversibly and its strength is decreased [11].

The new heat-treatment process called Bois Perdure is a technology developed in France which heats the wood to a maximum temperature of about 230°C. This process uses a reducing gas atmosphere to avoid wood pyrolysis during the treatment, and liquid water

to cool down the wood in the last stage of the treatment [12]. Water is sprayed on the wood boards, and it captures some of the natural products which are chemically altered during the thermal degradation of the wood. These include mainly cellulose, hemicellulose, and lignin. The cooling water containing these compounds is called lixiviate. If these products can be recovered from lixiviate and used in different applications such as in pharmaceuticals, the lixiviate of the heat treatment process becomes a value-added by-product.

The mechanisms of degradation of the polymeric constituents of the wood cell wall are well known [13], but possible reactions taking place after their recovery by water are rarely reported in literature. To our knowledge, there are no reported studies specifically on the lixiviate obtained from the Perdure Process. Also we have found no studies in literature on the analysis of the lixiviate obtained from the Perdure process. Therefore, the main objective of this preliminary study is to analyze lixiviate extracts obtained from the heat treatment of jack pine (*Pinus banksiana*) by the Perdure process.

EXPERIMENTAL

Lixiviate

Two samples of lixiviate were taken from a plant heat treating jack pine (*Pinus banksiana Lamb.*) using the Perdure process, in Saguenay-Lac-St-Jean (region of Quebec) in March 2003 (#1 lixiviate) and June 2003 (#2 lixiviate). Aqueous samples were collected in amber glass bottles of 4-liter capacity and they were stored at 5°C. On reception, aqueous phases were filtered on a nylon 66 membrane of 0,45 µm pore thickness. The liquid-liquid extraction as well as the GC/MS analysis of the lixiviates were carried out within the three days of their reception.

Extraction

A 500 ml sample of lixiviate is acidified at pH 1 by adding 10 ml of 10 % sulphuric acid. 40 g of NaCl is also added to the aqueous phase to minimize emulsion and make organic compounds contained in water more accessible. According to the conventional sequence of extraction [14], the sample is then extracted three times with 100 ml of hexane. Hexane, with his low polarity, makes the extraction of less polar compounds possible. After, the same aqueous sample is extracted three times with 100 ml of ethyl acetate. This solvent which is much more polar than hexane, permits the extraction of total organic compounds from the lixiviate because it is more likely to find polar compounds in water.

As it is well-known, it is easier to extract these compounds with a polar solvent. Extracts were then evaporated using a rotary evaporator, weighed and analyzed by GC/MS.

Gas Chromatographic/Mass Spectrometry analyses of lixiviate extracts

Analyses by GC-MS were performed using a Hewlett-Packard gas chromatograph, HP 5890, equipped with a ZB-5 (30 m × 0.25 mm with 0.25 µm film) and it is coupled with a mass spectrometer 5972 at 70 eV. The temperature was programmed using a rate of 40°C/min up to 210°C and 10°C/min up to 325°C. For injection (split injector), 5 µL of each extract was diluted in 200 µL of ethyl acetate (HPLC grade) and 5 µL of this diluted solution was injected to GC/MS. Identification of the majors constituents was made on the basis of their mass spectra, which were compared with spectral data references [15] and Kovats Index.

RESULTS AND DISCUSSION

Physical aspect and yield of extraction

Table 1 summarizes the yield and physical aspect of lixiviate extracts. The yield of the hexane extraction was found to be relatively low, however, the ethyl acetate extraction yield, with 403,9 mg of extract for 500 ml of lixiviate, seems to be interesting for industrial by-product valorisation. Since every heating sequence requires the industrial plant to use more than 200 litres of water to cool the wood, the lixiviate is available in large quantities (information provided from plant's administrator) and it constitutes an important source of chemically transformed compounds. Therefore, more research is required to investigate this potential. The physical aspects of lixiviate extracts obtained with both solvents are relatively similar with the exception of their odour. The hexane extract has a burned sugar odour because its major components are heterocyclic compounds. These compounds with a furan structure often have a characteristic smell of toffee [16].

Majors components of lixiviate extracts

Table 2 presents results obtained for hexane extractions of lixiviate #1 and # 2. The major components were identified by GC/MS with concordance of mass spectra found in literature [15] and Kovats Index. Despite the fact that it is possible to confirm with precision the presence of some organic constituents by GC/MS, it is still possible that some

highly polar compounds remain in the ethyl acetate extract and in water. Presently, a few techniques other than GC/MS are being used to refine the analysis.

The most important compounds (with highest percentage) in hexane extract of both lixiviates are : 5-methyl-furfural (1), o-guaiacol (4), borneol (9), α -terpineol (10), vanillin (5) and coniferaldehyde (6). For the ethyl acetate extraction of both lixiviates (shown in Table 2), major components are the following : furfural (2), 1-acetyloxy-2-propanone (11), phenol (7), propanoic acid-3-ethoxy ethyl ester (12) , 2-hexyloxy-ethanol (13), 5-hydroxymethyl furfural (3), vanillin (5) coniferaldehyde (6). The compounds which are highly polar and less volatile can be extracted easier with ethyl acetate than with hexane as demonstrated by the compounds identified by GC/MS. Differences between the hexane extracts and ethyl acetate extracts is due to the differences in their solvent affinities for compounds of different polarities. It is also found that the compositions of two lixiviate analyzed were different due to variations associated with the process itself and with the starting material. The type of wood, its origin and season of collection are some potential causes for the variation in the chemical composition of the lixiviate. More detailed statistical analyses will help eliminate the potential ambiguities entailed by these sources of variation.

Figure 1 presents an example chromatogram obtained from the hexane extraction of lixiviate # 1. As it can be seen from this figure, there is a tailing peak observed between fifteenth and eighteenth minutes. This peak corresponds to an overlapping of molecules presenting similar structures, bearers of a possible carboxylic group. This fact explains the low percentage of identified compound for the hexane extraction of lixiviate # 1. It was

impossible to identify these compounds because of superimposing peaks. Figure 1 also clearly indicates that there are many different organic compounds in the lixiviate shown by numerous peaks, each peak corresponding to at least one compound. This suggests the hypothesis that there might be several chemical mechanisms, namely, pyrolysis, thermolysis, hydrolysis and molecular rearrangements which occur during the wood treatment phase of cooling by water. This observation is very important because it indicates that it is possible to discover novel molecules in lixiviate originating from the hydrothermal transformation of wood constituents and this might lead to by-product valorisation. Figure 2 shows the molecular structures of the major products found in both hexane and ethyl acetate extracts. It is not surprising to find volatile terpenes in the hexane extract. The presence of volatile terpenes in the condensed gas coming from a wood drying plant was previously reported in the literature [17]. However, the Perdure process is a novel wood heat treatment technology which uses water as a cooling agent and up to now no study has explicitly demonstrated the presence of alcoholic monoterpenes such as α - terpineol, β -cymen-8-ol, endo-fenchol and terpinen-4-ol in heat-treated jack pine lixiviate (*Pinus banksiana Lamb.*) of this process. For both extractions, compounds such as vanillin, α -guaiacol, 2-hydroxy-5-methoxy-benzaldehyde and coniferaldehyde are present in considerable proportions. Their presence stems from the degradation of lignin followed by the pyrolysis of its monomeric units [17]. Other furan type compounds such as furfural are the indicators of partial degradation of hemicellulose [13]. Phenol appears during pyrolysis of compounds resulting from an implicit degradation of lignin [13-18]. Thus, these

products provide information about the physico-chemical transformation mechanisms occurring in wood when heat treated at temperatures exceeding 200 °C.

CONCLUSIONS

This work is a part of a larger project on heat treated wood. The specific objectives of this part of the work were to study the chemical composition of lixiviate obtained by the Perdure process and evaluate the potential valorisation of this industrial by-product.

Preliminary analysis GC/MS allowed the identification of the major compounds found in lixiviate obtained during high temperature treatment of jack pine using the Bois Perdure process. The major constituents of lixiviate have been identified (in certain cases in proportions exceeding 89 % of the total). However, the possible utilisation of these compounds and, consequently, the valorisation of lixiviate remain to be shown. The study is currently continuing in this direction.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank particularly to Mr. Stéphane Bergeron of PCI Industries as well as Mr. Francis Gauthier of Eco-bois, St-Ambroise, for lixiviate supply. Special thanks to Mrs. Hélène Gagnon of LASEVE, University of Quebec at Chicoutimi, for her support in GC/MS utilisation.

REFERENCES

1. Fields, S. Caution: children at play: how dangerous is CCA? *Environmental health perspective*, 2001, 109(6), A262-A269.
2. Gray, S.; Houlihan, J. All Hands on deck. Environmental working group, 2002.
3. Deegan, D. EPA finalizes voluntary cancellation of virtually all residential uses of CCA-treated wood. Press Advisory. U.S. Environmental protection Agency. March 2003.
4. Hingston, J.A.; Collins, C.D.; Murphy, R.J.; Lester, J.N. Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: a review. *Environment pollution*, 2001, 111(1), 53-56.
5. Townsend, T.G.; Solo-Gabriel, H.; Tolaymat, T; Stook, K. Impact of chromated copper arsenate (CCA) in wood mulch. *The science of the total environment*, 2003, 309(1-3), 173-185.
6. Decker, P.; Cohen, B.; Butala, J.H.; Gordon, T. Exposure to wood dust and heavy metals in workers using CCA pressure-treated wood. *AIHA Journal*, 2002, 63(2), 166-171.
7. Syrjanen, T; Kestopuu,O; Jamsa, S.; Viitaniemi, P. Heat treatment of wood in Finland-State of the art, *Proceedings of Special Seminar on Heat Treatment of Wood*, Antibes,

France, February 9, 2001, A.O. Rapp Ed.; BFH the federal research Centre for forestry and forest products, Hamburg, 2001; 11-19.

8. Militz,H.; Tjeerdsma, B. Heat treatment of wood by Plato process. , Proceedings of Special Seminar on Heat Treatment of Wood, Antibes, France, February 9, 2001, A.O. Rapp Ed.; BFH the federal research Centre for forestry and forest products, Hamburg, 2001; 27-36.

9. Rapp, A.O.; Sailer, M.; Heat treatment of wood in Germany-State of the art. , Proceedings of Special Seminar on Heat Treatment of Wood, Antibes, France, February 9, 2001, A.O. Rapp Ed.; BFH the federal research Centre for forestry and forest products, Hamburg, 2001; 47-62.

10. Vernois, M. Heat treatment of wood in France-State of the art. , Proceedings of Special Seminar on Heat Treatment of Wood, Antibes, France, February 9, 2001, A.O. Rapp Ed.; BFH the federal research Centre for forestry and forest products, Hamburg, 2001; 39-46.

11. Mazela, B.; Zakrzewski, R.; Grześkowiak, W.; Cofta, G.; Bartkowiak, M. Preliminary research on the biological resistance of the thermally modified wood. Proceeding of the first European conference on wood modification, Ghent, Belgium, April 3-4, 2003; Van Acker, J., Hill, C. Eds; Ghent; EUR 20639, 113-120.

12. Chanrion, P.; Schreiber, J. Les différents procédés, In *Bois traité par haute température*, Edition CTBA; Paris; 2002; 11-33.
13. Raimo, A.; Kuoppala, E.; Oesch, P. Formation of the main degradation compound groups from wood and its components during pyrolysis. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 1996, 36, 137-148.
14. Gailliot, F.P. Initial Extraction and product capture. In *Natural product isolation*, Cannell, R.J.P.; Humana Press; Totowa, New-Jersey, 1998; 59-68.
15. Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. Allured Publ.Corp., Carol Stream, Illinois, 2001.
16. Richard, H. Connaissance de la nature des arômes alimentaires, In *Les arômes alimentaires*, Edition CTBA; Paris; 2002; 11-33.
17. Graf, N.; Haas, W.; Böchzelt, H. Characterization of gaseous emissions from a small-size industrial plant for thermal wood modification by GC/MS. Proceeding of the first European conference on wood modification, Ghent, Belgium, April 3-4, 2003; Van Acker, J., Hill, C. Eds; Ghent; EUR 20639, 55-58.

18. Amen-Chen, C.; Pakdel, H.; Roy, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. *Bioresource technology*, 2001, 79, 277-299.

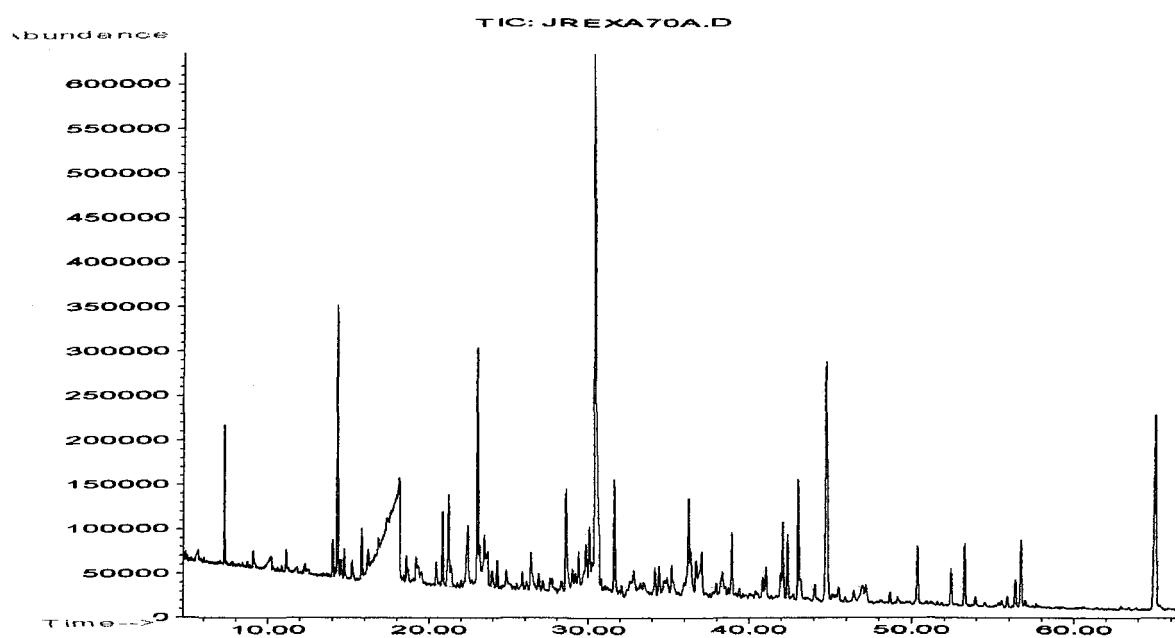


Figure 1: Typical total ion chromatogram of hexane extract for lixiviate # 1

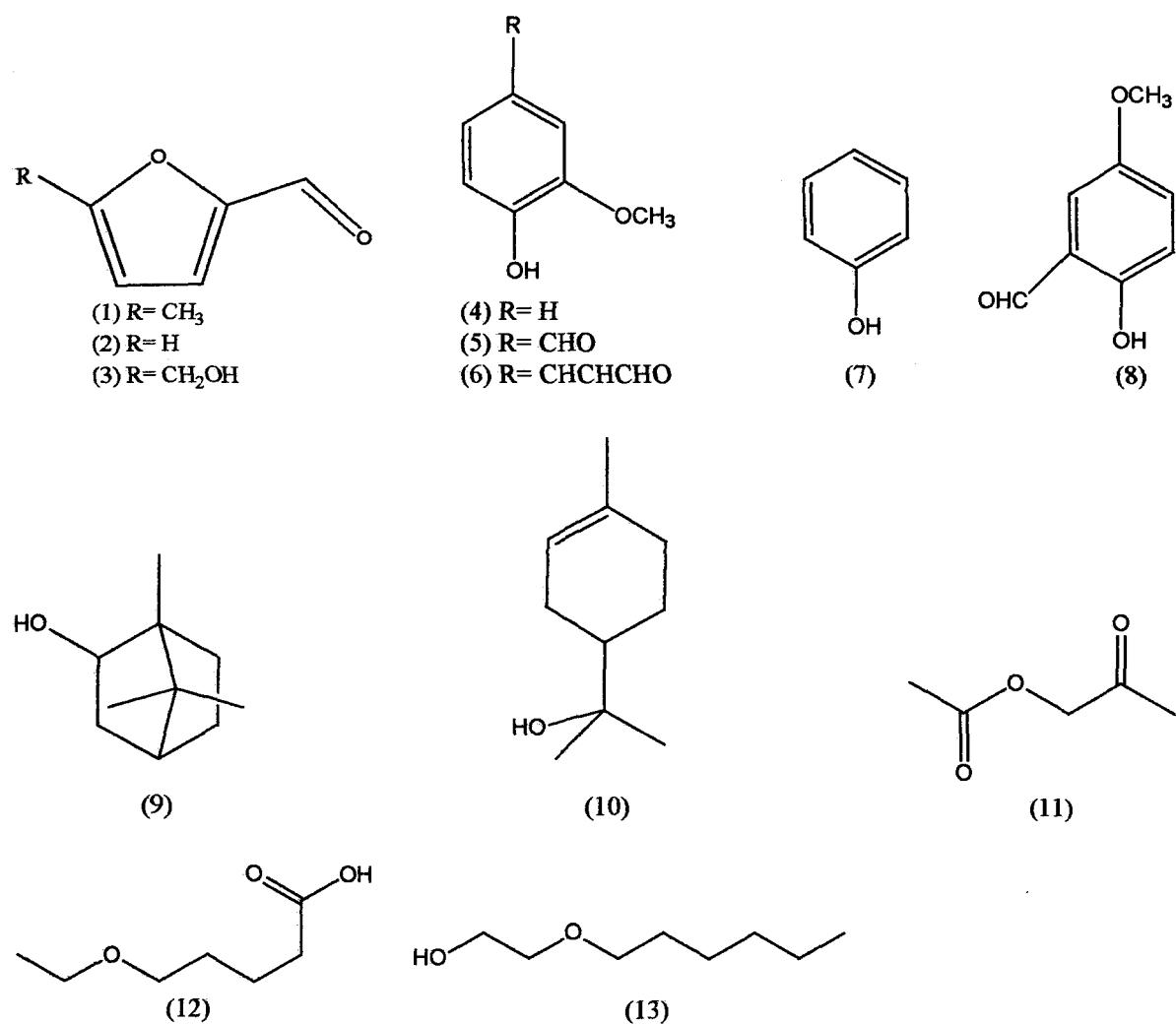


Figure 2: Molecular structure of major compound found in extracts

Table 1: Physical aspect of lixiviate # 1 extracts and yield of extraction

	ELL Hexane	ELL EtOAc
Yield	0,0686 g/500ml	0,4039 g/500ml
Physical aspect	Yellow oil Smell of burning	Orange oil Smell of toffee

Table 2: Chemical composition of hexane extracts of lixiviates analysed by GC / MS

Identified compound (Kovats index)	Relative percentage %	
	Lixiviate #1	Lixiviate #2
Furfural (835)	1,41	0,34
Benzaldehyde (960)	0,52	-
5-methyl-furfural (964)	3,98	2,46
Phénol (981)	0,71	0,49
Mesitylene (990)	0,75	0,46
Benzyl alcohol (1037)	-	0,59
o-cresol (1061)	1,27	0,83

m-cresol (1087)	1,90	1,33
o-guaiacol (1092)	4,11	3,60
endo-fenchol (1126)	-	1,13
4-methyl-benzenemethanol (1142)	1,30	1,56
borneol (1173)	2,70	4,97
terpinen-4-ol (1176)	0,87	1,26
p-methyl-acetophenone (1182)	-	1,13
p-cymen-8-ol (1187)	-	3,36
α - terpineol (1193)	15,26	22,72
verbenone (1200)	2,26	0,93
stearaldehyde (1261)	0,86	-
3',5'-dihydroxyacetophenone (1273)	-	1,22
2-hydroxy-5-methoxy- benzaldehyde (1277)	2,47	-
5-acetoxymethyl-2-furaldehyde (1314)	1,25	1,76
Eugenol (1353)	1,61	1,84
γ -decalactone	1,31	-
ethanol-2-(2-butoxyethoxy)-		

acetate	1,86	6,89
vanillin (1391)	6,65	8,82
acetovanillone (1480)	1,22	1,74
4-hydroxy-3-methoxy-benzene		
acetic acid (1523)	-	2,54
coniferaldehyde (1727)	6,34	8,58
Total identified:	60,61 %	80,55 %

Table 3: Chemical composition of ethyl acetate extracts of lixiviates analysed by GC / MS

Identified compound (Kovats index)	Relative percentage %	
	Lixiviate # 1	Lixiviate # 2
Furfural (835)	17,84	15,23
5-furan-methanol (859)	2,12	4,61
1-acetoxy-2-propanone (875)	5,16	4,58
butyrolactone (915)	1,28	1,38
acetonyl acetone (933)	tr.	0,58
5-methyl-2(5H)-furanone	-	0,37

(980)		
5-methyl-furfural (964)	1,37	1,93
3-methyl-2(5H)-furanone	-	0,62
(980)		
phenol (986)	2,13	2,39
propanoic acid, 3-ethoxy		
ethyl ester (990)	27,07	-
3-methyl-1,2-		
cyclopentanedione (1027)	-	1,35
benzyl alcohol (1038)	-	1,52
p-cresol (1091)	-	1,07
2-hexyloxy-ethanol (1122)	15,08	-
maltol (1126)	2,91	-
5-hydroxymethyl-furfural	3,98	14,31
(1234)		
acetoxyethyl-2-		
furaldehyde (1314)	0,93	1,22
vanillin (1391)	4,99	12,48
carvone hydrate (1424)	tr.	1,44
acetovanillone (1480)	tr.	1,92
4-hydroxy-3-methoxy-		

benzene acetic acid (1529)	-	5,23
coniferaldehyde (1725)	4,50	11,82
Total identified:	89,36 %	84,05 %

CHAPITRE 3
RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Extraction par solvant

La démarche expérimentale en vue d'extraire les composés organiques du lixiviat suit une démarche standard d'extraction par solvant liquide-liquide [36]. Le lixiviat est un liquide qui doit être traité sur réception car il ne résiste pas bien à la dégradation par les micro-organismes. Des observations à cet effet ont été relevées quant à l'apparition de moisissures dans les échantillons de lixiviat récoltés dans les premiers mois de l'expérimentation. En conséquence les extractions ont toujours été effectuées dans les 7 jours qui ont suivi la réception du lixiviat.

La préparation préalable à l'extraction du lixiviat consiste en une filtration sur une membrane de nylon (nylon 66) de 0,45 microns. Cette étape est essentielle afin de minimiser la quantité de particules solides de carbone qui ont tendance à migrer dans la portion solvant lors de l'extraction. Ces particules solides sont alors susceptibles de fausser significativement les résultats au niveau de l'évaluation du rendement d'extraction. Le lixiviat ainsi filtré se trouve à toute fin pratique exempt de toutes particules solides. Il est ensuite soumis à une extraction par solvant liquide-liquide.

Les composés organiques solubles dans les solvants organiques sont extraits de la phase aqueuse suivant une séquence en continue à l'aide de deux solvants de polarité différente. En procédant de cette façon, il devient possible d'extraire les composés organiques dans une matrice conformément à une certaine sélectivité d'affinité de polarité. Les solvants peu polaires présentent plus d'interactions pour les molécules elles-mêmes de faible polarité. Et la même logique s'applique aux solvants de plus haute polarité. C'est pourquoi l'hexane et l'acétate d'éthyle ont été choisis. Évidemment, le solvant d'extraction ne doit pas être miscible dans l'eau puisque la matrice étudiée est aqueuse. L'hexane et l'acétate d'éthyle présente un indice de polarité respective de 0,0 et 4,4 [37]. Les rendements obtenus en fonction du solvant d'extraction de même que les caractéristiques physiques des extraits se résument dans le tableau 3.1. Chacun des extraits correspondant à des lixiviats récoltés à des dates différentes sont par la suite soumis à une analyse

chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette partie de l'analyse est commentée à la section 3.2.

Les lixiviats notés 1, 2 et 3 se rapporte à une séquence de traitement de pin gris (*Pinus banksiana Lamb.*) ayant eu lieu dans un four industriel situé à St-Ambroise et la collecte des échantillons ont eu lieu à trois dates différentes soient le 4 mars 2003, le 25 juin 2003 et le 16 septembre 2003.

Tableau 3.1 : Rendement d'extraction et aspect physique des extraits

	Solvant d'extraction: Hexane			Solvant d'extraction: Acétate d'éthyle		
	Pour 500 ml de lixiviat (g)			Pour 500 ml de lixiviat (g)		
Lixiviat	1	2	3	1	2	3
Rendement	0,0686	0,0987	0,0590	0,4039	0,6848	0,5012
Aspect physique						
Densité	1,12			1,16		
Couleur	Huile jaune pâle			Huile brune		
Odeur	Brûlé			Caramel		

Il est possible de constater à partir du tableau 3.1 que les rendements en extraits sont plus importants en ce qui concerne l'extraction à l'acétate d'éthyle. Il est tout à fait logique de s'attendre à ces résultats puisque lors du processus de refroidissement dans le procédé Perdure, l'eau agit en fait comme un solvant en emportant avec elle une certaine quantité de composés organiques de même qu'une faible proportion de composés inorganiques telle que des cendres ou des sels minéraux. Or l'indice de polarité de l'eau s'élève à 9,0. De ce fait découle l'hypothèse que la probabilité de présence dans l'eau de composés polaires porteurs de fonction alcool, cétone, acide ou aldéhyde est plus grande que celle des composés moins polaires du type hydrocarbure.

L'odeur caractéristique de brûlé pour l'extrait à l'hexane et de caramel pour l'extrait à l'acétate d'éthyle s'avère être un indicateur de l'identité des principaux composants extraits du lixiviat. Les substances organoleptiques qui causent ces odeurs et ces couleurs spécifiques permettent de soupçonner l'existence de réactions de Maillard ou de brunissement non-enzymatique. Ce type de réaction donne souvent naissance à des hétérocycles typiques tels que le furfural et le maltol, qu'il a d'ailleurs été possible de détecter lors de l'analyse par GC/MS. Tel que le démontrent les tableaux 3.2 et 3.3, la concentration relative pour le furfural (IK 835) atteint 1,41 % et 0,34 % pour l'extrait à l'hexane sur le lixiviat 1 et 2 respectivement. Tandis que pour l'extrait à l'acétate d'éthyle elle est de 17,84 % pour le lixiviat 1 et 15,23 pour le lixiviat 2. Pour le maltol (IK 1126), il est absent des extraits à l'hexane et présent à 2,91 % concernant le lixiviat 1. Le maltol exhale une odeur typique de caramel et le furfural dégage quant à lui une forte odeur de brûlé. Ce qui concorde adéquatement avec les résultats obtenus puisque les extraits à l'hexane sentent le brûlé et ceux à l'acétate d'éthyle libèrent un effluve de caramel. Cependant, l'odeur de caramel des extraits du lixiviat 2 ne peut être justifiée par la présence du maltol puisqu'il n'a pas été détecté. Il est envisageable que des composés similaires au maltol soient responsables de cette odeur caractéristique des extraits. Il est également connu que les réactions de Maillard entraînent la formation de composés affichant des odeurs caramélisées tels que les furanones et les pyranones [30-38].

Cependant, les odeurs dégagées des substances ne peuvent pas à elles seules déterminer le type de composés retrouvés dans un extrait. Dans ce cas-ci, il s'agit d'une confirmation additionnelle des réactions de cuisson du bois qui ont cours. Puisqu'il s'agit bel et bien d'une cuisson. Bien évidemment, il y dégradation thermique de l'hémicellulose, d'une atteinte partielle de la cellulose et d'une amorce d'autocondensation de la lignine. Cette dernière amènera l'apparition de composés phénoliques simples tels que le phénol (IK :981), l'ortho (IK :1061), le para (IK :1091) et le méta-crésol (IK :1087), le guaiacol (IK :1092), l'eugénol (IK :1353), de même que des composés benzéniques (voir tableau 3.2 et 3.3). Par contre, les produits de type furane, furanone et pyranone représentés concrètement dans les extraits sur le lixiviat par le furfural, le 5-methyl-2(5H)-furanone

(IK :980), et le maltol résultent possiblement de deux mécanismes connexes. Il est toutefois ardu de préciser si les deux voies empruntées pour aboutir à ces produits dans l'eau se font parallèlement ou consécutivement. La première hypothèse consiste dans une rupture des chaînes polymériques constituées de D-glucopyranose, rendant ce dernier disponible pour des réactions d'autocyclisation décrites à la figure 1.8. Ce mécanisme en chimie du bois est d'ailleurs déjà connu depuis des décennies [21]. L'autre voie empruntée dans l'obtention des pyranones est celle des réactions de Maillard. Outre les polymères de glucose, le bois contient également des sucres simples. Ceux-ci par des réarrangements connus en chimie alimentaire font naître des composés typiques lorsque tous les conditions sont respectées pour leur obtention [30-38].

Les conditions favorables aux réactions de Maillard s'énoncent comme suit : présence de sucre et de protéines, une humidité et une température élevée et un pH légèrement acide [39]. Or, en excluant la présence de protéines, c'est précisément l'environnement physico-chimique qui prévaut dans un four « Perdure ». Outre les pyranones, les furanes et furanones, d'autres produits de dégradation sont susceptibles d'apparaître dans un contexte de réactions de Maillard. Il s'agit des lactones qui ont d'ailleurs été détectées dans les deux lixiviats [30-39]. En effet le γ -decalactone (IK 1467) est présent dans l'extrait à l'hexane du lixiviat 1, dans un pourcentage de 1,31 % (voir tableau 3.1). Tandis que le butyrolactone (IK 915) a été détecté dans l'extrait à l'hexane pour les lixiviats 1 et 2, à 1,28 % et 1,38 % respectivement . Les lactones sont des hétérocycles organoleptiques affichant des odeurs variées et largement générées en chimie alimentaire. Toutefois, elles sont le plus souvent d'origine enzymatique [30-38-39].

3.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

L'utilisation d'un chromatographe à gaz couplé à la spectrométrie de masse a permis de compléter l'analyse chromatographique des extraits pour deux des trois lixiviats collectés. Les extraits du troisième lixiviat n'ont pu être analysés dans des délais

raisonnables. La préservation des échantillons est donc favorisée en purgeant les contenants avec de l'argon et en les conservant à basse température (4°C). Malgré ces précautions, l'analyse chromatographique doit avoir lieu dans les jours qui suivent l'extraction et ne doit pas dépasser une semaine.

L'appareil utilisé est un Hewlett-Packard HP-5890 (chromatographe à gaz) combiné à un spectromètre de masse HP-5972. Les conditions d'analyse pour la chromatographie en phase gazeuse sont celles-ci :

Conditions d'analyse par GC/MS :

- Colonne capillaire ZB-5 (30 m × 0.25 mm avec un film de 0.25 µm);
- Programmation de la température : 40 °C/min jusqu'à 210 °C et 10 °C/min jusqu'à 325°C;
- Injection (split injector) de 5 µL d'échantillon préparé en diluant 5 µL d'extrait dans 200 µL d'acétate d'éthyle (grade HPLC).
- Spectromètre de masse à 70 eV ;

Le tableau 3.2 présente les résultats d'analyse effectuée sur des extraits à l'hexane sur deux des trois lixiviats. Plus de vingt-cinq composés différents ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (chromatogrammes originaux en annexe 1 et 2). Les composés ont été identifiés avec leur spectre de masse et leur indice de Kovats obtenus, en les comparant avec les données de la littérature [40].

Tableau 3.2: Composés majeurs des extraits à l'hexane des lixiviats 1 et 2.

Composés identifiés (Indice de Kovats)	Pourcentage relatif % (aire)		Indice de Kovats
	Lixiviat #1	Lixiviat #2	
Furfural	1,41	0,34	835
Benzaldehyde	0,52	-	960
5-methyl-furfural	3,98	2,46	964
Phénol	0,71	0,49	981
Mesitylene	0,75	0,46	990
Benzyl alcohol	-	0,59	1037
o-cresol	1,27	0,83	1061
m-cresol	1,90	1,33	1087
o-guaiacol	4,11	3,60	1092
endo-fenchol	-	1,13	1126
4-methyl-benzenemethanol	1,30	1,56	1142
borneol	2,70	4,97	1173
terpinen-4-ol	0,87	1,26	1176
p-methyl-acetophenone	-	1,13	1182
p-cymen-8-ol	-	3,36	1187
α- terpineol	15,26	22,72	1193
verbenone	2,26	0,93	1200
stearaldehyde	0,86	-	1261
3',5'-dihydroxy-acetophenone	-	1,22	1273
2-hydroxy-5-methoxy-benzaldehyde	2,47	-	1277
5-acetoxyethyl-2-furaldehyde	1,25	1,76	1314
Eugenol	1,61	1,84	1353
γ-decalactone	1,31	-	1467
ethanol-2-(2-butoxyethoxy)-acetate	1,86	6,89	-
vanillin	6,65	8,82	1391
acetovanillone	1,22	1,74	1480
4-hydroxy-3-methoxy-benzene	acetic acid	-	
coniferaldehyde (1727)		2,54	
Total identifié:	60,61 %	80,55 %	

En concordance avec d'autres études reliées au gaz d'émission des usines de thermotransformation du bois, les composés suivants ont également été retrouvés dans les extraits à l'hexane et à l'acétate d'éthyle : le furfural, le 5-furaneméthanol, l'o-guaiacol et l' α -terpinéol [31]. À l'exception de l' α -terpinéol, tous ces composés proviennent de la dégradation partielle de l'hémicellulose, de la cellulose et de la lignine. Pour ce dernier, sa présence est expliquée par la lixiviation par l'eau des extractibles du bois, et plus spécifiquement des monoterpènes du genre pinène et para-menthadiène qui se trouvent dans le pin gris (*Pinus banksiana Lamb*) [41]. Contrairement aux recherches effectuées sur les gaz d'émission, la gamme de produits récupérée à l'aide d'eau lors du refroidissement est beaucoup plus grande que lors du captage des gaz d'émission. Les résultats de l'analyse chromatographique semblent montrer que la présence d'eau favorise la transformation de produits générés lors du chauffage.

La comparaison des tableaux 3.2 et 3.3, montre que les extraits à l'acétate d'éthyle contiennent, tel qu'attendus, davantage de composés polaires que les extraits à l'hexane. Les fonctions cétones, acides carboxyliques ainsi que les aldéhydes portés par les molécules des tableaux 3.2 et 3.3 proviennent en grande partie des réactions d'oxydation sur des groupements hydroxyle. Il est intéressant de souligner que ces entités moléculaires porteuses de groupements hydroxyle proviennent essentiellement de la dégradation des trois polymères du bois. La présence du coniferaldehyde trouve d'ailleurs son explication par l'oxydation probable de l'alcool coniferylique. Ce dernier provient d'une partielle rupture de la lignine par suite d'une élévation de la température. Le coniferaldehyde devient accessible à la solubilisation dans l'eau lors de l'étape du refroidissement.

**Tableau 3.3: Composés majeurs des extraits à l'acétate d'éthyle des lixiviats 1 et 2.
Identifiés par GC/MS**

Composés identifiés (Indice de Kovats)	Pourcentage relatif % (aire)		Indice de Kovats
	Lixiviat #1	Lixiviat #2	
Furfural	17,84	15,23	835
5-furan-methanol	2,12	4,61	859
1-acetoxy-2-propanone	5,16	4,58	875
butyrolactone	1,28	1,38	915
acetonyl acetone	tr.	0,58	933
5-methyl-2(5H)-furanone	-	0,37	
5-methyl-furfural	1,37	1,93	964
3-methyl-2(5H)-furanone	-	0,62	980
phenol	2,13	2,39	986
propanoic acid, 3-	27,07	-	990
ethoxy ethyl ester			
3-methyl-1,2-cyclopentanedione	-	1,35	1027
benzyl alcohol	-	1,52	1038
p-cresol	-	1,07	1091
2-hexyloxy-ethanol	15,08	-	1122
maltoïl	2,91	-	1126
5-hydroxymethyl-furfural	3,98	14,31	1234
acetoxymethyl-2-furaldehyde	0,93	1,22	1314
vanillin	4,99	12,48	1391
carvone hydrate	tr.	1,44	1424
acetovanillone	tr.	1,92	1480
4-hydroxy-3-methoxy-benzene acetic acid	-	5,23	1529
coniferaldehyde	4,50	11,82	1725
Total identifié:	89,36 %	84,05 %	

Comme il a été mentionné précédemment, beaucoup de composés chimiques identifiés tels que des pyranones, des furanones, des furanes et des lactones sont susceptibles d'informer sur le type de réactions qui ont lieu lors du traitement thermique du

bois ainsi que lors de son refroidissement par l'eau. Ces produits, quoique typique des réactions de Maillard ou de brunissement non-enzymatique n'excluent en rien les réactions de dégradation exclusivement thermique sur les polymères du bois. En fait l'hypothèse la plus avérée est que ces deux voies de synthèse empruntées générant les composés organiques identifiés dans les extraits, se font simultanément et en parallèle. Ce qui explique la quantité étendue de produits différents.

3.3 Évaluation de l'activité anticancéreuse du lixiviat et identification des composés bioactifs

L'approche préliminaire de séparation grossière des extraits de lixiviat prends son sens par le schéma de criblage de la figure 3.1. Le but étant de déterminer le potentiel de bioactivité et d'apporter des résultats bruts afin de conclure sur une éventuelle continuité du projet de valorisation. Pour ce faire, en tout premier lieu, la vérification de la bioactivité du matériel brut doit être effectuée selon une procédure connue [43]. Par la suite et suivant le schéma de la page suivante (figure 3.1), l'activité positive guidera d'abords le choix de l'extrait à séparer et ensuite déterminera la fraction sur laquelle concentrer ses efforts d'identification de la ou des substances imputables de la bioactivité.

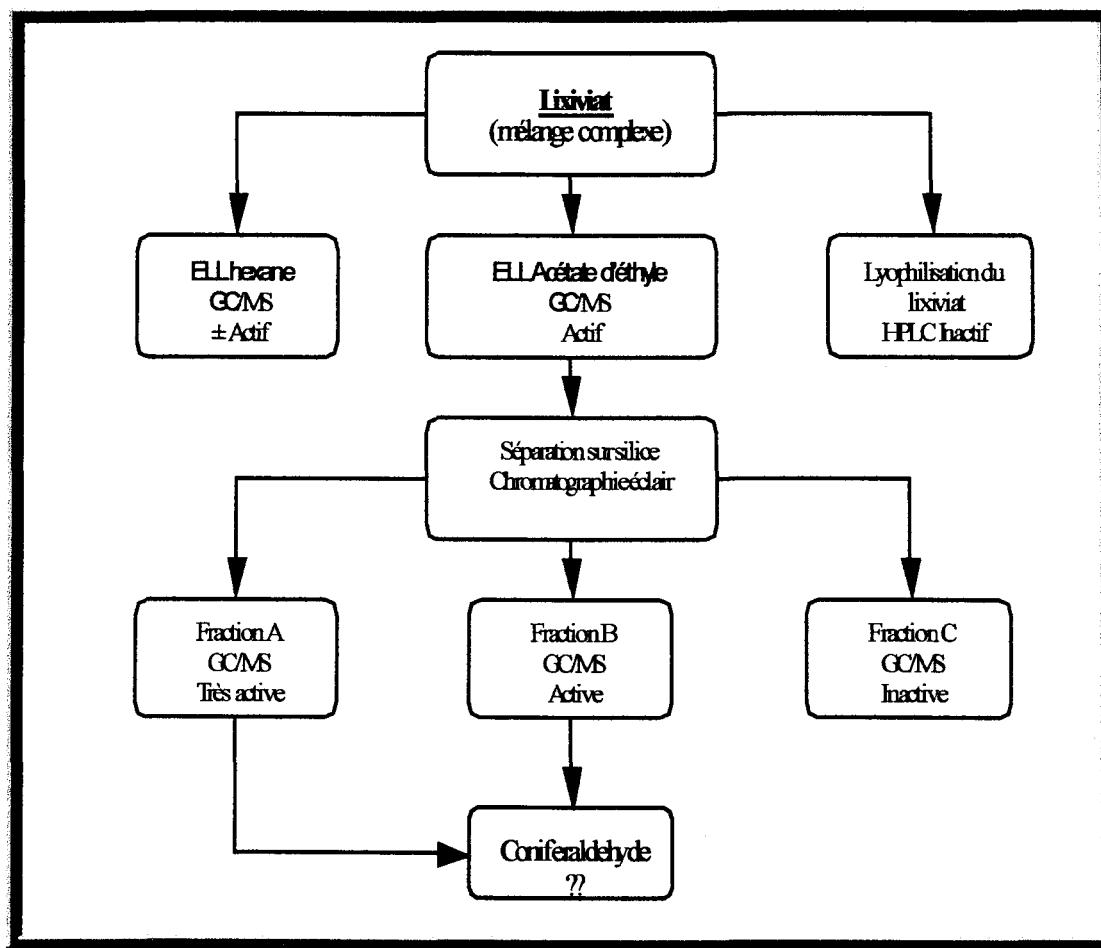


Figure 3.1 : Approche de criblage du lixiviat pour en évaluer sa bioactivité

Il a été démontré que le lixiviat brut est actif sur les cellules cancéreuses humaines du cancer des poumons (A-549) et du cancer du colon (DLD-1), tel que présenté au tableau 3.4. Dans cette première interprétation des résultats, il convient de constater que le lixiviat pris intégralement répond positivement à des valeurs d' IC_{50} de 3,5 % v/v pour les cellules A-549 et de 4,6 % v/v pour les cellules DLD-1. Puisque le lixiviat aqueux pris dans son intégralité démontre une activité relative, et ce malgré qu'il s'agisse d'une solution fortement diluée (en considérant les rendements), il semblait fort probable de retrouver une bioactivité réciproque pour les extraits.

Du point de vue de la bioactivité, les extraits à l'hexane et à l'acétate d'éthyle affichent une forte activité (plus marquée pour l'extrait à l'acétate d'éthyle). Il est

généralement d'usage de considérer qu'un extrait est actif lorsque la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de la croissance cellulaire (IC_{50}) se situe en deçà de 100 $\mu\text{g/ml}$. Plus concrètement, la bioactivité d'intérêt se situe à des valeurs de 100 μM d'un produit pur ou relativement pur puisqu'il s'agit de limite de concentration sanguine acceptable pour les humains. Dans le cas des extraits, il s'agit encore à ce stade d'un mélange assez complexe de plusieurs composés. Néanmoins, l'extrait le plus actif est celui à l'acétate d'éthyle avec une prédominance pour les cellules DLD-1. En se référant à la figure 3.1 illustré ci-avant, la décision de se concentrer sur la séparation de l'extrait le plus actif suit une démarche cohérente de criblage. Évidemment, chaque extract et chaque fraction doivent être conformément et strictement analysé afin de déterminer le ou les produits responsables de la bioactivité.

Il existe cependant un fait intéressant qui pourra faire l'objet d'études subséquentes. Après chaque extraction, le lixiviat était récupéré et testé de nouveau dans sa forme aqueuse et donc débarrassé d'un volume de composés organiques correspondant à la masse de l'extrait. Théoriquement, l'extraction retranche de la phase aqueuse des composés bioactifs selon les données obtenues, et donc celle-ci ne devrait plus être appréciable par des tests sur les phases aqueuses après extraction. Or ce n'est pas le cas, par exemple pour les cellules DLD-1, la valeur d' IC_{50} pour le lixiviat brut est de 4,6 % et atteint 2,5 % après avoir subit l'extraction à l'hexane pour ensuite arriver à 3,3 % après l'extraction à l'acétate d'éthyle. Ces valeurs indiquent la forte probabilité qu'il demeure dans la phase aqueuse des composants chimiques responsables d'une activité inhibitrice pour les cellules DLD-1 qui ne sont pas extraits par les solvants utilisés. Cette observation peut également être poussée davantage par le fait d'une plus grande bioactivité après l'extraction à l'hexane et conséquence de quoi des produits plus actifs demeureraient dans le lixiviat et leur action serait augmentée par la suppression des substances extraites. Cependant et puisqu'il s'agit de tests préliminaires, pour corroborer ces observations, la nécessité de reproduire ces tests conformément à une stricte exactitude va sans dire et se passe d'explication.

Pour faire suite au schéma de la figure 3.1, l'extrait à l'acétate d'éthyle a été séparé sur silice par chromatographie éclair à haute performance (HPFC). Trois fractions

majoritaires ont été récupérées et chacune d'elles fut parallèlement analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette étape est essentielle afin de circonscrire graduellement la plage de produits attribuables d'une bioactivité. Le système d'élution se constituait d'acétate d'éthyle et d'hexane dans des proportions de 90:10. La présence d'acide dans le système de solvant d'élution, qui aurait contribué à éviter les trainées (en anglais « tailing ») de produits polaires sur la silice, fût proscrit pour éviter les faux résultats positifs [36]. De plus, la difficulté de la restitution d'une fraction légèrement acide dans sa forme originale lorsque les quantités sont minimales et que les composés chimiques sont volatils se réalise avec grandes difficultés et ce, aux dépens d'une perte potentielle de produits.

La première fraction nommée A démontre l'activité la plus intéressante avec un IC₅₀ de 57 µg/ml pour les cellules DLD-1. Quant à la fraction B, elle manifeste également un intérêt mais la valeur de 84 µg/ml indique que les composés actifs ont diminué en proportion. La fraction C est immédiatement écarté compte tenu de son IC₅₀ trop élevée.

L'analyse par GC/MS des fractions est effectuée en simultané des tests de bioactivité et ceci pour éviter toute ambiguïté quant à une éventuelle isomérisation ou oxydation des échantillons soumis. Le tableau 3.4 résume les résultats d'analyse par GC/MS effectuée sur les fractions. Bien que l'abondance de plusieurs produits diminue de la fraction A à la Fraction C, un en particulier a retenu l'attention. Il s'agit du coniferaldehyde, un phénylpropane, présent en proportion relative à 9,85 % pour la fraction A, à 2,43 % pour la fraction B et absent dans la fraction C. Le choix de tester ce produit à l'état pur est basé sur la diminution de sa concentration de la fraction A à la fraction C. Cette observation peut permettre de penser que ce produit est responsable de l'activité puisque les valeurs en IC₅₀ diminuent de la fraction A à C.

Tableau 3.4 : Résultats des tests de bioactivité sur le lixiviat, les extraits de lixiviats et les fractions des extraits

Extrait ou fraction	IC ₅₀ DLD-1 ¹	IC ₅₀ A-549 ²
Lixiviat brut aqueux	4,6 % v/v	3,5 % v/v
Extrait à l'hexane	70 µg/ml	149 µg/ml
Lixiviat aqueux après ELL hexane	2,5 % v/v	3,7 % v/v
Extrait à l'acétate d'éthyle	49 µg/ml	114 µg/ml
Lixiviat aqueux après ELL acétate d'éthyle	3,3 %	4,8 %
<u>Séparation par chromatographie-éclair</u>		
<u>ELL EtOAc</u>		
Fraction A	57 µg/ml	109 µg/ml
Fraction B	84 µg/ml	255 µg/ml
Fraction C	257 µg/ml	> 400 µg/ml
Coniferaldehyde	66 µM	> 400 µM

¹DLD-1 : cellules cancéreuses humaines du cancer du colon

²A-549 : cellules cancéreuses humaines du cancer des poumons

En se référant au tableau 3.4 concernant les tests de bioactivité, la valeur d'IC₅₀ de 66 µM sur les cellules DLD-1 certifie que le coniferaldehyde est actif. Confirmant de ce fait que la bioactivité du lixiviat vient en partie du coniferaldehyde. Cependant, il est impossible de conclure que ce produit est seul et entièrement responsable de l'activité inhibitrice sur les cellules DLD-1. En fait d'autres molécules diminuent en proportion comme la vanilline, le 2-hexyloxy-ethanol ou encore l'acide propanoïque 3-ethoxy ethyl

ester. L'examen de leur bioactivité respective permettrait de raffiner davantage les résultats. L'activité positive des phases aqueuses additionne les possibilités de trouver d'autres produits d'intérêt, très hydrosolubles. Une molécule dotée d'une grande affinité pour l'eau contribue à sa biodisponibilité dans les organismes vivants et suscite une attention particulière. D'après les résultats des tests de bioactivité, les phases aqueuses contiennent des composés chimiques actifs que les solvants, aussi polaire que l'acétate d'éthyle, ne peuvent extirper. Des recherches plus poussées, en HPLC/MS par exemple, permettraient d'analyser le contenu total du lixiviat aqueux avant et après extraction et ce avec l'obtention de la masse et d'un patron de fragmentation des multiples composantes des phases aqueuses [42].

Table 3.5: Composés majeurs des fractions obtenus par HPFC de l'extrait à l'acétate d'éthyle. Identifiés par GC/MS

Composés identifiés (Kovats index)	Pourcentage relatif %			Indice de Kovats
	Fraction A	Fraction B	Fraction C	
phenol	1,13	-	-	986
propanoic acid, 3-				
ethoxy ethyl ester	10,03	2,07	-	990
benzyl alcohol	1,09	1,11	-	1038
2-hexyloxy-ethanol	42,14	19,81	18,79	1122
ethanol-2-butoxyethoxy	-	13,41	81,21	-
5-hydroxymethyl-furfural	-	10,28		1234
vanilline	10,74	3,11	-	1391
4-hydroxy-3-methoxy-benzene acetic acid	4,54	-	-	1529
coniferaldehyde	9,85	2,43	-	1725

CHAPITRE 4
CONCLUSION

En guise de rappel, cette recherche visait en tout premier lieu deux grands objectifs. Le premier consistait dans l'analyse des composés chimiques solubilisés dans le lixiviat et le second objectif était d'évaluer le potentiel de bioactivité du lixiviat. L'approche préconisée comportait au préalable une extraction par solvant sur le lixiviat suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'étape d'extraction a permis de démontrer que les rendements obtenus sont plus élevés avec l'acétate d'éthyle qu'avec l'hexane. Les analyses chromatographiques des deux extraits semblent confirmer l'existence de réactions de cuisson lors de la thermotransformation, de même que des réactions d'oxydation, confirmée par l'identification de composés de type phénylpropane tel que le coniferaldehyde.

Quant au second objectif, les tests ont d'abord permis de découvrir une activité anticancéreuse du lixiviat pris intégralement. Les extraits à l'hexane et à l'acétate d'éthyle ont également fait ressortir qu'ils sont actifs seulement sur les cellules de type DLD-1 (cancer du côlon). Par la suite, et guidé par les valeurs d' IC_{50} obtenue, l'extrait à l'acétate d'éthyle a été fractionné par chromatographie éclair à haute performance (HPLC). La première fraction obtenue lors de cette étape fut la plus active.. Les chromatogrammes des fractions testées furent analysés avec attention afin de corrélér l'abondance de certains produits avec la bioactivité et ainsi, identifier la molécule responsable de cette activité biologique. Le coniferaldehyde a montré une activité et il est probable qu'il soit partiellement responsable de l'activité anticancéreuse de l'extrait à l'acétate d'éthyle. Ces résultats concernant l'activité du coniferaldehyde n'ont jusqu'alors jamais été publiés.

Ce travail ne constitue qu'une brève introduction sur l'analyse chimique et sur le potentiel d'utilisation biopharmaceutique du lixiviat issu de la thermotransformation « Perdure » du bois de pin gris.

BIBLIOGRAPHIE

1. Canada,. Strategic Options for the Management of CEPA-Toxic Substances from the Wood Preservation Sector, Canadian Environmental Protection Act 1999, volume 1.
2. Gray, S.; Houlihan, J. All Hands on deck. Environmental working group, 2002.
3. Townsend, T.G.; Solo-Gabriel, H.; Tolaymat, T; Stook, K. Impact of chromated copper arsenate (CCA) in wood mulch. *The science of the total environment*, 2003, 309(1-3), 173-185.
4. Decker, P.; Cohen, B.; Butala, J.H.; Gordon, T. Exposure to wood dust and heavy metals in workers using CCA pressure-treated wood. *AIHA Journal*, 2002, 63(2), 166-171.
5. Hingston, J.A.; Collins, C.D.; Murphy, R.J.; Lester, J.N. Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: a review. *Environment pollution*, 2001, 111(1), 53-56.
6. Fields, S. Caution: children at play: how dangerous is CCA? *Environmental health perspective*, 2001, 109(6), A262-A269.
7. Hullinger G ; Sangster, L. ; Colvin, B. ; Frazier, K. Bovine arsenic toxicosis from ingestion of ashed copper-chrome-arsenate treated timber. *Vet Hum toxicol*, 1998, 40(3), 147-148.
8. Avis de réévaluation des agents industriels de préservation du bois. Agriculture Canada, Direction générale, production et inspection des aliments, Direction des pesticides. 1992.
9. Deegan, D. EPA finalizes voluntary cancellation of virtually all residential uses of CCA-treated wood. Press Advisory. U.S. Environmental protection Agency. March 2003.
10. Université du Québec à Chicoutimi. Rapport annuel 2002-2003.
11. Vernois, M. Heat treatment of wood in France-State of the art. , Proceedings of Special Seminar on Heat Treatment of Wood, Antibes, France, February 9, 2001, A.O. Rapp Ed.; BFH the federal research Centre for forestry and forest products, Hamburg, 2001; 39-46.

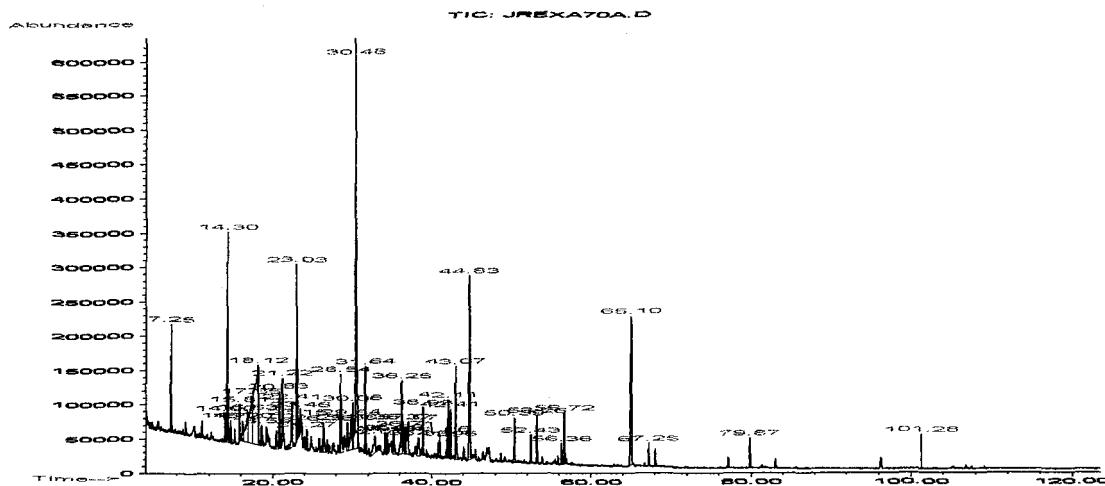
12. Syrjanen, T; Kestopuu,O; Jamsa, S.; Viitaniemi, P. Heat treatment of wood in Finland-State of the art, Proceedings of Special Seminar on Heat Treatment of Wood, Antibes, France, February 9, 2001, A.O. Rapp Ed.; BFH the federal research Centre for forestry and forest products, Hamburg, 2001; 11-19.
13. Mazela, B.; Zakrzewski, R.; Grześkowiak, W.; Cofta, G.; Bartkowiak, M. Preliminary research on the biological resistance of the thermally modified wood. Proceeding of the first European conference on wood modification, Ghent, Belgium, April 3-4, 2003; Van Acker, J., Hill, C. Eds; Ghent; EUR 20639, 113-120.
14. Jamsa, S.; Viitaniemi, P. Heat treatment of wood. Better durability without chemical, Nordiske Trebeskyttelsesdager, 1998, 47-51.
15. Raimo, A.; Kuoppala, E.; Oesch, P. Formation of the main degradation compound groups from wood and its components during pyrolysis. Journal of analytical and applied pyrolysis, 1996, 36, 137-148.
16. Chanrion, P.; Schreiber, J. Les différents procédés, *Bois traité par haute température*, Edition CTBA; Paris; 2002; 115 p.
17. Information provenant de l'industrie Éco-Bois, St-Ambroise, Québec
18. Fengel, D.; Wegener, G. Wood, Chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter edition, Berlin-New-York, 1984, 613 p.
19. Gosselink, R.J.A.; Krosse,A.M.A.; van der Putten, J.C.; van der Kolk, J.C.; de Klerk-Engels, B.; van Dam, J.E.G. Wood preservation by low-temperature carbonisation. Industrial Crops and products, 2004, (19) 3-12.
20. Hopkins, W.G. Physiologie végétale. De Boeck edition, Bruxelle, 2003, 514 p.
21. Sjörström, E. Wood chemistry, fundamentals and applications. Second edition, Academic Press, 1993, 293 p.
22. Lewis, N.G.; Paice, M.G. Plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation. American Chemical Society, Washington D.C., 1989, 676 p.
23. Carey, F.A.; Sundberg, R.J. Advanced organic chemistry. 3rd edition. Plenum Press , New-York, 1990, 2 v.

24. Kirk T.K.; Farrell R.L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 1987, 41, 465–505.
25. Stamm, A.J.; Burr, H.K.; Kline, A.A. Heat stabilized wood. Rep .Nr. R. 1621. Madison. 1946.
26. Militz,H.; Tjeerdsma, B. Heat treatment of wood by Plato process. , Proceedings of Special Seminar on Heat Treatment of Wood, Antibes, France, February 9, 2001, A.O. Rapp Ed.; BFH the federal research Centre for forestry and forest products, Hamburg, 2001; 27-36.
27. Rapp, A.O.; Sailer, M.; Heat treatment of wood in Germany-State of the art. , Proceedings of Special Seminar on Heat Treatment of Wood, Antibes, France, February 9, 2001, A.O. Rapp Ed.; BFH the federal research Centre for forestry and forest products, Hamburg, 2001; 47-62.
28. Dumon, R.; Gélus, M. Valorisation chimique du bois. Masson, 1982, 167 p.
29. Amen-Chen, C.; Pakdel, H.; Roy, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. *Bioresource technology*, 2001, 79, 277-299.
30. Pigman, W. *The carbohydrates*. Academic press, New-York, 1970, v.1A,
31. Graf, N.; Haas, W.; Böchzel, H. Characterization of gaseous emissions from a small-size industrial plant for thermal wood modification by GC/MS. Proceeding of the first European conference on wood modification, Ghent, Belgium, April 3-4, 2003; Van Acker, J., Hill, C. Eds; EUR 20639, 55-58
32. Rodriguez, K.R.;Klopper, J.W.; Weaver, C.F.; Robertson, D.G. Control of plant parasitic nematodes with furfural: A naturally occurring fumigant. *Nematropica*, 1993, 23 (1), 63-73.
33. Guenther, E. *The essential oils* . R. E. Krieger , Fla, 1972, réimp. de l'édition de 1948
34. Koh, W.S.; Yoon, S.Y.; Kwon, B.M.; Jeong, T.C. ; Nam, K.S. ; Han, M.Y. Cinnamaldehyde inhibits lymphocyte proliferation and modulate T-cell differentiation. *Int. J. Immunopharmacol.* 1998, (20) 643-660.

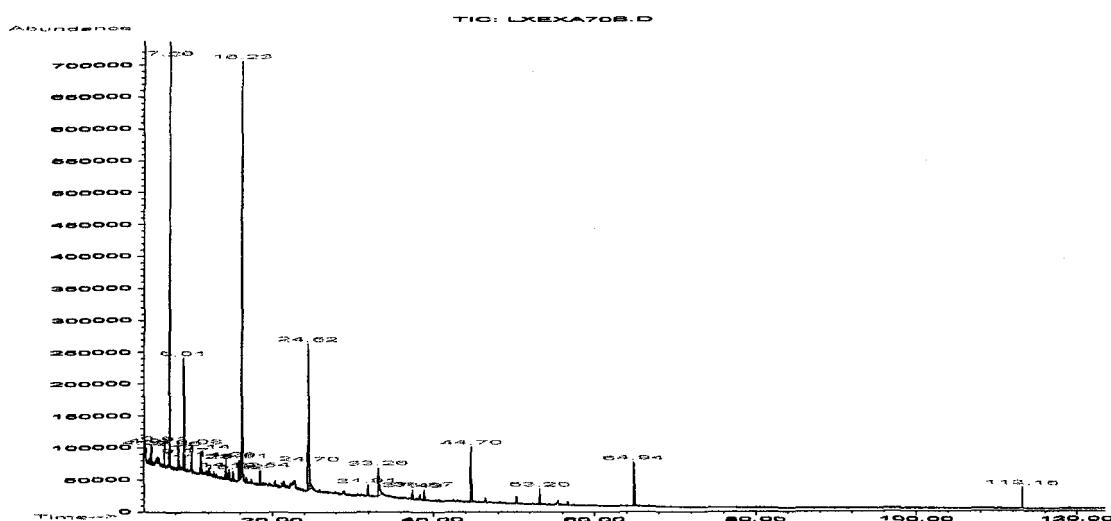
35. Shaughnessy, D.T.; Setzer, R.W.; DeMarini, D.M.; the antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in salmonella TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mutat.Res.* 2001, (480-481), 55-69.
36. Gailliot, F.P. Initial Extraction and product capture. Natural product isolation, Cannell, R.J.P.; Humana Press; Totowa, New-Jersey, 1998; 59-68.
37. Colegate, M.S.; Molyneux, R.J. Introduction and overview. Bioactive natural products : detection, isolation and structural determination. CRC Press; Boca Raton, Florida, 1993; 2-4
38. Richard, H. Connaissance de la nature des arômes alimentaires, Les arômes alimentaires , Edition CTBA; Paris; 2002; 11-33.
39. Parliment, T.H.; Morello, M.J.; McGorrin, R.J. Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave, and Extrusion Processes. American Chemical Society, Washington D.C, 1994, 492 p.
40. Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. Allured Publ.Corp., Carol Stream, Illinois, 2001.
41. LASEVE, UQAC, rapport d'analyse interne sur l'huile essentielle de pin gris (*Pinus banksiana Lamb*)
42. Zhou, S.; Hamburger, M. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis. Evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces. *Journal of chromatography A*, 1996, (755) 189-204.
43. Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, E.; Madelmont, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil : production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta medica*, 2003, 69 (5) 402-407.

ANNEXES

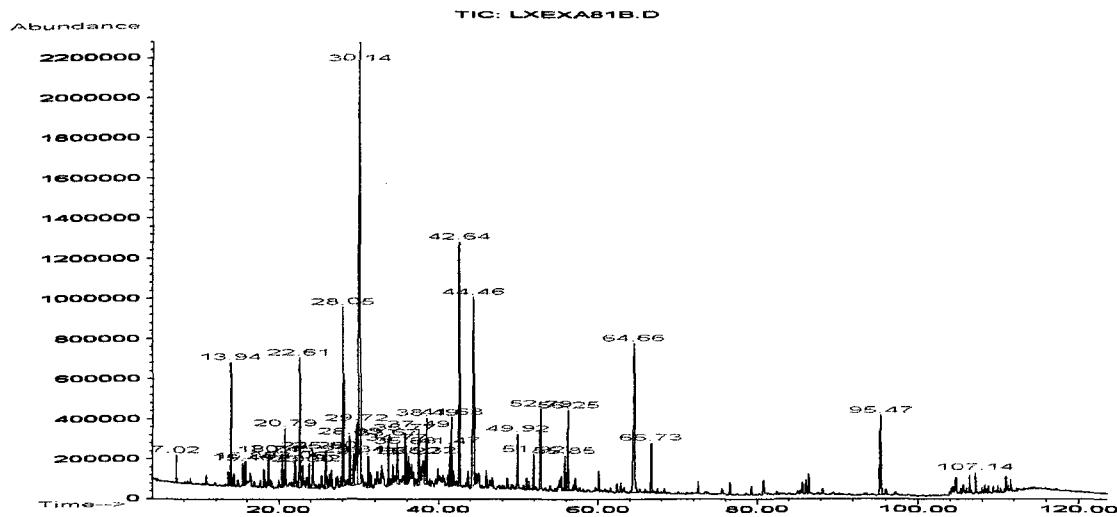
ANNEXE 1

Chromatogrammes des extraits du lixiviats de pin gris (*Pinus Banksiana Lamb.*)

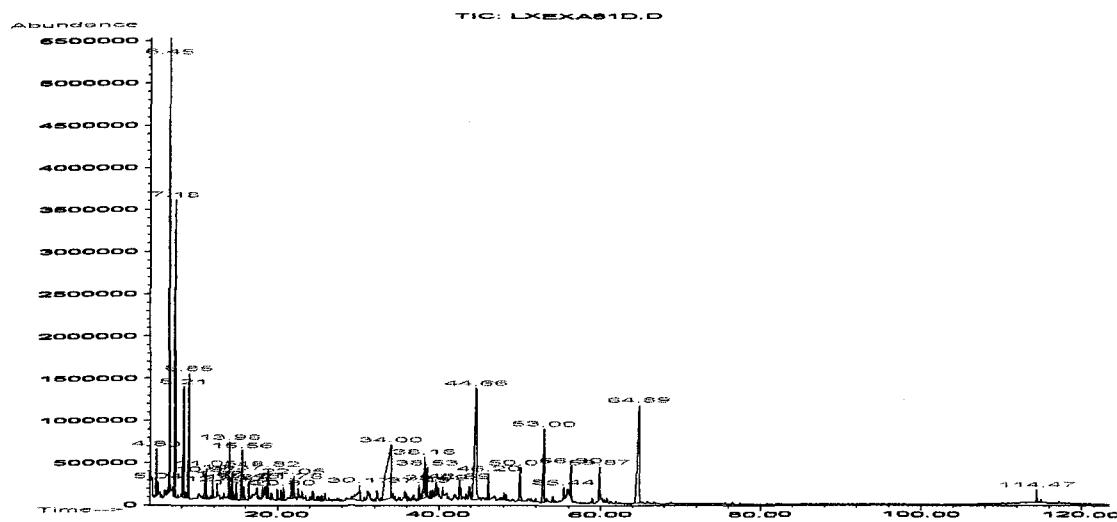
Chromatogramme (« total ion chromatogram ») d'un extrait à l'hexane obtenu à partir du lixiviat # 1



Chromatogramme (« total ion chromatogram ») d'un extrait à l'acétate d'éthyle obtenu à partir du lixiviat # 1



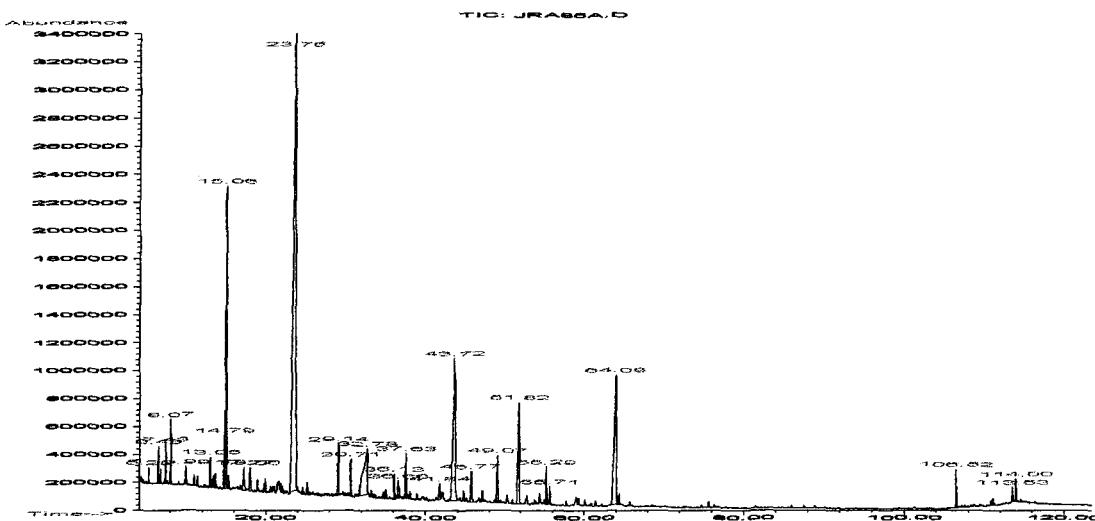
Chromatogramme (« total ion chromatogram ») d'un extrait à l'hexane obtenu à partir du lixiviat # 2



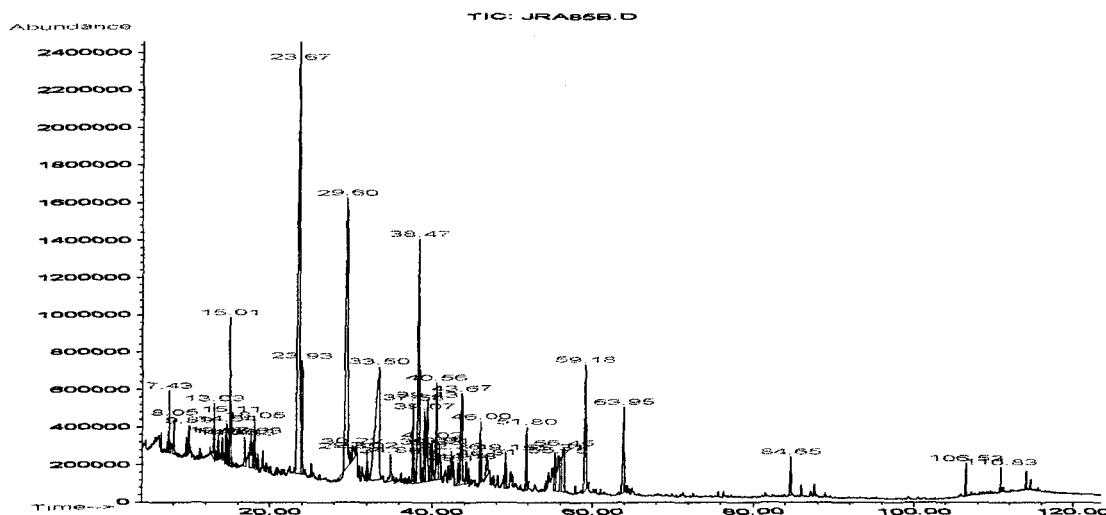
Chromatogramme (« total ion chromatogram ») d'un extrait à l'acétate d'éthyle obtenu à partir du lixiviat # 2

ANNEXE 2

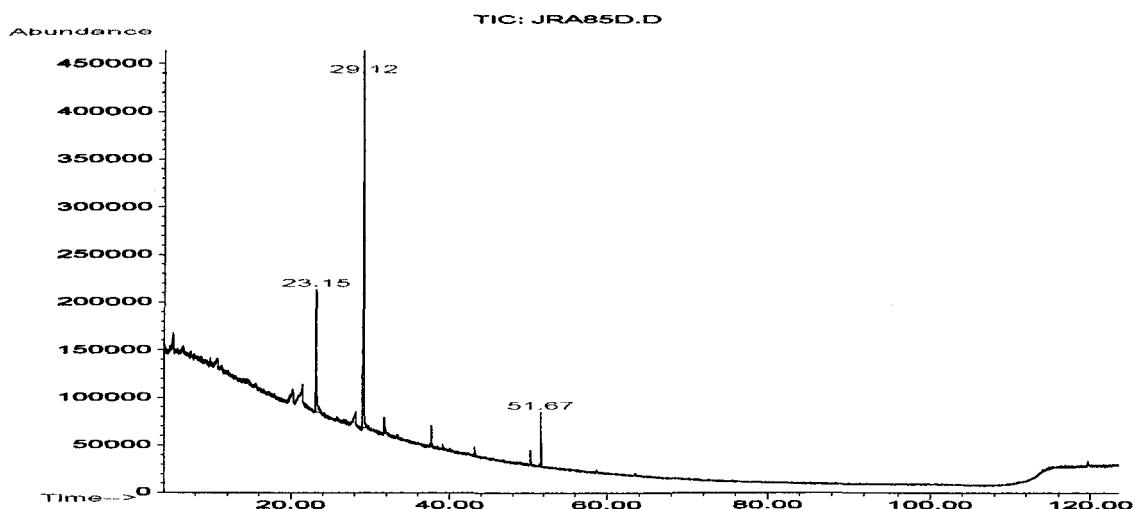
Chromatogrammes des fractions obtenus par HPFC. Fractionnement d'extrait à l'acétate d'éthyle issu du lixiviat de pin gris (*Pinus Banksiana Lamb.*)



Chromatogramme (« total ion chromatogram ») de la fraction A



Chromatogramme (« total ion chromatogram ») de la fraction B



Chromatogramme (« total ion chromatogram ») de la fraction C