

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

PAR
RÉMY LAROUCHE
B.Sc. (CHIMIE)

EXTRACTION, CARACTÉRISATION
ET BIOTRANSFORMATION DE LA LIGNINE
DE KLASON EXTRAITE DE L'ÉPINETTE BLANCHE
PICEA GLAUCA (MOENCH) VOSS.

MARS 1993



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.

RÉSUMÉ

La lignine de Klason issue de l'épinette blanche, *Picea glauca* (Moench) Voss, est extraite selon une combinaison de deux (2) méthodes d'extraction décrites dans la littérature et adaptées à notre étude. La première étape consiste à éliminer tous les extractibles de la biomasse végétale par l'emploi d'un extracteur de type soxhlet. Le mélange de solvant permettant l'extraction est composé de toluène et d'éthanol dans des proportions de (2:1). Le résidu obtenu est hydrolysé avec une solution d'acide sulfurique 72% (v/v) afin de solubiliser la cellulose et les hémicelluloses. Une hydrolyse finale est réalisée avec H₂SO₄ 5% afin de produire une lignine de Klason conforme aux études réalisées antérieurement.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet l'identification des groupements fonctionnels qui caractérisent la lignine. Les échantillons sont analysés à l'état solide (en suspension dans le KBr). L'unité guaïacyle est caractéristique de la lignine extraite de conifère et s'observe dans la région à 1270 cm⁻¹. Les extractibles obtenus après extraction sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. L'identification de ceux-ci révèle la présence d'acides résiniques et de terpènes.

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du carbone-13 est utilisée conjointement avec la spectrométrie de masse par atomes rapides (FAB/MS). Ces techniques spectroscopiques permettent l'élucidation de structures dimériques d'interunités β -O-4', β -1', β - β ', β -5', 5-5' et 4-O-5'. La majorité des résultats obtenus démontrent la présence de liens interunités de type β -O-4'. L'utilisation d'un logiciel informatique, réalisé dans le cadre de cette étude, permet l'élaboration de structures monomériques et dimériques.

Après compilation des données de la lignine de Klason, une biotransformation est réalisée en milieu aqueux par *Phanerochaete chrysosporium*. Par divers mécanismes d'oxydation, le microorganisme utilisé permet la réduction des unités de lignine en des unités plus petites. Des mécanismes de polymérisation et de dépolymérisation sont observés par chromatographie de perméation sur gel. Des résultats semblables ont également été observés dans des études antérieures.

Suite à la biotransformation, les unités les plus importantes qui se retrouvent après une période de 266 heures sont des unités de masses moléculaires de 1 500 et 700 daltons. L'unité de masse moléculaire de 700 daltons tend à augmenter progressivement après 266 heures de fermentation.



Rémy Larouche



Jean-Marie Hachey

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement monsieur Jean-Marie Hachey qui, à titre de directeur de recherche, m'a apporté tout le support logistique et financier pour la réalisation de ce mémoire. Aussi, un remerciement particulier à monsieur D.S. Chahal de l'Institut Armand-Frappier qui, par ses compétences en microbiologie, m'a enseigné la base en ce domaine lors d'un stage de deux (2) semaines.

Aussi, pour l'échantillonnage de la biomasse végétale dans le secteur de Rivière Éternité, un remerciement sincère à mon père, Lucien Larouche. Je voudrais remercier mes collègues que je côtoie depuis plusieurs années: André Barrette, Jean-Marc Gauthier et Conrad Chrétien pour leur assistance technique. Un merci sincère à monsieur Denis Larrivée qui, m'a fourni le matériel nécessaire par la chromatographie d'exclusion.

Un remerciement particulier à ma mère, Nicole et à ma soeur, Sylvie, qui en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études, m'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité.

Des remerciements vont également à la Fondation de l'UQAC ainsi qu'au programme d'aide à la recherche de l'Université du Québec (PRODAR) pour leur aide financière.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIERES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
ANNEXES	xiv
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	5
2.1 Description de l'épinette blanche, <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	6
2.2 Échantillonnage.....	11
2.3 Préparation de la biomasse.....	13
2.4 Description de la lignine.....	14
2.4.1 Généralités.....	14
2.4.2 Structures de base	14
2.5 Extraction de la lignine	24
2.5.1 Extraction de la lignine selon Funaoka et Abe ...	24
2.5.2 Extraction de la lignine de Klason	25
2.6 Caractérisation de la lignine	30
2.6.1 Chromatographie d'exclusion	30
2.6.2 Spectroscopie infrarouge	39
2.6.3 Spectroscopie ultraviolette	42
2.6.4 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du carbone-13	43
2.6.5 Spectrométrie de masse (FAB/MS)	46

2.7	Biotransformation de la lignine de Klason	48
2.7.1	Description du microorganisme	48
2.7.2	Milieu de culture	50
2.7.3	Biotransformation	50
2.7.4	Préparation des échantillons	55
CHAPITRE III:	RÉSULTATS ET DISCUSSION	57
3.1	Caractérisation des extractibles	58
3.2	Composition élémentaire de la lignine	58
3.3	Analyses spectroscopiques infrarouges	64
3.4	Analyses spectroscopiques U.V.	83
3.5	Interprétation des RMN du carbone-13 et FAB/MS	87
3.5.1	Généralités	87
3.5.2	Distribution de groupements fonctionnels	88
3.5.2.1	Aldéhydes et cétones	94
3.5.2.2	Acides carboxyliques	94
3.5.2.3	Composés aromatiques	101
3.5.2.4	Carbones aliphatiques oxygénés	109
3.5.2.5	Groupements méthoxyles	118
3.5.2.6	Composés aliphatiques non-oxygénés	121
3.5.3	Comparaison des spectres	128
3.5.4	Sous-structure monomériques	130
3.5.5	Sous-structure dimériques	135
3.5.5.1	Unités dimériques de type β -O-4'	135
3.5.5.2	Unités dimériques de type β -5'	140
3.5.5.3	Unités dimériques de type β -1'	140
3.5.5.1	Unités dimériques de type β -B'	144
3.5.5.1	Unités dimériques de type 5-5'	144
3.5.5.1	Unités dimériques de type 4-O-5' ...	144
3.5.6	Caractérisation d'oligolignols	147
3.6	Biotransformation de la lignine de Klason	156

CHAPITRE IV: CONCLUSION	164
BIBLIOGRAPHIE	167
ANNEXES	177

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1	Constituants majeurs de l'arbre	7
FIGURE 2	Photo de l'épinette blanche <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	8
FIGURE 3	Composition chimique du bois	10
FIGURE 4	Localisation du site d'échantillonnage	12
FIGURE 5	Unités de base de la lignine	16
FIGURE 6	Unités de base issus de trois alcools phénylpropanoïdes	17
FIGURE 7	Mécanisme de polymérisation radicalaire	19
FIGURE 8	Formation de dilignols	20
FIGURE 9	Formation de la lignine via les quinones méthylures oligolignols ..	21
FIGURE 10	Dimères de base de la lignine de type β -O-4', β -5' et β -1'	22
FIGURE 11	Dimères de base de la lignine de type β - β ', 5-5' et 4-O-5'	23
FIGURE 12	Schéma du protocole d'extraction de la lignine de Klason	27
FIGURE 13	Montage de la pré-extraction au soxhlet	28
FIGURE 14	Structure moléculaire du Séphadex	31
FIGURE 15	Schéma du système chromatographique	32
FIGURE 16	Courbe d'étalonnage de la chromatographie sur gel	38
FIGURE 17	Visualisation de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> au microscope	49
FIGURE 18	Croissance de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> sur gelose à 25°C	51
FIGURE 19	Méthodologie détaillée de la biotransformation de la lignine de Klason	54
FIGURE 20	Spectre infrarouge du bois brut (avec extractible)	65

FIGURE 21	Spectre infrarouge du bois extrait (sans extractible)	67
FIGURE 22	Spectre infrarouge de la lignine de Klason	68
FIGURE 23	Comparaison des trois spectre issus de l'épinette blanche	69
FIGURE 24	Spectres infrarouges du bois brut et de la lignine de Klason entre 1 000 et 1 800 cm^{-1}	70
FIGURE 25	Spectres infrarouge dans la région de 800 à 1300 cm^{-1}	74
FIGURE 26	Spectre infrarouge des extractibles	75
FIGURE 27	Spectre infrarouge de soustraction représentant la cellulose	76
FIGURE 28	Spectre UV de la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche ..	84
FIGURE 29	Comparaison de spectres UV de la lignine de Klason biotransformée entre 0 et 188 heures	85
FIGURE 30	Comparaison de spectres UV de la lignine de Klason biotransformée à partir de 212 heures	86
FIGURE 31	Représentation des différents groupements fonctionnels reliés à la spectrométrie RMN du carbone-13	89
FIGURE 32	Spectre RMN du carbone-13 du bois brut	91
FIGURE 33	Spectre RMN du carbone-13 du bois sans extractible	92
FIGURE 34	Spectre RMN du carbone-13 de la lignine de Klason	93
FIGURE 35	Superposition de spectres obtenus par RMN du carbone-13	129
FIGURE 36	Sous-structures monomériques de la lignine de Klason	132
FIGURE 37	Spectre FAB/MS des unités monomériques	133
FIGURE 38	Unités de base issues d'alcools phénylpropanoïdes identifiées par FAB/MS	134
FIGURE 39	Identification de sous-structures dimériques de base de la lignine ..	136
FIGURE 40	Sous-structures dimériques de type β -O-4'	138
FIGURE 41	Spectre FAB/MS des unités dimériques de type β -O-4'	139

FIGURE 42	Structures dimériques de type β -5'	141
FIGURE 43	Structures dimériques de type β -1'	142
FIGURE 44	Spectre FAB/MS des unités dimériques de type β -5' et β -1'	143
FIGURE 45	Identification de sous-structures dimériques de type 4-O-5' et 5-5'.	145
FIGURE 46	Spectre FAB/MS des unités dimériques de type β -5' et β -1'.....	146
FIGURE 47	Trimère de type β -O-4' et β - β '	148
FIGURE 48	Identification d'un fragment majoritaire de type β -O-4'	149
FIGURE 49	Identification d'un fragment de quatre (4) unités de type β -O-4' et β -5'	150
FIGURE 50	Identification d'un fragment de cinq (5) unités de type β -O-4' et β -5'	151
FIGURE 51	Identification d'un fragment de 1104,4 u.m.a. de type β -O-4' et 5-5'	152
FIGURE 52	Schéma d'une structure de type β - β ' et β -1'	154
FIGURE 53	Structure modèle de la lignine extraite de conifère	155
FIGURE 54	Chromatographe de la biotransformation de la lignine de Klason entre 0 et 68 heures	157
FIGURE 55	Chromatographe de la biotransformation de la lignine de Klason jusqu'à 188 heures	158
FIGURE 56	Chromatographe de la biotransformation de la lignine de Klason entre 212 et 266 heures	159
FIGURE 57	Évolution de la biotransformation de la lignine pour les hautes masses moléculaires	162
FIGURE 58	Évolution de la biotransformation de la lignine pour les faibles masses moléculaires	163

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Conditions d'analyse par chromatographie de perméation sur gel	36
TABLEAU II	Caractéristiques des échantillons standards	37
TABLEAU III	Conditions d'analyse de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier	41
TABLEAU IV	Conditions d'analyse de la spectrométrie RMN du carbone-13 à l'état solide	45
TABLEAU V	Conditions d'analyse de la spectrométrie de masse par atomes rapides (FAB/MS)	47
TABLEAU VI	Milieu de culture et de fermentation	53
TABLEAU VII	Extractibles provenant de l'épinette blanche	59
TABLEAU VIII	Composition élémentaire de la lignine de Klason	63
TABLEAU IX	Identification des spectres IR du bois brut de l'épinette blanche <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	77
TABLEAU X	Identification des spectres IR du bois extrait de l'épinette blanche <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	79
TABLEAU XI	Identification des spectres IR de la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche <i>Picea glauca</i> (Moench) Voss..	81
TABLEAU XII	Déplacements chimiques observés en RMN du ¹³ C de l'épinette blanche (aldéhydes et cétones)	95
TABLEAU XIII	Interprétation des spectres RMN du ¹³ C des aldéhydes et cétones (203-184 ppm)	96

TABLEAU XIV	Déplacements chimiques observés en RMN du ^{13}C de l'épinette blanche (acides carboxyliques)	97
TABLEAU XV	Interprétation des spectres RMN du ^{13}C des acides carboxyliques (183-159 ppm)	99
TABLEAU XVI	Déplacements chimiques observés en RMN du ^{13}C de l'épinette blanche (carbones aromatiques quaternaires)	102
TABLEAU XVII	Interprétation des spectres RMN du ^{13}C des carbones aromatiques quaternaires (158-125)	104
TABLEAU XVIII	Déplacements chimiques observés en RMN du ^{13}C de l'épinette blanche (carbones aromatiques tertiaires)	108
TABLEAU XIX	Interprétation des spectres RMN du ^{13}C des carbones aromatiques tertiaires (124- 107 ppm)	110
TABLEAU XX	Déplacements chimiques observés en RMN du ^{13}C de l'épinette blanche (carbones aliphatiques oxygénés)	113
TABLEAU XXI	Interprétation des spectres RMN du ^{13}C des carbones aliphatiques oxygénés (107-58 ppm)	115
TABLEAU XXII	Déplacements chimiques observés en RMN du ^{13}C de l'épinette blanche (groupements méthoxyles)	119
TABLEAU XXIII	Interprétation des spectres RMN du ^{13}C des groupements méthoxyles sur les carbones aromatiques (57-54,5 ppm)...	120
TABLEAU XXIV	Déplacements chimiques observés en RMN du ^{13}C de l'épinette blanche (carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés)	122
TABLEAU XXV	Interprétation des spectres RMN du ^{13}C des carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés (55-31 ppm)	124
TABLEAU XXVI	Déplacements chimiques observés en RMN du ^{13}C de l'épinette blanche (carbones aliphatiques non-oxygénés) ...	126
TABLEAU XXVII	Interprétation des spectres RMN du ^{13}C des carbones aliphatiques non-oxygénés (31-14 ppm)	127

TABLEAU XXVIII	Distribution des poids moléculaires de la lignine de Klason biotransformée par <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	160
----------------	--	-----

ANNEXE

ANNEXE 1 Structures tirées des références suite à des interprétations 178

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Après la cellulose, la lignine représente le deuxième biopolymère le plus répandu sur terre. La lignine représente 25 à 30% de la masse totale du bois séché. Ce polymère, d'origine végétale, possède une structure des plus complexes. La lignine se retrouve intégrée à la paroi cellulaire de toutes plantes vascularisées et son rôle permet de donner une certaine rigidité à toute espèce végétale.

La lignine est avant tout un composé aromatique (Browning, B.L.; 1967). Elle est caractérisée par un système phénylpropanoïde comportant un ou deux groupements méthoxyles (OCH_3), des fonctions alcools et phénols. La lignine n'est pas un composé chimique défini et sa structure est loin d'être élucidée (Fengel, D. et Wegener, G.; 1984). Il n'existe aucune méthode absolue permettant l'isolation complète de la lignine contenue dans le bois. Plusieurs méthodes d'extraction occasionnent des changements fondamentaux dans la structure de la lignine. Pour isoler la lignine de toute biomasse végétale, il existe différentes méthodes d'extraction. La méthode utilisée dans cette étude consiste à produire de la lignine de Klason selon des procédés d'hydrolyse de la cellulose et des hémicelluloses en milieu acide (acide sulfurique); nous obtenons alors un résidu qui constitue la lignine de Klason.

La lignine de Klason de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss est caractérisée et biotransformée afin de produire des unités de lignine de masses moléculaire inférieures.

Il existe différentes techniques d'analyse afin de mieux comprendre la structure de la lignine. La chromatographie d'exclusion sur gel et la spectroscopie infrarouge, ultraviolette, de résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse par atomes rapides sont les techniques utilisées afin de proposer un modèle de base représentant le plus fidèlement possible quelques unités de ce polymère complexe.

La structure de base de la lignine est constituée d'unités phénylpropanoïdes et comporte des groupements phénols et méthoxyles. Par polymérisation radicalaire, ces unités de base se regroupent pour former des dilignols, trilignols et finalement la structure du polymère.

La biotransformation de la lignine par l'intermédiaire d'un champignon tel que *Phanerochaete chrysosporium*, permet d'observer les modifications de structure de ce polymère. Il se produit des réactions de polymérisation et de dépolymérisation.

Les objectifs de ce travail consistaient à :

- 1- proposer une méthode permettant d'isoler la lignine de Klason
- 2- caractériser la lignine de Klason par spectroscopie infrarouge, ultraviolette, résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse par atomes rapides et par chromatographie d'exclusion.

- 3- développer un modèle de base représentant le polymère de la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss
- 4- effectuer une biodégradation de la lignine extraite par l'emploi d'un basidiomycète tel que *Phanerochaete chrysosporium*
- 5- caractériser les unités produites par la biotransformation.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Description de l'épinette blanche, "*Picea glauca* (Moench) Voss"

Nos forêts constituent une ressource renouvelable de premier ordre. Le bois se divise en deux (2) grandes catégories communément appelées bois tendres (bois résineux) et bois durs (bois de feuillus). En botanique, les bois de résineux sont des conifères classés dans le groupe des gymnospermes. Les principaux constituants de l'arbre sont : l'écorce, l'aubier, le duramen et la moelle (Figure 1).

Dans nos régions nordiques, la majorité de nos ressources se retrouve sous forme de résineux. Les feuillus constituent des essences minoritaires comparativement aux conifères. L'objet de cette étude porte sur l'épinette blanche "*Picea glauca* (Moench) Voss". Ce conifère a été choisi parce qu'il représente un potentiel important de nos ressources forestières au point de vue de son abondance et de son aire de distribution. Celle-ci se retrouve dans les régions forestières boréales, des Grands Lacs et du Saint-Laurent.

L'épinette blanche adulte atteint généralement une hauteur variant de 25 à 40 mètres et un diamètre de 50 à 100 cm. Le nom générique de "*Picea*" signifie résine et son spécifique "*glauca*" est lié à sa couleur glauque (vert bleuâtre) de ses aiguilles. L'épinette blanche se caractérise par l'absence de réseaux filamenteux sur ses rameaux comparativement aux autres espèces d'épinettes (Lauriault, J., 1988) (Figure 2).

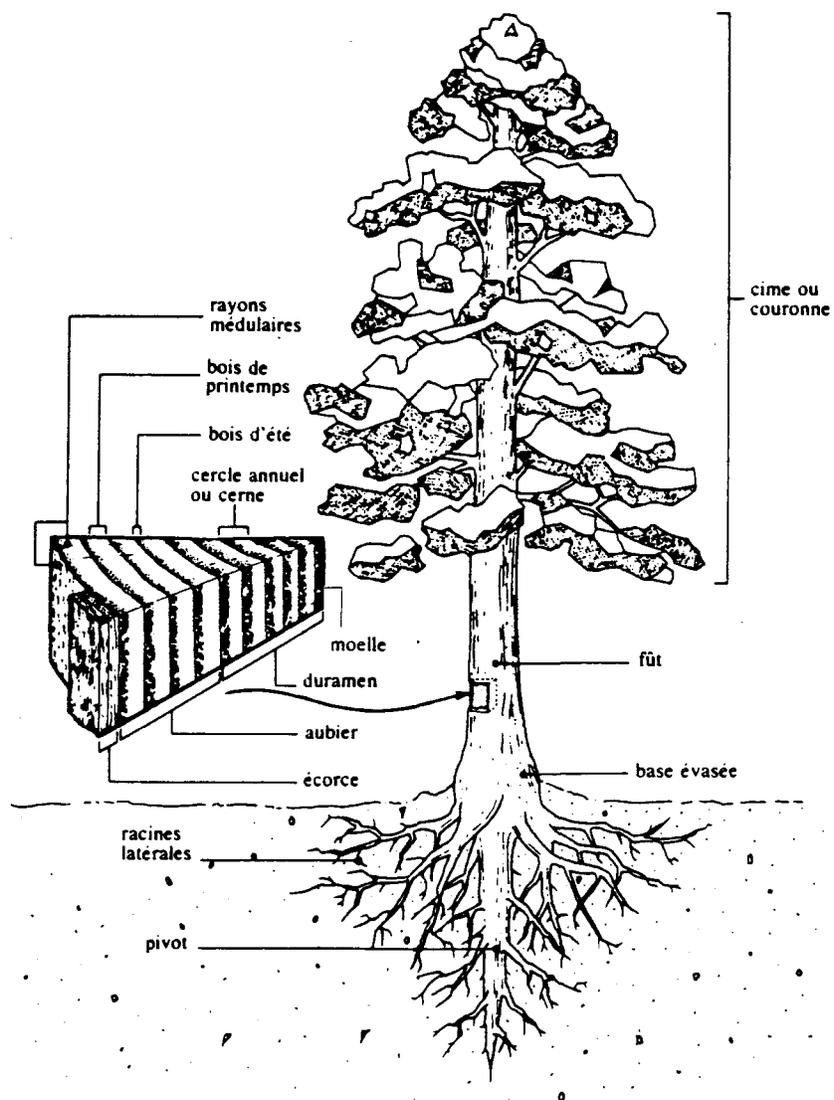


Figure 1: Constituants majeurs de l'arbre.¹

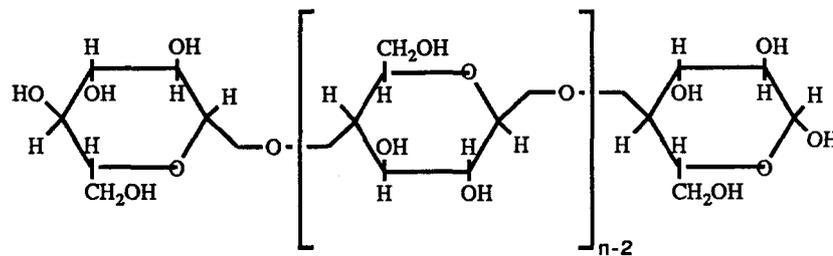
¹ Mullins, E.J. et McKnight, T.S., (1981).



Figure 2: Photo de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss.

Le bois possède une composition chimique relativement complexe et cette composition regroupe quatre (4) constituants majeurs. Par énumération de leur abondance relative, les principaux composants du bois sont: la cellulose (41-45%), la lignine (24-33%), les hémicelluloses (23-30%) et finalement les extractibles (2-15%) (Mullins, E.J. et McKnight, T.S., 1981) (Figure 3).

La cellulose est le principal composant du bois pour la majorité des espèces. Après analyses, la cellulose constitue approximativement 41-45% de la matière sèche. Sa structure se compose de plusieurs milliers d'unités de glucose et se résume à un polymère linéaire. La structure de la cellulose est la suivante:



Les hémicelluloses sont formés de polysaccharides non cellulosiques. Tout comme la lignine, ils sont associés aux parois cellulaires. Ils se composent uniquement de sucres simples tels que: le glucose, le galactose, le mannose, le xylose et l'arabinose (Sjöström, E., 1981). Ces constituants représentent 23 à 30% de la biomasse totale.

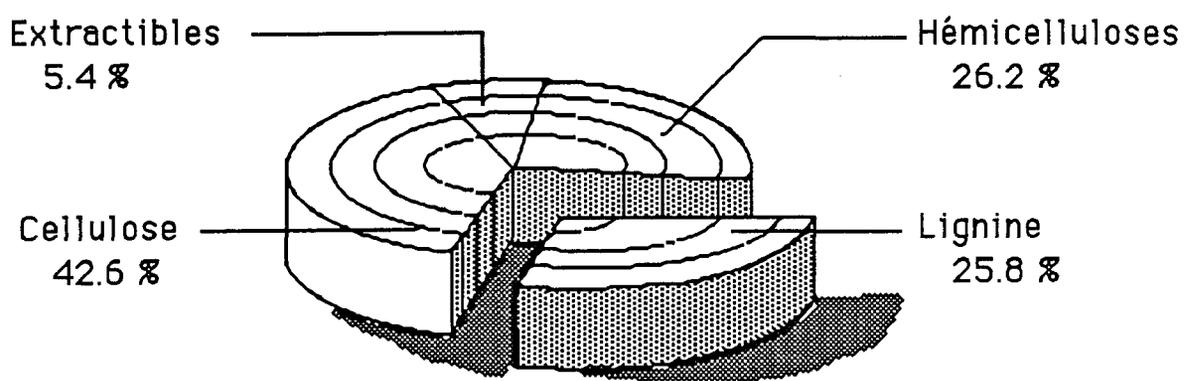


Figure 3: Composition chimique du bois².

² Mullins, E.J. et McKnight, T.S., (1981).

La lignine est un polymère amorphe à trois (3) dimensions que l'on retrouve lié aux parois cellulaires. Selon l'espèce, son abondance relative se situe approximativement entre 24 à 33% de la masse totale du bois séché.

Les extractibles se définissent comme étant des substances pouvant être extraites du bois par l'emploi de différents solvants. Les principaux extractibles sont constitués de terpènes, d'acides résiniques, d'acides gras, de tannins, etc. L'abondance relative des extractibles varie de 2 à 15% selon les espèces (Fengel, D. et Wegener, G., 1984).

2.2 Échantillonnage

L'espèce d'arbre échantillonnée est l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss et cet échantillonnage s'est effectué entièrement dans la région du Saguenay. Des prélèvements aléatoires de ce type de conifère ont été effectués sur un territoire donné et le bois entier a été recueilli. L'aire d'échantillonnage se situe près des limites du Parc Saguenay à 70°26' de longitude ouest et à 48°14' de latitude nord, plus précisément dans le secteur de Rivière Éternité (Figure 4). Les échantillons ont été prélevés sur des arbres dont le diamètre n'excédait pas 25 cm. Certains échantillons se composent soit de branches (diamètre de 5 cm) ou encore, du fût lui-même. Les échantillons ont été prélevés à l'aide d'une scie manuelle afin de minimiser les risques de contamination par les hydrocarbures. La masse totale prélevée s'approche à 5 kg de matière sèche.

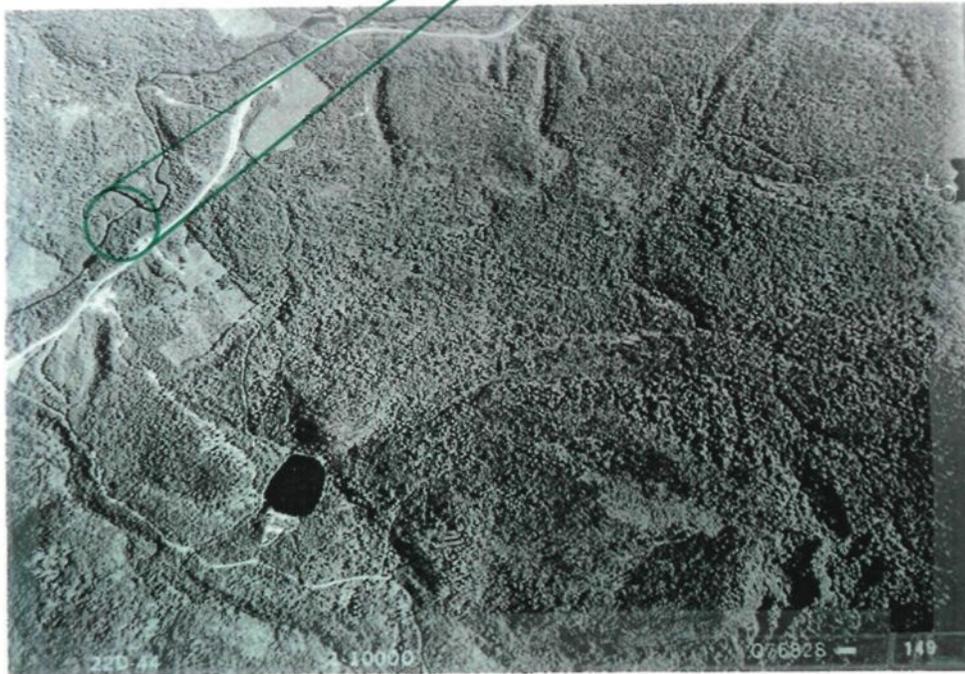
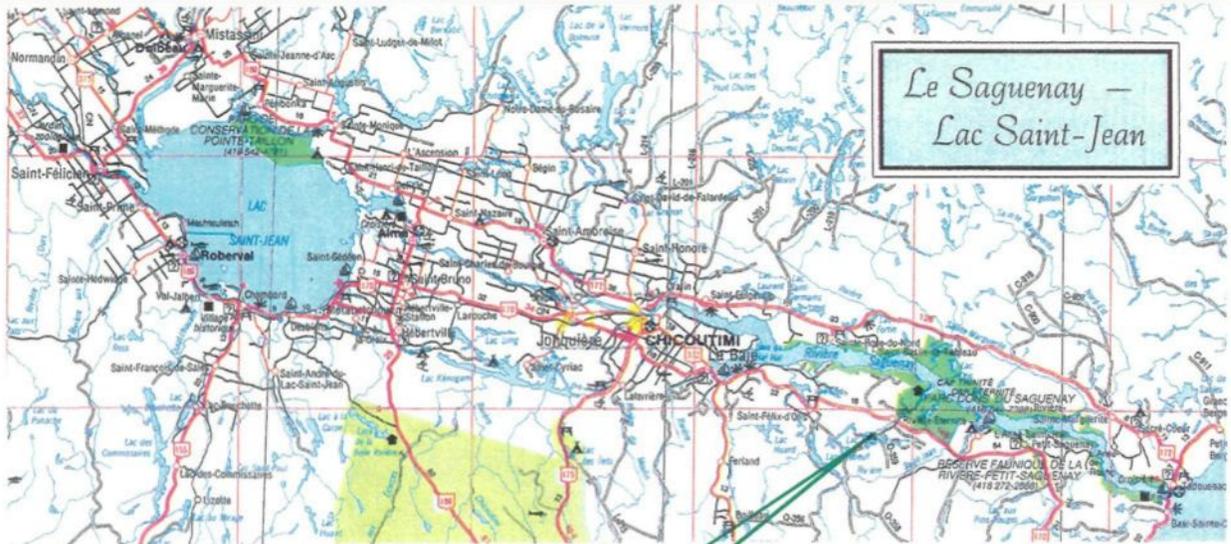


Figure 4: Localisation du site d'échantillonnage.

2.3 Préparation de la biomasse

Les échantillons d'épinette blanche ont été entreposés dans des sacs de jute afin de minimiser tous risques de contamination occasionnée par divers composés à base de chlorure de vinyle contenus dans les sacs en matière plastique. L'ensemble fut entreposé et congelé à une température de -20°C afin de préserver l'état de la biomasse jusqu'à ce que l'expérience débute.

Lorsque l'échantillonnage de la biomasse végétale fut complété, les échantillons furent décongelés à la température de la pièce (25°C). Une fois décongelés, l'écorce est éliminée, par l'emploi d'un rabot, afin de garder uniquement le duramen et l'aubier. Les échantillons sont coupés en de fines éclisses, dont le diamètre n'excède pas 1 cm, pour être finalement broyés. L'utilisation d'un broyeur de type "Wiley" permet de produire de fines particules de bois communément appelées "farine de bois". Les particules peuvent être réduites à des dimensions précises. Les dimensions sélectionnées pour l'étude sont de l'ordre de -20 mesh (ce qui passe à travers un tamis de 20 mesh). Avec des particules de faibles dimensions, la surface de contact se trouve augmentée et l'extraction des extractibles au soxhlet se trouve optimisée.

2.4 Description de la lignine

2.4.1 Généralités

En 1865, F. Schulze identifia les résidus solides du bois par le nom latin du bois (lignum). Suite au développement technique du processus de mise en pâte (pulpe), il se produisit un vif intérêt pour la lignine et ses réactions. En 1897, Peter Klason étudia la composition des lignosulfonates et proposa l'idée suivante: "la lignine est chimiquement liée à l'alcool coniféryle". Et c'est en 1907, qu'il a proposé que la lignine est une substance macromoléculaire. Par la suite, des études ont démontré que les unités d'alcool coniféryle peuvent être liés entre eux par des liens éthers (Sjöström, E., 1981).

Il est estimé que 25% du carbone fixé par photosynthèse est transformé éventuellement en lignine. Cette abondance est une ressource d'une valeur potentielle et représente la seconde source de carbone la plus abondante qui soit renouvelable sur terre. La lignine joue un rôle important dans le recyclage du carbone tout en protégeant la cellulose contre les attaques microbiennes grâce aux unités à caractère phénolique (Sjöström, E.; 1981).

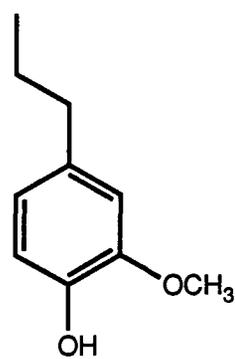
2.4.2 Structures de base

La structure de base de la lignine se compose d'un groupement phénolique auquel un substituant propanoïde se greffe en position para du noyau aromatique. La

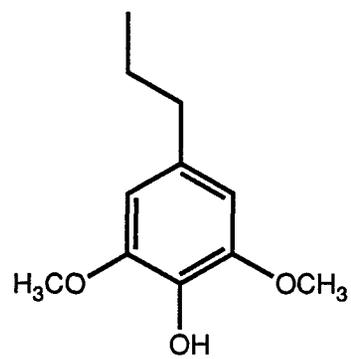
lignine existe sous trois (3) principales unités phénylpropanoïdes et ces unités se différencient par la présence d'un groupement méthoxyle en position méta.

Ces trois (3) unités phénylpropanoïdes sont: le guaiacyle (avec un seul méthoxyle), le syringyle (avec deux (2) groupements méthoxyles) et le parahydroxyphényle (n'ayant aucun méthoxyle) (Figure 5). Les unités phénylpropanoïdes de la lignine sont issues de trois (3) alcools différents tels que: l'alcool *trans*-coniféryle, l'alcool *trans*-sinapyle et l'alcool para-coumaryle (Figure 6) et varie selon le type de biomasse. Les unités de lignine issues des gymnospermes ou bois tendres, se composent d'alcool *trans*-coniféryle et sont caractérisées par la présence d'un seul groupement méthoxyle sur le noyau aromatique.

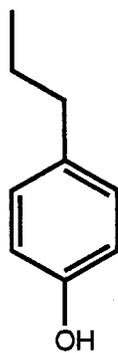
Concernant les unités de lignine issues des angiospermes ou bois durs, ceux-ci se composent de deux (2) alcools: le *trans*-coniférol et le *trans*-sinapol. L'unité *trans*-sinapol se distingue par deux (2) groupements méthoxyles sur le noyau aromatique comparativement au *trans*-coniférol, qui lui ne possède qu'un seul groupement méthoxyle. La lignine issues de toutes plantes herbacées, se compose des trois (3) principaux alcools: le *trans*-coniférol, le *trans*-sinapol et le *trans*-coumarol. Le *trans*-coumarol ne possède aucun groupement méthoxyle sur le noyau aromatique. Des études antérieures proposent que les unités phénylpropanoïdes suivantes: l'alcool p-coumaryle, l'alcool coniféryle et l'alcool sinapyle constituent les unités de base du mécanisme de biosynthèse (Torssell, K.B.G., 1983; Higuchi, T., 1985).



Guaiacyle



Syringyle



para-hydroxyphényle

Figure 5: Unités de base de la lignine³.

3 Higuchi, T., (1985).

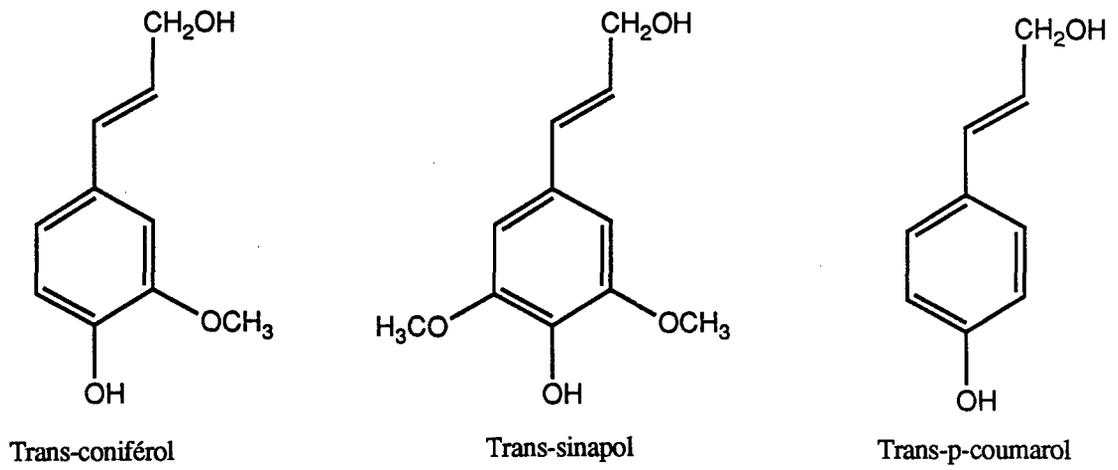


Figure 6: Unités de base issues de trois alcools phénylpropanoïdes⁴.

4 Higuchi, T., (1985).

La lignine est l'un des polymères naturels les plus complexes du point de vue de sa structure dû à son hétérogénéité. La synthèse de la lignine s'effectue à partir d'unités phénylpropanoïdes qui se polymérisent par des mécanismes radicalaires enzymatiques. Il a été démontré que ces mécanismes sont initiés par l'action de peroxydases (Fengel, D. et Wegener, D., 1984). La polymérisation des unités de phénylpropanoïdes fait suite à l'abstraction enzymatique d'un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (-OH) du noyau aromatique (Figure 7). La formation d'un radical laisse des possibilités de mésomérie par délocalisation des radicaux afin d'obtenir une structure plus stable. Les unités radicalaires formés conduiront à la formation d'une grande variété de dilignols, trilignols, etc. (Figure 8).

Les dimères obtenus par mécanisme radicalaire constituent les éléments nécessaires à la formation des liaisons interunitées de la structure moléculaire de la lignine (Figure 9).

Les six (6) principaux dimères de base, des composés de lignines de conifère, se présentent selon l'abondance relative des liens inter-phénylpropanoïdes. La structure dimérique (β -O-4'), éther guaiacylglycérol β -aryl, représente 40 à 60 % de toutes liaisons interunitées de la lignine. La structure phénylcoumarane (β -5') est d'une importance de 10 % et le diarylpropane, structure β -1', varie de 5 à 10% (Figure 10). L'unité pinorésinol (β - β') est de l'ordre de 5%, le biphényle (5-5') est de 10% et l'unité biphényléther (4-O-5') contribue pour 5% de l'abondance relative (Figure 11) (Higuchi, T., 1985).

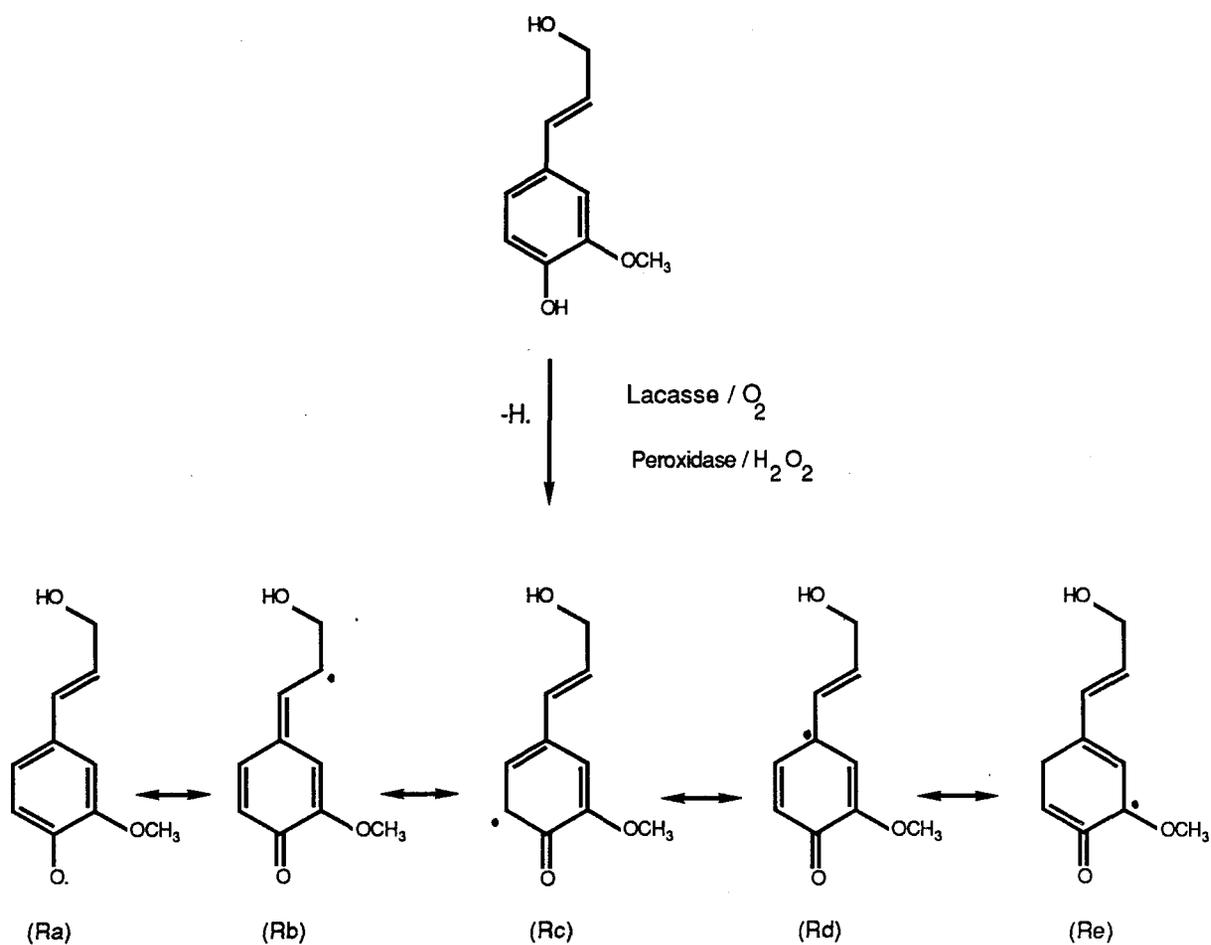
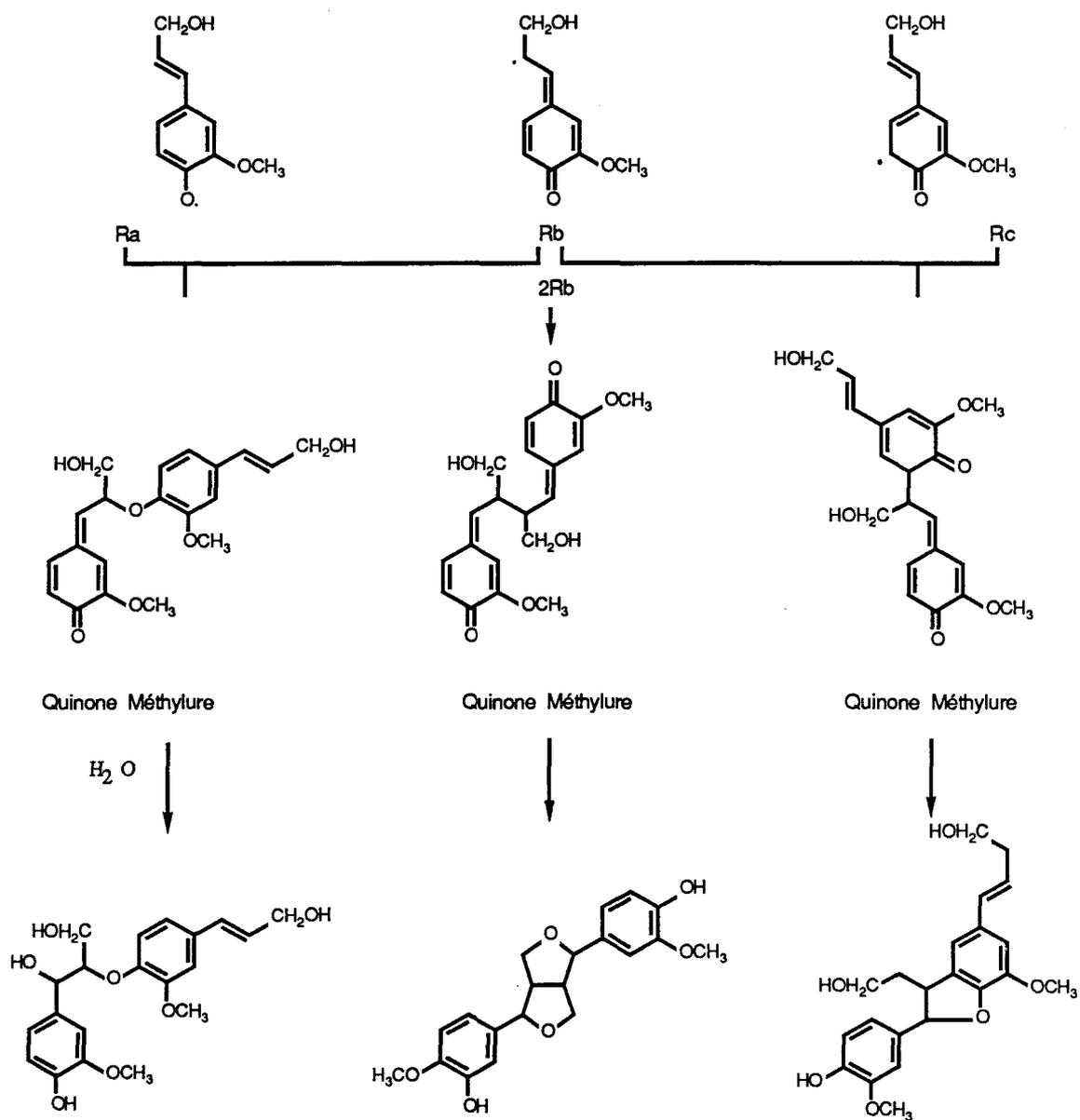


Figure 7: Mécanisme de polymérisation radicalaire⁵.

Figure 8: Formation de dilignols⁶.

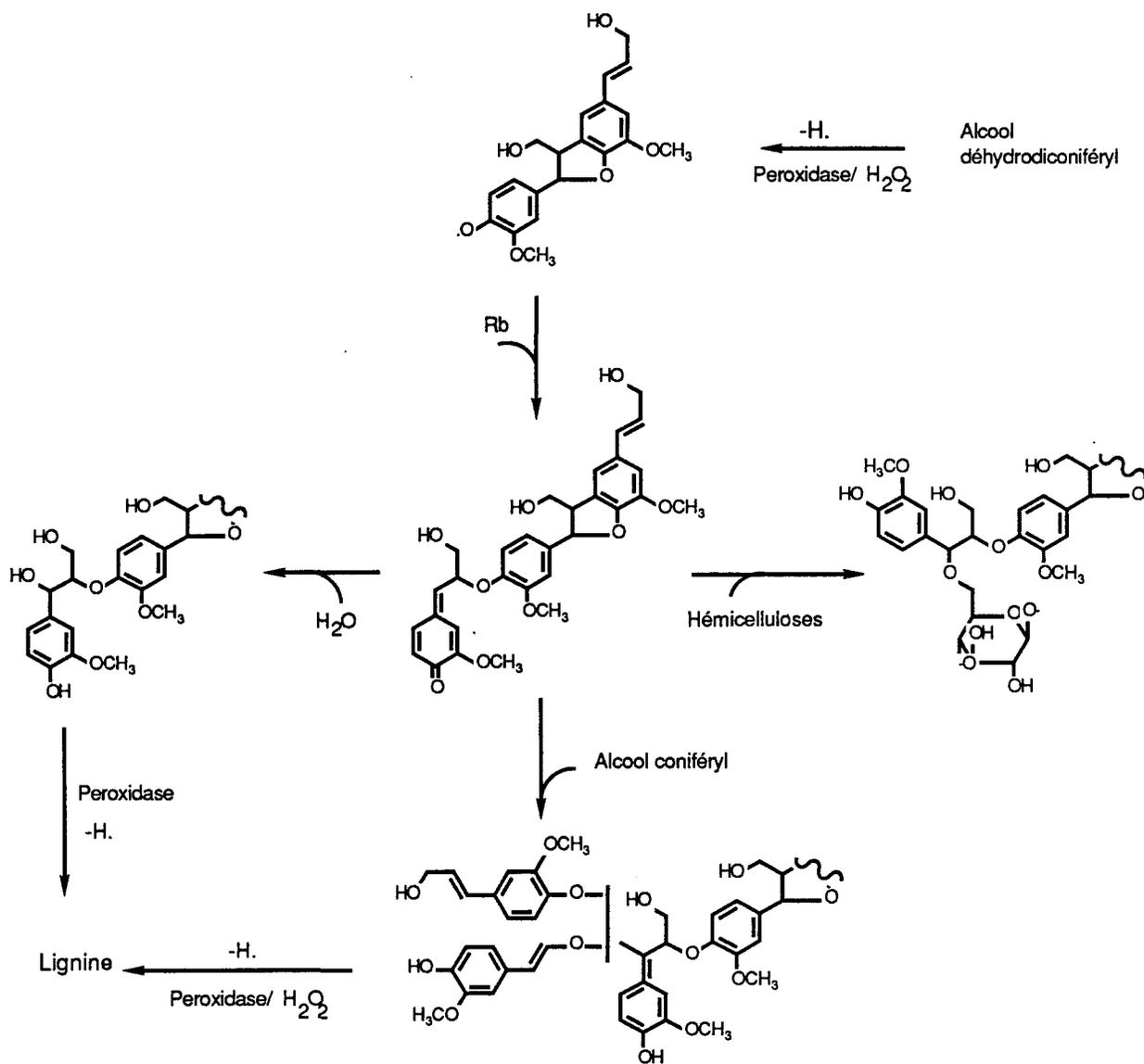
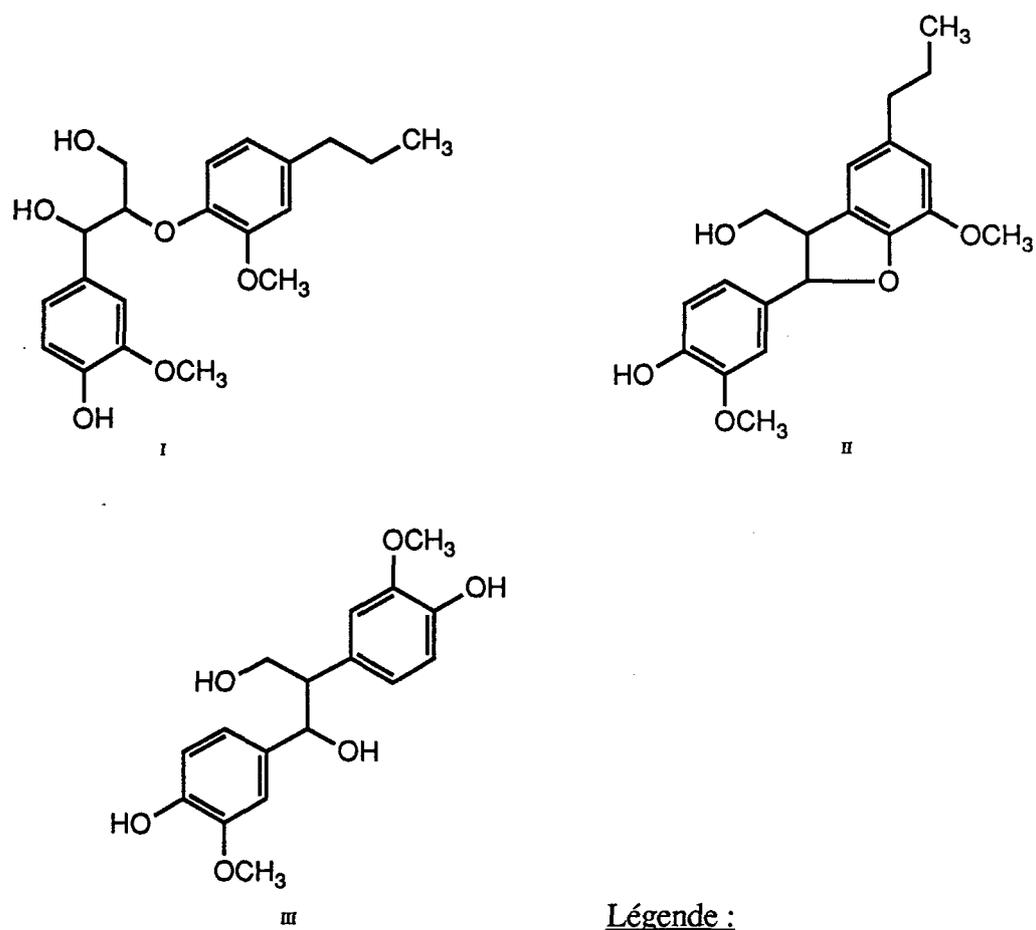


Figure 9: Formation de la lignine via les quinones méthylures oligolignols⁷.

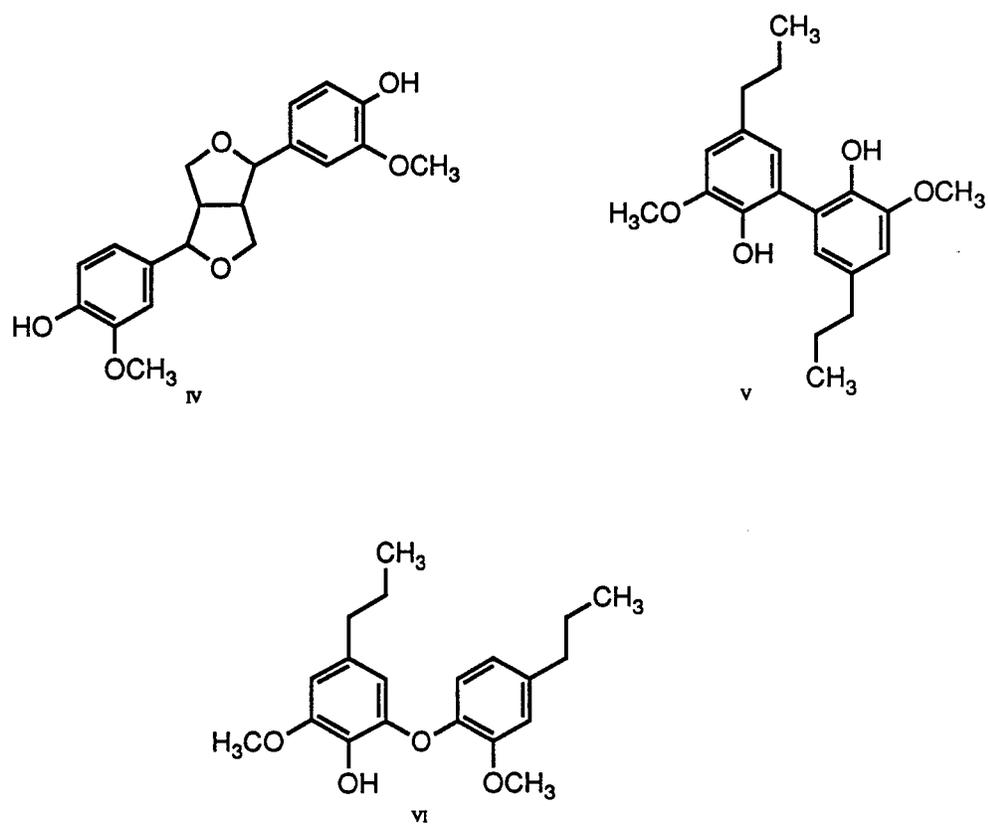
⁷ Higuchi, T., (1985)



Légende :

- I- Éther guaiacylglycérol β -aryl (β -O-4')
- II- Phénylcoumarane (β -5')
- III- Diarylpropane (β -1')

Figure 10: Dimères de base de la lignine de type β -O-4', β -5' et β -1'.



Légende :

IV- Pinorésinol (β - β')

V- Biphényle (5-5')

VI- Biphényléther (4-O-5')

Figure 11: Dimères de base de la lignine de type β - β' , 5-5' et 4-O-5'.

2.5 Extraction de la lignine

2.5.1 Extraction de la lignine selon Funaoka et Abe

La méthode proposée par Funaoka et Abe représente de gros avantages comparativement aux différentes techniques appliquées jusqu'à maintenant. Ces avantages sont en grande majorité basés sur la facilité d'extraction de la lignine et l'utilisation d'un minimum d'équipement. Ces auteurs laissent entrevoir la perspective que cette méthode deviendra une référence très utilisée dans l'avenir (Funaoka, M. et Abe, I., 1989).

Dans une extraction typique de la lignine, la biomasse est broyée à -20 mesh. Une masse de 10,0 g de bois broyé est utilisée et mélangée à 10,0 g d'ortho-crésol. A l'aide d'un mortier, le bois et le réactif sont rendus homogènes. Tout en effectuant une agitation constante, 10 ml d'acide sulfurique concentré à 72% v/v sont ajoutés progressivement. Ces opérations produisent un liquide visqueux; un changement de coloration variant de beige à vert foncé est observé. L'emploi d'une centrifugeuse atteignant une vitesse de rotation de 10 000 rpm, de l'ordre de 12 000 G, à une température de 20°C et ce pendant dix (10) minutes, permet la séparation des deux (2) phases visqueuses. La partie supérieure représente la lignine liée à l'ortho-crésol et la partie inférieure demeure une solution d'acide sulfurique composée de cellulose et d'hémicelluloses hydrolysées. Il est également possible de visualiser une troisième

phase, à l'interface des deux (2) autres et celle-ci se compose d'acides gras, de résines et de lipides.

La phase supérieure est recueillie puis extraite afin de séparer l'ortho-crésol de la lignine. Le lignine est analysée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du carbone-13. L'application de la méthode de Funaoka et Abe a conduit aux résultats suivants: la lignine extraite est présente mais uniquement sous forme de traces.

Afin d'optimiser le rendement en lignine, certaines modifications à la méthode originale ont été essayées sans apporter d'amélioration sensible: d'autres produits phénoliques (méta-crésol, para-crésol) ont été utilisés mais sans donner les résultats escomptés. Des résultats semblables ont été obtenus par d'autres chercheurs (Dr. Catherine Lapierre de l'INRA, Paris-Grignon, France, communication privée, mai 1991). Suite aux résultats non satisfaisants de la méthode de Funaoka et Abe, la méthode de Klason pour l'extraction de la lignine fut adoptée.

2.5.2 Extraction de la lignine de Klason

A partir du protocole d'analyse de la lignine de l'AOAC "*Official Methods of Analysis*" approuvé par l'Association analytique des chimistes de même que celui publié dans "*Methods of Wood Chemistry*" de Browning (Browning, B.L., 1967), il est possible de réaliser l'extraction de la lignine de Klason. Selon les méthodes

expérimentales, la préparation de la lignine de Klason comporte deux (2) grandes étapes. L'une consiste à éliminer les extractibles présent dans le bois (Figure 12), tandis que l'autre se résume à traiter le résidu obtenu par l'acide sulfurique.

a) L'extraction au soxhlet des extractibles:

La première étape consiste à utiliser la matière végétale préalablement broyée et de pré-extraire la lignine, par l'emploi d'un solvant, afin d'éliminer toutes traces de produits organiques (extractibles). Ces extractibles risquent d'influencer la qualité de la lignine produite par les composés organiques (résines, acides gras, etc.). La lignine de Klason est extraite selon la méthode décrite par l'AOAC (Helrich, K., 1990) et Browning (Browning, B.L., 1967); l'extraction de la lignine de Klason a été légèrement modifiée du protocole original par réduction des temps de pré-extraction.

Cette pré-extraction nécessite l'utilisation d'un soxhlet d'un volume de 250 ml pouvant extraire une masse de 5,0 g de bois réduits en fines particules de l'ordre de -20 mesh. La durée de cette étape nécessite un temps minimal de quatre (4) heures. L'extraction au soxhlet permet d'éliminer les produits extractibles contenus dans la matrice de l'échantillon. Par un procédé de reflux en continu, les solvants solubilisent les extractibles contenus dans la matière végétale et ceux-ci sont finalement concentrés dans le ballon de récupération (Figure 13).

L'avantage de cette technique consiste à extraire les produits extractibles avec des solvants continuellement purifiés. Les solvants utilisés sont le toluène et l'éthanol.

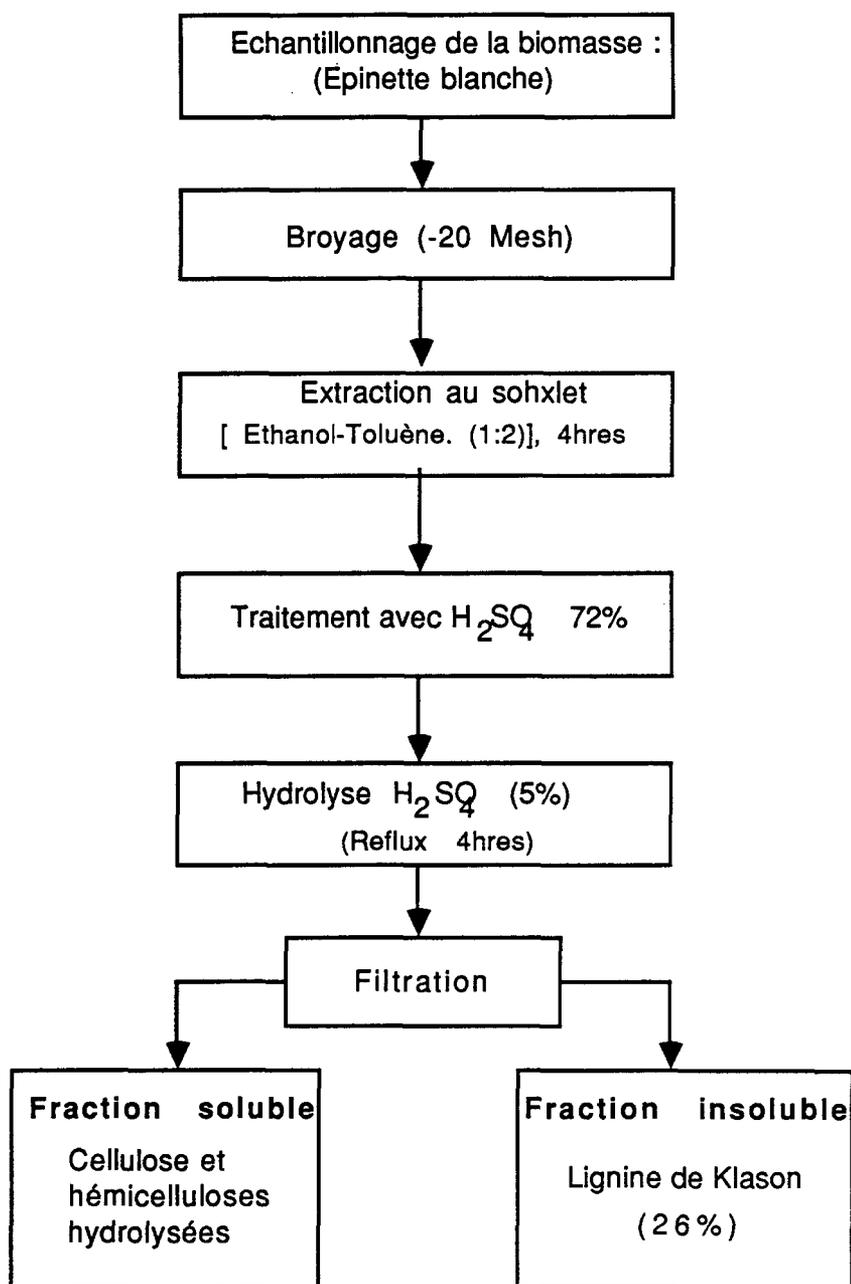
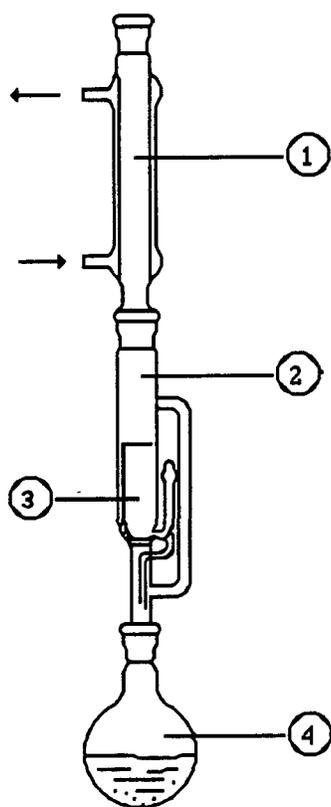


Figure 12: Schéma du protocole d'extraction de la lignine de Klason.



Légende:

- 1- Réfrigérant
- 2- Soxhlet
- 3- Support à échantillon
- 4- Ballon (solvant)

Figure 13: Montage de la pré-extraction au soxhlet.

La proportion de ceux-ci retrouvée dans le mélange sont de l'ordre de 66,7% (v/v) de toluène et 33,3% (v/v) en éthanol. Après quatre (4) heures d'extraction, le résidu est récupéré puis séché à l'étuve à une température constante de 28°C.

b) le traitement avec l'acide sulfurique:

La seconde étape consiste à traiter le résidu obtenu précédemment par une solution d'acide sulfurique. Un fois l'acide sulfurique 72% (v/v) ajouté au résidu, une suspension gélatineuse se forme après 30 secondes de contact. La concentration en acide sulfurique est réduite à 40% par addition d'eau et une agitation constante est maintenue pendant 60 minutes. Ensuite, une hydrolyse acide est réalisée en diluant, par addition d'eau, l'acide sulfurique jusqu'à l'obtention d'une concentration de 5% (v/v). Ce montage nécessite l'utilisation d'un ballon de 500 ml surmonté d'un réfrigérant et d'un système de chauffage à reflux pendant quatre (4) heures.

Et finalement, une filtration à chaud sur verre poreux est effectuée afin d'éliminer les traces d'acide et les sucres hydrolysés. Pour ce faire, le résidu est lavé avec de l'eau déminéralisée jusqu'à ce que le pH devienne légèrement acide. Le résidu obtenu est séché à l'étuve et analysé par différentes méthodes spectroscopiques; les résultats obtenus présentent les mêmes caractéristiques générales que la lignine de Klason obtenu par Browning (Browning, B.L., 1967).

2.6 Caractérisation de la lignine

2.6.1 Chromatographie d'exclusion

La chromatographie de perméation sur gel ou chromatographie d'exclusion permet l'estimation des masses moléculaires des échantillons de lignine.

La chromatographie d'exclusion ou de perméation sur gel "*Gel Permeation Chromatography (GPC)*" se résume à un ensemble de techniques permettant de séparer et de purifier les divers constituants d'un mélange selon l'importance de leurs masses moléculaires. Cette méthode chromatographique utilise comme phase stationnaire une structure moléculaire sphérique ayant de petites cavités ou pores de dimensions précises et uniformes dans lesquels les molécules, de dimensions appropriées, peuvent s'insérer et être retenues un certain temps (Figure 14). Par ailleurs, les molécules de grandes masses moléculaires passent entre les sphères et sont rapidement éluées de la colonne par la phase mobile.

Le système d'analyse chromatographique se compose de six (6) éléments: un réservoir à éluant, une valve d'injection, une colonne chromatographique contenant le gel de petites dimensions Séphadex G-50 de grade fin de la compagnie Pharmacia, un détecteur U.V., une pompe péristaltique et finalement un enregistreur graphique (Figure 15). L'analyse chromatographique des populations de lignine de Klason s'est effectuées sur une colonne de type LKB. La structure de base de la colonne comprend un tube de

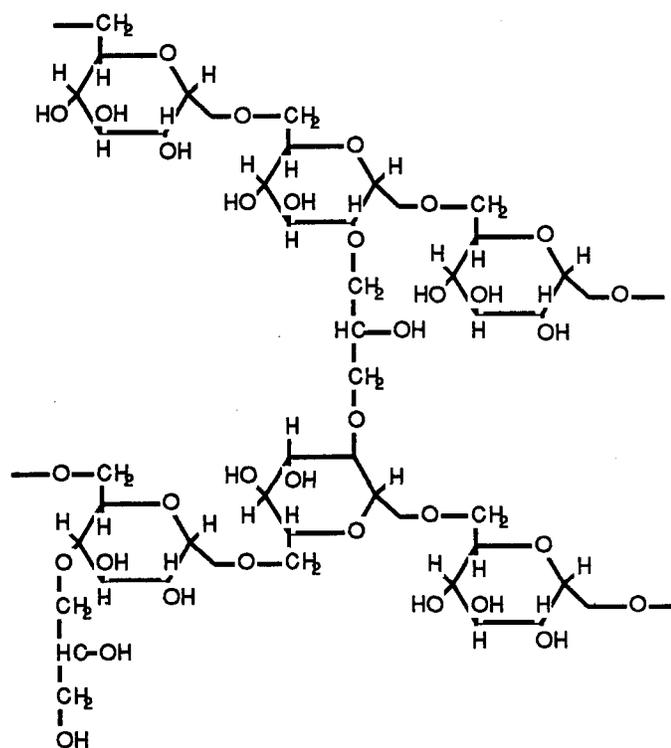
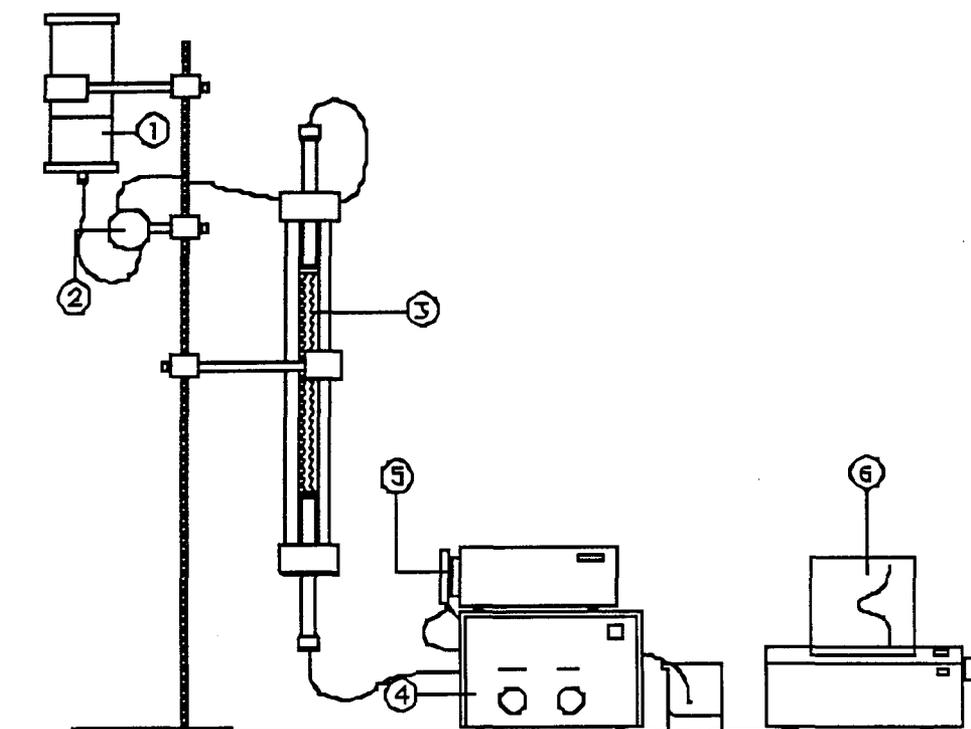


Figure 14: Structure moléculaire du Séphadex¹⁰.



Légende:

- 1- Réservoir à éluant
- 2- Valve d'injection
- 3- Colonne chromatographique
- 4- Détecteur U.V. (280 nm)
- 5- Pompe péristaltique
- 6- Enregistreur

Figure 15: Schéma du système chromatographique

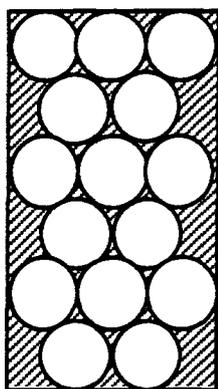
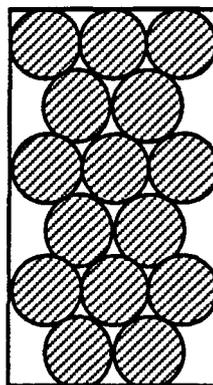
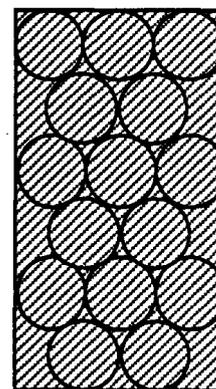
verre dont les dimensions sont: un diamètre interne de 1,7 cm et 27 cm de long. Le détecteur U.V. de modèle "UV ALTEX 153" permet de lire une longueur d'onde fixe de 280 nm. Le volume de la cellule du détecteur est de huit (8) μ l et celle-ci est reliée à une pompe péristaltique de la compagnie Rainin, modèle Rabbit. Le système de pompe permet de garder un débit constant de l'ordre de 0,5 ml/minute. Le signal fourni par le détecteur est transcrit par un enregistreur analogique, de type "Linear 1200".

Avant de procéder à l'analyse des échantillons, la préparation de la phase stationnaire exige une attention particulière. Il est essentiel d'obtenir un gel homogène et parfaitement régulier. La première étape consiste à faire "gonfler" le gel avant son utilisation. La période de gonflage du gel en contact avec la phase mobile nécessite un temps de 24 heures à la température normale de la pièce (25°C). La littérature décrit différentes méthodes permettant d'effectuer le montage d'une colonne chromatographique (Pharmacia, 1985; Granath, K.A., 1967).

L'expérience a montré que pour préparer une colonne chromatographique, il nécessite 1,5 g de gel de Séphadex G-50 fine d'ou le diamètre des grains secs varie de 20-80 μ m. La phase mobile utilisée est une solution tampon THAM composée de 0,2 M de tris(hydroxyméthyle) maléate d'aminométhane, de 0,2 M d'hydroxyde de sodium et le pH requis pour cette solution est de 8,6.

Théoriquement, la capacité volumique totale (V_t) de la colonne est déterminée par la sommation de $V_o + V_i + V_m$, où V_o correspond au volume interstitiel. V_o est estimé par la chromatographie d'une molécule suffisamment grosse, le bleu dextran, ne risquant pas d'être retenue par le gel. Le volume nécessaire pour l'élution de cette

molécule correspond au volume de liquide se trouvant entre les grains. Le bleu dextran est une molécule d'étalonnage standard d'une masse moléculaire de 2 000 000 Daltons et celle-ci permet de calculer la valeur de V_o . V_i correspond au volume intérieur des grains, il varie selon la porosité et la qualité du gel. En connaissant le type de gel, V_i est calculé en multipliant le poids sec " P_s " du gel par la capacité d'absorption " S_r " et par l'inverse de la densité de l'éluant " ρ " d'où $V_i = (P_s * S_r) / \rho$.

 V_o  $V_t - V_o$ ou
 $V_i + V_m$  V_t

Le volume interstitiel (V_o) observé, pour une colonne de 27 cm de long par 1,7 cm de diamètre interne, est de 16,43 ml. Le volume total (V_t) est de 61,28 ml et le volume pour l'intérieur des grains (V_i) correspond à environ 10,25 ml. Après calcul, le volume de la matrice du gel (V_m) est de 34,60 ml. En connaissant alors le type de gel utilisé, la quantité de Séphadex sec (avant gonflage) nécessaire pour ce type de colonne, les valeurs de V_o et V_m , peuvent alors être estimées.

Afin d'obtenir une séparation adéquate, il a fallu optimiser le système chromatographique en variant le débit de la colonne, le volume d'échantillon injecté et la longueur de la phase stationnaire. Les conditions expérimentales sont énoncées dans le tableau I. Un volume de 500 µl est injecté et un débit de 0,5 ml/min est maintenu et permet la séparation des masses moléculaires. La durée pour chacune des analyses chromatographique est d'environ 100 minutes.

Les échantillons de lignine sont séparés par chromatographie d'exclusion permettant une estimation de leurs masses moléculaires. Des courbes d'étalonnages sont obtenues par l'utilisation d'échantillons de standards certifiés, provenant de la compagnie Sigma et comprenant cinq (6) masses moléculaires variant de 2 000 000 à 376 Daltons. La courbe d'étalonnage calculée renferme quatre (4) standards et se compose d'anhydrase carbonique (29 000 Daltons), de cytochrome C (12 400 Daltons), d'aprotinine (6 500 Daltons) et de riboflavine (376 Daltons). L'albumine avec une masse moléculaire de 66 000 Daltons n'est toutefois pas utilisée pour les calculs de régressions linéaires (Tableau II). En considérant les quatre (4) échantillons standards, l'équation de la fonction linéaire s'écrit sous la forme de: $\ln M_w = m (V_e/V_o) + b$. La droite de régression du logarithme naturel de la masse moléculaire (M_w) par le rapport du volume d'élution d'un composé (V_e) via le volume interstitiel (V_o) et ce résultat correspond à l'équation suivante: $\ln M_w = -2,975 (V_e/V_o) + 13,857$ (Figure 16). Le coefficient de corrélation linéaire (r) obtenu représente 0,999 et le coefficient de détermination (r^2) correspond à 0,984. L'utilisation de ces standards moléculaires s'est avérée efficace pour la présente étude et celles réalisées antérieurement (Kern, H.W., 1983; Pellinen, J. et Salkinoja-Salonen, M., 1985).

TABLEAU I

Conditions d'analyse par chromatographie
de perméation sur gel

PHASE STATIONNAIRE	Séphadex G-50 fine
PHASE MOBILE	Tampon THAM pH 8,6
LONGUEUR DE COLONNE	27 cm
DIAMETRE INTERNE	1,7 cm
VOLUME TOTAL (V_t)	61,28 ml
VOLUME INTERSTITIEL (V_o)	16,43 ml
VOLUME INTERIEUR DES GRAINS (V_i)	10,25 ml
VOLUME DE LA MATRICE (V_m)	34,60 ml
DÉBIT	0,5 ml/min
VOLUME D'INJECTION	500 μ l
DÉTECTEUR	UV ALTEX, 153
LONGUEUR D'ONDE	280 nm
ENREGISTREUR	Linear 2000
SENSIBILITÉ	1 mV

TABLEAU II

Caractéristiques des échantillons standards

Molécules d'étalonnage	Mw (Dalton)	ln Mw	Ve (ml)	Ve/Vo
Bleu dextran	2 000 000	14,51	23,25	1,00
Albumine	66 000	11,09	25,11	1,08
Anhydrase carbonique	29 000	10,27	26,86	1,15
Cytochrome C	12400	9,43	34,24	1,47
Aprotinine	6500	8,78	42,40	1,82
Riboflavine	376	5,93	60,82	2,62

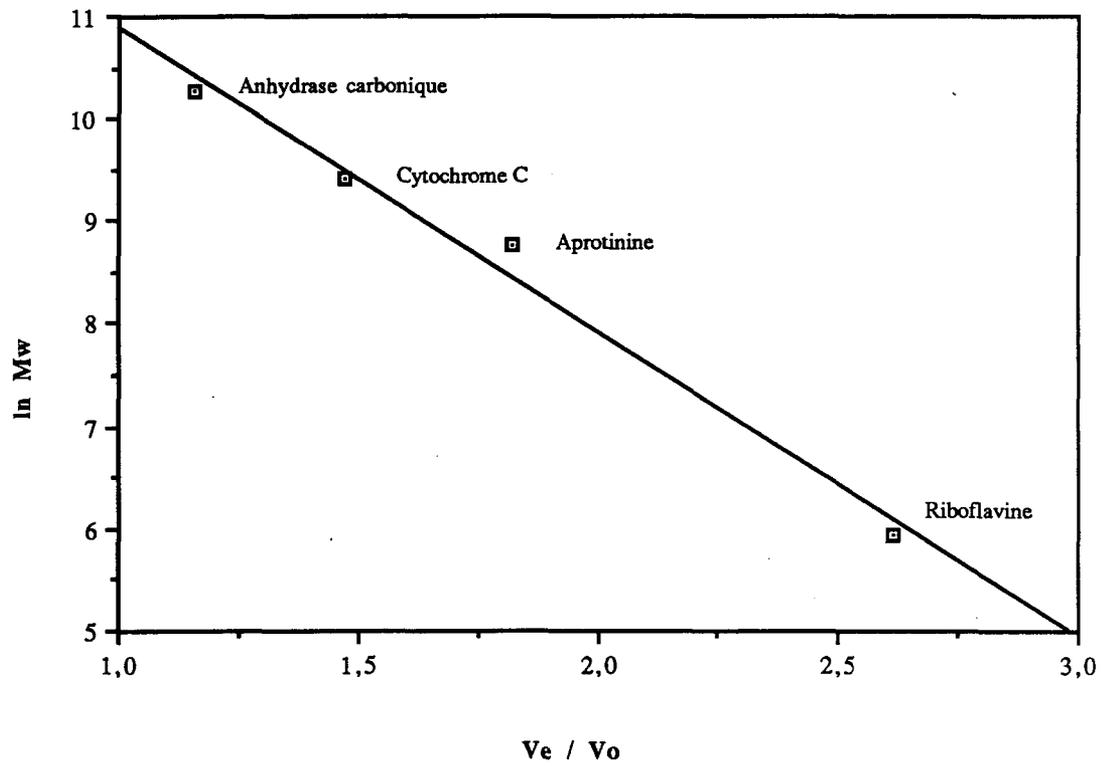
Régression linéaire:

$$\ln Mw = m (Ve/Vo) + b$$

$$\text{Pente} = - 2,975$$

$$\text{Ord. origine} = 13,857$$

$$\text{Coeff. } R^2 = 0,984$$



Légende:

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

Figure 16: Courbe d'étalonnage de la chromatographie sur gel

2.6.2 Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une méthode rapide permettant la caractérisation des groupements fonctionnels et des composantes majeures de différents échantillons. Cette technique analytique consiste à produire un rayonnement infrarouge et lorsque la molécule reçoit ce rayonnement à une fréquence où elle peut entrer en résonance, celle-ci absorbe cette énergie et l'amplitude de ses vibrations se trouve augmentée. La spectroscopie infrarouge produit un rayonnement dont la fréquence (nombre d'onde) varie de 660 à 4000 cm^{-1} . La notation "nombre d'onde" exprimée en cm^{-1} correspond à l'inverse de la longueur d'onde exprimé en μm .

La spectroscopie infrarouge se caractérise par des excitations vibrationnelles et rotationnelles à chacune des régions spécifiques du spectre électromagnétique. La molécule absorbe ainsi de l'énergie par ses vibrations de valence (stretching) ou de déformations angulaires (bending) ou autres. Les vibrations des liens de valence sont caractérisées par une variation de la distance entre les atomes considérés. Les vibrations de déformations angulaires se caractérisent par une variation de la position des atomes par rapport à l'axe de la liaison initiale. Ces vibrations peuvent donner des effets de cisaillement, de rotation, de balancement et de torsion (Pasto, D.J., et Johnson, C.R., 1979; Silverstein, R.M., et al., 1991).

Avec l'arrivée de la génération des spectromètres à transformée de Fourier, l'évaluation qualitative et quantitative des données se fait plus facilement et de façon plus précise. Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier fabriqué par la

compagnie Midac et couplé à un système d'acquisition des données a été utilisé. Les données numérisées ont été enregistrées sur un ordinateur compatible IBM muni du logiciel LAB CALC (Copyright Galactic Industries Corp., 1991). Les conditions d'analyses apparaissent au Tableau III. Avant l'analyse, les échantillons ont été placés au dessiccateur, en utilisant le CaCl_2 comme agent desséchant, pendant une période de 24 heures.

Les échantillons en phase solide ont été préparés à l'aide d'une solution solide de bromure de potassium, KBr, où la concentration de l'échantillon à analyser est de 1,0 mg de lignine pour 200 mg de KBr. Cette concentration permet la détermination qualitative des différents groupements fonctionnels et d'avoir une idée au point de vue de la détermination semi-quantitative.

Le spectre de la référence de KBr est pris dans les mêmes conditions d'analyse pour être soustrait du spectre des échantillons. Il en résulte un spectre expérimental n'incluant pas la référence et la réduction du bruit de fond permet de maximiser l'interprétation. La région étudiée s'étend de 4000 à 450 cm^{-1} .

Les différents échantillons se composent de la même matière de base soit: l'épinette blanche suite à divers traitements. Un premier spectre est obtenu à partir de l'échantillon d'épinette blanche broyé, un second est obtenu suite à une extraction au soxhlet (solvant: éthanol-toluène). Et, après traitement à l'acide sulfurique 72% (v/v), le spectre de la lignine de Klason est obtenu.

TABLEAU III

Conditions d'analyse de la spectrométrie
infrarouge à transformée de Fourier

SPECTROMETRE	Midac Corporation
TYPE	Transformée de Fourier
INTERFACE	Lab Calc, Midac FTIR
ECHANTILLON	0,5 % dans KBr
NOMBRES D'ONDE	4000 à 450 cm^{-1}
RÉSOLUTION	4 cm^{-1}
NOMBRE D'ACQUISITION	128
DÉTECTION	Simple faisceau

2.6.3 Spectroscopie ultraviolette

Les bandes d'absorption observées dans l'ultraviolet témoignent de la présence de conjugaisons dans la molécule. Le principe de l'UV se résume à exciter électroniquement les molécules par l'emploi de courtes longueurs d'ondes variant de 200 à 400 nm. Il en résulte alors à des transitions électroniques accompagnées de modifications vibrationnelles et rotationnelles (Silverstein, R.M., *et al.*, 1991).

L'absorption ultraviolette est un instrument très utilisée pour la détection qualitative et quantitative de la lignine. Cette méthode permet de déterminer la présence de toutes structures ayant des groupements insaturés: les noyaux aromatiques, les groupements carbonyles, etc.. L'analyse des échantillons est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre U.V. dont la longueur d'onde varie de 200 à 400 nm. Les spectres de lignine présentent une forte absorption dans la région ultraviolette entre 200 et 380 nm, ce qui caractérise la lignine par l'importance des unités aromatiques phénylpropanoïdes (Fengel, D., et Wegener, G., 1984). La détection de la lignine lors de la chromatographie d'exclusion sur gel se fait en opérant à longueur d'onde fixée à 280 nm.

Le spectre théorique de la lignine absorbe à des longueurs d'ondes variant de 230 à 330 nm, pour afficher un maximum d'absorption à 280 nm. Cette région d'absorption varie selon l'importance des groupements méthoxyles que possède chaque

unités phénylpropanoïdes. Ces particularités occasionnent une légère variation du maximum d'absorption de la longueur d'onde autour de 280 nm.

2.6.4 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du carbone-13

La résonance magnétique nucléaire du carbone-13 consiste à provoquer une excitation des noyaux atomiques dans un champ magnétique, induite par une irradiation de fréquence radio. La RMN du carbone-13 est une technique précise permettant d'analyser l'environnement des carbones-13 dans l'échantillon étudié. Les analyses des échantillons ont été effectuées en mode d'intégration qualitative dans les mêmes conditions expérimentales. Certains auteurs ont utilisé la RMN du carbone-13 de manière quantitative (Robert, D. et Chen, C.L., 1989) mais cette technique requiert toutefois une attention toute particulière. Les intensités correspondantes à des résonances spécifiques peuvent varier selon le type de matrice. Il est généralement admis que l'intégration quantitative en RMN du carbone-13 n'est pas réellement à point vu les nombreux paramètres à maîtriser (Abraham, R.J., 1990). L'environnement dans la molécule pour chaque carbone, le temps de relaxation de la molécule et l'effet nucléaire Overhauser (NOE) continuent de poser un défi à l'intégration quantitative des signaux en RMN du carbone-13 (Abraham, R.J., 1990); d'autres auteurs ont souligné les limites des intégrations quantitatives lors de l'application de la méthode du découplage inversé (Inverse Gate Decoupling) (Sjöholm, R., 1992).

Les échantillons ont été analysés à l'état solide (CPMAS- ^{13}C) au laboratoire régional de RMN à haut champ de l'Université de Montréal. L'acquisition des données a été réalisée sur un spectromètre Varian, model VXR 300 opérant à 75,431 MHz pour le carbone-13. La durée de l'impulsion 90° était de 1,0 ms. Une période de relaxation de 6,0 secondes était nécessaire entre chaque passage et la largeur spectrale d'acquisition est de 30 030 Hz (Tableau IV). Les spectres RMN du carbone-13 ont été enregistrés avec des intégrations qualitatives (l'intégration quantitative n'était pas disponible). Les analyses des échantillons ont été enregistrés de deux façons, l'une selon les conditions normales et l'autre, avec le procédé TOSS (Total Suppression of Sidebands) (Sanders, J.K.M. et Hunter, B.K., 1988). Ce procédé permet de minimiser l'effet de matrice de l'échantillon afin de fournir un spectre dépourvu de tout dédoublement.

TABLEAU IV

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

APPAREIL	Varian, VXR 300
PHASE	Solide (CP/MAS)
ANGLE MAGIQUE DU SPIN	54° 44'
SÉQUENCE	Pulse
ANGLE DE PULSATION	90°
FRÉQUENCE	75.431 MHz
TEMPÉRATURE	25°C
LARGEUR SPECTRALE	30 030 Hz
TEMPS DE RELAXATION	6,0 sec.
TEMPS D'ACQUISITION	74,6 ms
VITESSE DU SPIN	3 900 Hz
MÉTHODE	TOSS

2.6.5 Spectrométrie de masse (FAB/MS):

Le terme FAB/MS (Fast Atom Bombardment/ Mass Spectroscopy) se traduit de l'anglais par "Spectrométrie de masse par atomes rapides", et consiste à partir d'un faisceau d'atomes rapides d'argon, à bombarder le composé. C'est une technique douce permettant l'étude de molécules complexes telle que la lignine. L'échantillon est placé en suspension dans une matrice liquide. Dans cette étude, le thioglycérol s'est avéré la meilleure matrice.

La technique (FAB/MS) permet l'analyse des fragments (m/z) des différents composés organiques complexes en phase solide (Tableau V).

TABLEAU V

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

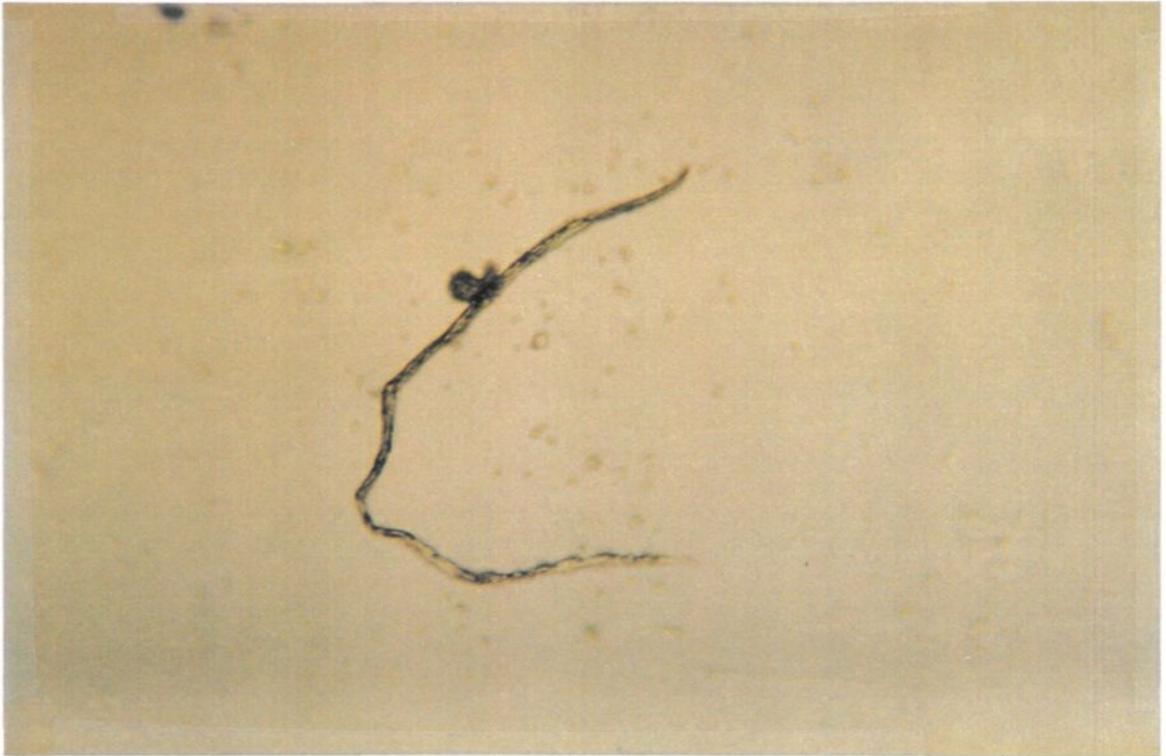
APPAREIL	VG, Autospec-q
PHASE	Solide (CP/MAS)
COURANT	2 μ A
ÉNERGIE	22 kV
TEMPÉRATURE	60 °C

2.7 Biotransformation de la lignine de Klason

2.7.1 Description du microorganisme

Les moisissures sont des champignons qui ne peuvent se classer ni parmi les plantes, ni parmi les animaux. Les champignons sont des organismes *eucaryotes* dont les cellules se composent d'un noyau entouré d'une membrane nucléaire. Cette caractéristique les différencie des *procaryotes* dont le noyau de la cellule ne présente pas de membrane nucléaire et demeure typique aux bactéries (Roquebert, M.-F., 1986). Ces microorganismes se présentent sous une forme filamenteuse. Ils se composent de longs vaisseaux contenant du cytoplasme ainsi que tout ce qui constitue les cellules vivantes: noyaux, mitochondries, ribosomes, vacuoles et réserves nutritives (Figure 17).

L'espèce utilisée, *Phanerochaete chrysosporium* ou encore *Sporotrichum pulverulentum*, fait partie des mycètes. Selon des études antérieures (Huguchi, T., 1981), ce microorganisme a la particularité de procéder à la dégradation de la lignine. Cette espèce est obtenue à partir des souches de l'American Type Culture Collection (numéro de série: ATCC 24725). Son rôle est de biotransformer la lignine de Klason; il en résulte une réduction de la longueur des unités phénylpropanoïnes composant ce polymère; des phénomènes de repolymérisations sont également observés (Schoemaker, H.E. et al, 1989).



gross. 100 x

Figure 17: Visualisation de *Phanerochaete chrysosporium* au microscope.

2.7.2 Milieu de culture

Pour permettre au microorganisme *Phanerochaete chrysosporium* de se développer, des plaques de gelose composées d'agar et d'un milieu constitué d'une solution de dextrose à base de pomme de terre (Medium Potato Dextrose Agar) sont préparées. La préparation d'une solution de 200 ml nécessite 7,84 g. d'agar et de 1,6 g de solution dextrose à base de pomme de terre. Une stérilisation est effectuée pendant 30 minutes à une température de 121°C sous une pression de 1,044 N/cm². La solution obtenue est versée dans des boîtes de Pétri pour ensuite former une substance gélatineuse prête à recevoir la souche initiale du microorganisme. Selon des études réalisées à l'Institut Armand-Frappier et à l'UQAC, le temps minimal pour une croissance adéquate de *Phanerochaete chrysosporium* est de 96 heures (4 jours) à une température de 25°C (Figure 18).

2.7.3 Biotransformation

Afin de réaliser un milieu de culture permettant, d'une part, le développement du microorganisme et, d'autre part, la biodégradation de la lignine de Klason, il faut préparer un milieu de culture tenant compte de ces objectifs. En considérant les différents paramètres, le milieu de culture servant à la croissance du mycète et à la dégradation de la lignine doit contenir un minimum d'éléments nutritifs.

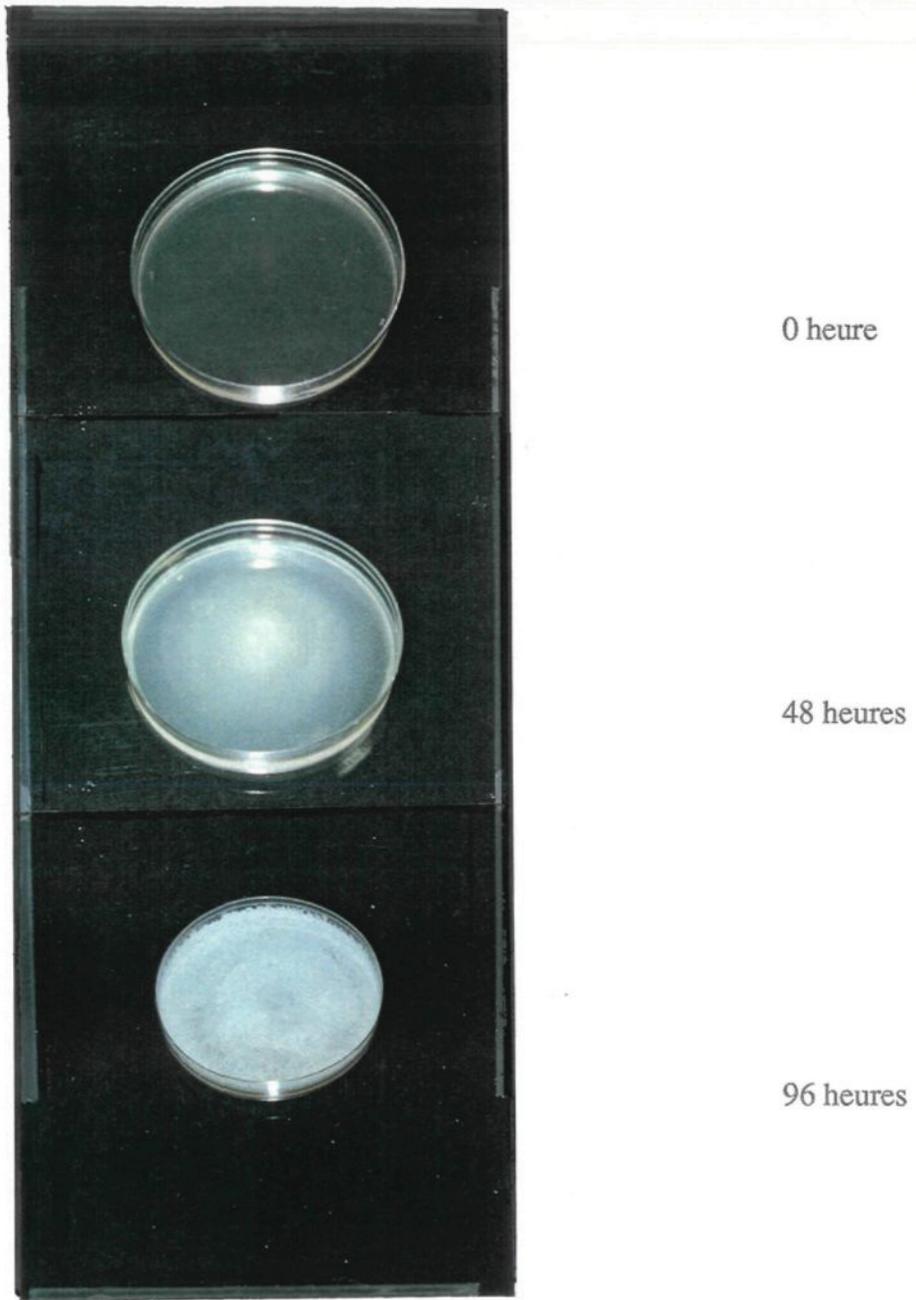


Figure 18: Croissance de *Phanerochaete chrysosporium* sur gelose à 25°C.

Un des exigences pour la réalisation de ce travail, consiste à optimiser le milieu de culture permettant la croissance du champignon, *Phanerochaete chrysosporium*, en vue d'une biotransformation optimum de la lignine.

Les éléments nécessaires pour préparer les milieux de culture ont été optimisés expérimentalement en variant le dosage de l'un ou l'autre des réactifs. Plusieurs essais ont été effectués initialement au centre de recherche en microbiologie appliquée de l'Institut Armand-Frappier sous la direction du Dr D.S. Chahal, et complétés à l'Université du Québec à Chicoutimi afin de trouver un milieu de culture efficace permettant d'atteindre les résultats escomptés. Un milieu de Mandels et Weber (1969) (Chahal, D.S., et Khan, S.M., 1991) a été adapté aux conditions expérimentales permettant la biotransformation de la lignine. Ce milieu se compose de glucose, de phosphate de potassium, de sulfate d'ammonium, d'urée, de sulfate de magnésium, de chlorure de calcium, de sulfate de fer (II), de sulfate de manganèse (II), de sulfate de zinc, de chlorure de cobalt (II) et d'extrait de levure (Tableau VI).

La biotransformation comprend deux (2) étapes: i) la croissance du microorganisme *Phanerochaete chrysosporium* en absence de lignine dans un milieu de Mandels et Weber (1969); ii) la fermentation de la lignine par *Phanerochaete chrysosporium* (Figure 19).

TABLEAU VI

Milieu de culture et de fermentation

Produits	Concentration
	(conc. g/l)
Glucose	10,0
Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	2,0
Sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	1,4
Urée	0,3
Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,3
Chlorure de calcium (CaCl_2)	0,3
Extrait de levure	0,5
	(conc. mg/l)
Sulfate de fer (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5,0
Sulfate de manganèse (II) ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2,23
Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2,76
Chlorure de cobalt (II) ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	3,66

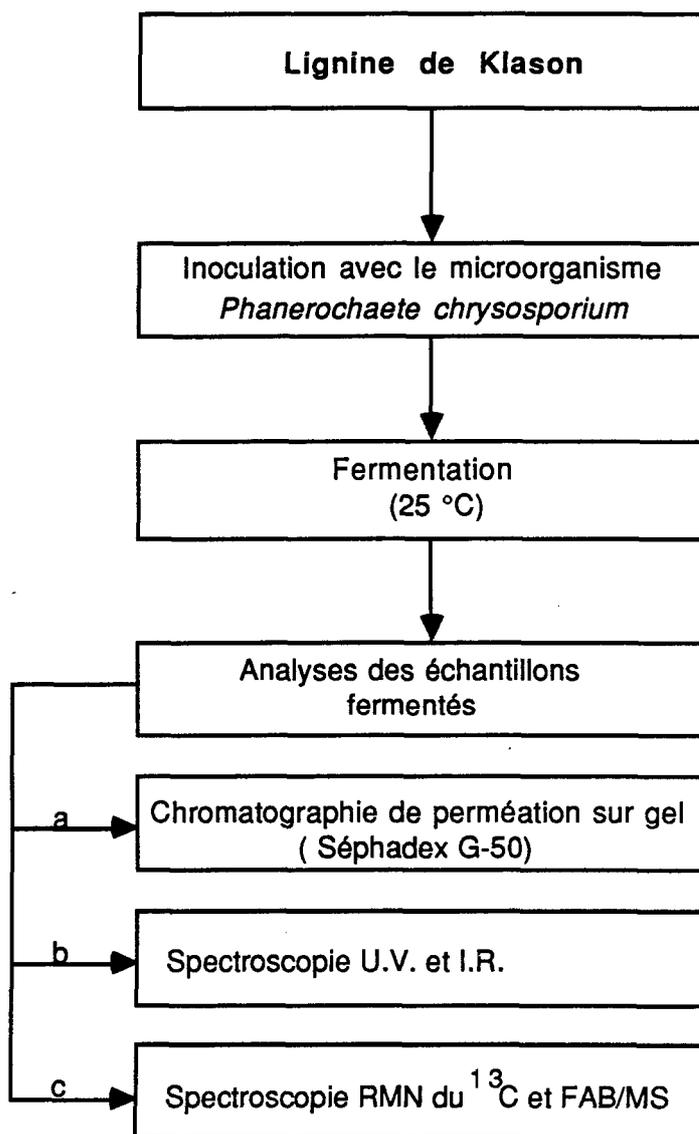


Figure 19: Méthodologie détaillée de la biotransformation de la lignine de Klason.

La méthodologie de la biotransformation de la lignine de Klason se résume à la croissance de *Phanerochaete chrysosporium* dans un milieu de Mandels et Weber dont la composition figure au tableau VI. La durée de croissance du microorganisme s'échelonne sur une période de 96 heures. Ensuite, des milieux de Mandels et Weber de la même composition sont préparés afin de pouvoir recevoir 0,15 g de lignine de Klason.

Le milieu contenant la mycète est homogénéisé à l'aide d'un mélangeur en acier inoxydable. Le microorganisme ainsi broyé est ajouté par fraction de dix (10) ml à chacun des milieux de Mandels et Weber contenant 0,15 g de lignine de Klason et le pH est ajusté à 5,8. Les milieux sont entreposés dans une atmosphère à température contrôlée (25°C) sur une plaque agitatrice de marque Junior Orbit Shaker (Lab-Line Instruments, Inc) dont la vitesse de rotation est de 130 tours/ min. A chaque prélèvement d'un milieu de culture, le pH est vérifié et réajusté à 5,8 et tous les autres milieux sont ainsi contrôlés.

2.7.4 Préparation des échantillons

Chacun des milieux est filtré sur papier filtre Whatman (degré de porosité de 4) permettant l'élimination des traces de lignine insoluble et du microorganisme. La lignine soluble est analysée par spectrométrie ultraviolette, résonance magnétique nucléaire du carbone-13, spectrométrie de masse par atomes rapides et par chromatographie d'exclusion sur gel.

Les échantillons de lignine soluble sont concentrés de même que la référence (milieu de culture). Une première analyse sur spectrophotomètre UV est effectuée et la région d'absorption se situe entre 240 et 290 nm pour atteindre une valeur maximale d'absorption à 267 nm.

Les mêmes échantillons de lignine biotransformée sont analysés sur colonne de perméation sur gel. La longueur d'onde utilisée pour la chromatographie est de 280 nm. Pour les autres types d'analyses spectroscopiques, les échantillons sont concentrés à sec puis dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) permettant d'obtenir une solution parfaitement homogène. Les analyses sont effectuées à partir d'une suspension dans le thioglycérol pour la spectrométrie de masse par atomes rapides (FAB/MS) et le spectre de résonance magnétique nucléaire du carbone-13 est déterminé en phase liquide.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Caractérisation des extractibles

La préparation de la lignine de Klason nécessite une pré-extraction au soxhlet afin d'éliminer les extractibles contenus dans la matière végétale. Les produits extraits de la biomasse se retrouvent solubilisés dans le mélange de solvant éthanol-toluène. Les échantillons sont méthylés par diazotation pour être ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Les indices de Kovats sont calculés et une seconde analyse de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) permet l'identification de ces produits. Les résultats obtenus démontrent que les extractibles de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss, se composent majoritairement d'acides résiniques, de quelques monoterpènes et de différents alcools (tableau VII). Ces résultats sont conformes à ceux déjà publiés (Yildirim, H. et Holmbom, B., 1978; Hachey, J.-M. et Simard, S., 1987). Les extractibles obtenus représentent 3,8 % (p/p) de la matière végétale séchée.

3.2 Composition élémentaire de la lignine

La composition élémentaire de la lignine traitée avec l'acide sulfurique concentré à 72% (v/v) provenant d'essence résineuse, telle que l'épinette blanche de Norvège, *Picea abies*, est de l'ordre de 62,3% (p/p) en teneur de carbone, 5,5% d'hydrogène, 32,2% d'oxygène et 14,1% en groupements méthoxyles (OCH₃) (Fengel, D. and Wegener, G., 1984).

TABLEAU VII

Extractibles provenant de l'épinette blanche

No.	T.R.	Surface (%)	I.K.	Identification
1	7,68	3,31	865	Ethyl benzène
2	8,03	3,76	873	Diméthyl-1,3 benzène
3	11,02	1,84	933	Cumène
4	17,02	0,55	1025	Éther méthylique du p-crésyl
5	17,77	1,50	1038	n.i.
6	20,60	0,50	1084	Trans-octène-2-ol-1
7	20,77	1,04	1086	n.i.
8	21,38	11,29	1095	Fenchone
9	28,83	0,93	1188	Isobutyrate de cyclohexyle
10	29,81	1,18	1199	Octanoate d'éthyle
11	37,26	1,12	1316	Nonyoate-2 de méthyle
12	42,74	1,50	1388	β-damascénone
13	52,81	1,13	1551	Occidentalol
14	63,20	2,28	1729	Décanoate de méthyle
15	73,85	1,80	1929	Nonadécanoate de méthyle
16	77,42	1,02	1996	n.i.
17	78,80	2,29	2026	Isobutyrate de géranyle
19	79,76	6,13	2048	Manool

TABLEAU VII (SUIITE)

No.	T.R.	Surface (%)	I.K.	Identification
20	79,78	1,19	2048	Tétradécanoate de méthyle
21	81,01	0,93	2075	n.i.
22	82,27	1,11	2102	Stéarate de méthyle
24	83,79	0,99	2134	n.i.
26	88,89	1,42	2234	Sandaracopimarate de méthyle
28	91,05	3,71	2272	Isopimarate de méthyle
30	93,23	4,12	2310	Tétrahydroabiétate de méthyle
32	93,65	20,19	2317	Déhydroabiétate de méthyle
34	96,38	1,16	2361	Néoabiétate de méthyle

Légende:

n.i. non identifié

T.R. Temps de rétention (min.)

I.K. Indice de Kovats

La composition trouvée pour la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss, de la région du Saguenay au Québec, contient 60,27% (p/p) de carbone, 5,27% d'hydrogène, 0,30% d'azote, 0,46% de soufre et 9,46% de groupements méthoxyles (OCH₃). La composition en oxygène fut déterminée par calcul et permet d'obtenir 33,70% en oxygène pour ce type d'épinette. Les analyses élémentaires des échantillons d'épinette blanche du Québec, *Picea glauca* (Moench) Voss, et de sapin baumier de la même région, *Abies balsamea* L. Mill., présentés au tableau VIII ont été effectuées au Laboratoire Schwarzkopf (Schwarzkopf Microanalytical Laboratory, Woodside, NY 11377, USA).

Les résultats obtenus pour l'analyse élémentaire permettent l'estimation d'une formule empirique correspondant au polymère de la lignine de Klason selon la forme suivante: C_xH_yO_z(OCH₃)_n. Après calcul pour la lignine de Klason de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss, la formule moléculaire, pour chaque unité de neuf (9) carbones, comprend huit (8) hydrogènes, trois (3) oxygènes et une demi (0,5) unité méthoxyle. La formule moléculaire simplifiée s'exprime comme suit: C₉H_{8,3}O_{3,43}(OCH₃)_{0,58}. Les calculs ont également été effectués pour la lignine de Klason extraite du sapin baumier *Abies balsamea* L. Mill. et l'expression de la formule moléculaire représente: C₉H_{7,4}O_{2,78}(OCH₃)_{0,78}.

Concernant l'échantillon de lignine de Klason provenant du sapin baumier, le pourcentage de groupements méthoxyles est d'environ 13,0 % comparativement à 9,46% pour l'épinette blanche. Ces différences peuvent être attribuées à une teneur plus grande en para-hydroxyphényle pour l'épinette blanche. Par contre, le pourcentage en carbone et en hydrogène est très similaire pour les deux espèces analysées. Afin de

démontrer que le traitement à l'acide sulfurique 72% ne contribue pas à l'hydrolyse du groupement méthoxyle, un échantillon d'anisole a subi le même traitement que celui de l'épinette blanche. Les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse ont démontré que le pourcentage d'anisole hydrolysé ne dépasse pas 0,08% (selon la teneur en phénol). Ces résultats démontrent que le groupement méthoxyle qui se retrouve sur le cycle aromatique ne peut être hydrolysé selon la procédure d'extraction de la lignine de Klason. Ces résultats sont conformes à ceux notés dans la littérature concernant les exigences pour l'hydrolyse d'éthers phénoliques: la présence de HI ou HBr est requise (Vogel, A.I., 1978).

La lignine de Klason produite, représente 26% de la matière végétale séchée et se compare bien aux résultats de Mullins et McKnight (1981).

TABLEAU VIII
Composition élémentaire de la lignine de Klason

Éléments	Épinette blanche ^a (Canada)	Sapin baumier ^b (Canada)	Épinette blanche ^c (Norvège)
	% Retrouvé		
Carbone	60,27	63,39	62,3
Hydrogène	5,27	5,77	5,5
Azote	0,30	n.d.	n.d.
Soufre	0,46	n.d.	n.d.
Oxygène	33,70	30,84	32,2
Méthoxyle (OCH ₃)	9,46	13,06	14,1

n.d. non déterminé

a- *Picea glauca* (Moench) Voss

b- *Abies balsamea* (L.) Mill.

c- *Picea abies*¹¹

3.3 Analyses spectroscopiques infrarouges

L'interprétation de spectres infrarouges permet d'identifier des groupements fonctionnels caractéristiques. Pour des échantillons de lignine, la plus grande erreur est de conclure rapidement que les spectres de lignine sont tous identiques les uns par rapport aux autres (Faix, O., et Beinhof, O., 1988). Le fait qu'ils soient similaires ne signifie pas qu'ils soient identiques. Les spectres infrarouges de lignine présentent des caractéristiques particulières pour chaque type de lignine. Une grande minutie est requise dans l'interprétation des spectres obtenus pour le bois brut, le bois extrait et la lignine de Klason, ceci, afin de différencier les légères variations permettant de dégager des caractéristiques propres à chacune des composantes majeures du bois (cellulose, hémicellulose, lignine).

Afin d'étudier en profondeur les spectres d'épinette blanche, ceux-ci ont été soumis à la méthode de différenciation. Cette méthode permet de maximiser la résolution en minimisant le risque d'erreur (Faix, O., et Beinhof, O., 1988). Le spectre du bois brut a été effectué à l'état solide en suspension dans le KBr. Le spectre de soustraction, qui résulte du spectre de l'échantillon (lignine) moins celui de la référence (KBr), permet d'éliminer les signaux attribuables à l'air, au KBr et au bruit de fond de l'appareil dans l'interprétation des résultats.

Trois (3) échantillons différents provenant du même conifère sont analysés: le bois brut, le bois extrait avec l'éthanol-toluène et la lignine de Klason. Le spectre du bois brut (Figure 20) correspond à l'échantillon non-traité, broyé à une grosseur de

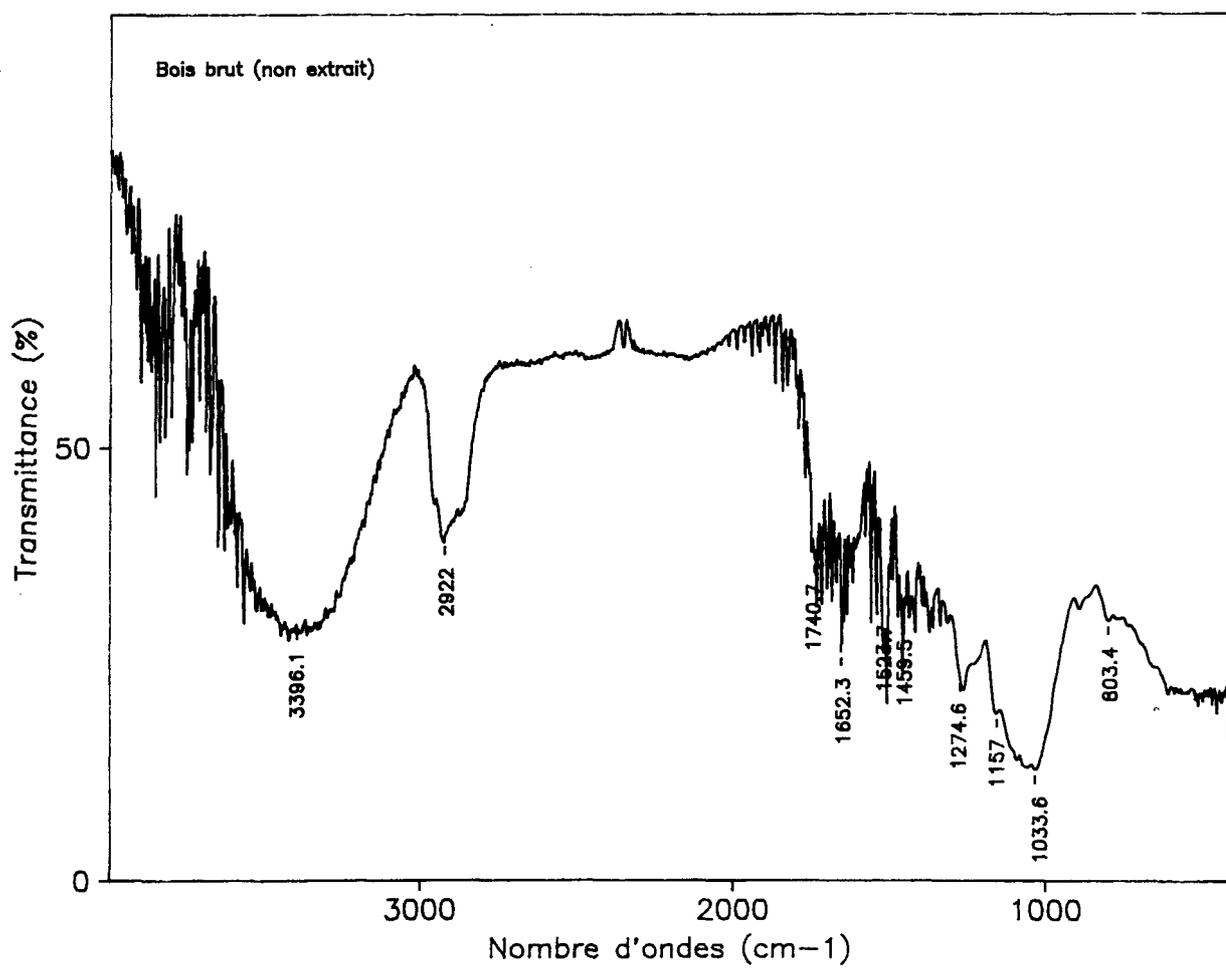


Figure 20: Spectroscopie infrarouge du bois brut (avec extractibles).

particules de -20 mesh (se qui passe à travers un tamis de 20 mesh). Le spectre du bois extrait (Figure 21) correspond aux résidus de bois obtenus après extraction avec un mélange d'éthanol-toluène au soxhlet, et finalement, la lignine de Klason (Figure 22) corespond aux particules solides recupérés après traitement avec l'acide sulfurique à 72% (v/v) suivi d'une hydrolyse en présence d'acide sulfurique 5%.

Par comparaison des trois (3) échantillons, les spectres obtenus présentent une grande similitude dans la région de 4000 à 2000 cm^{-1} (Figure 23). L'ensemble des trois (3) spectres montrent une large bande d'absorption dans la région de 3400 cm^{-1} et ce nombre d'onde correspond aux groupements hydroxyles (OH) (Browning, B.L., 1967). Les vibrations de valence C-H aromatique retrouvées entre 2800 et 3030 cm^{-1} sont observées pour chacun des échantillons.

Le spectre de lignine se différencie des deux (2) autres par une diminution de l'intensité du signal dans la région de 1000 à 1500 cm^{-1} . Cette région renferme des fonctions aromatiques, hydroxyles et des fonctions éthers aromatiques. Les groupements acétyles provenant des résidus de polysaccharides, sont caractéristiques des échantillons de bois brut et de bois sans extractibles par leur absorbtion dans la région de 1735-1740 cm^{-1} (Fengel, D. and Wegener, G., 1984). Le signal observé pour les échantillons de bois brut et de bois extrait est bien défini comparativement à lignine de Klason qui lui demeure présent au nombre d'onde de 1733 cm^{-1} tout en étant beaucoup moins prononcé (Figure 24).

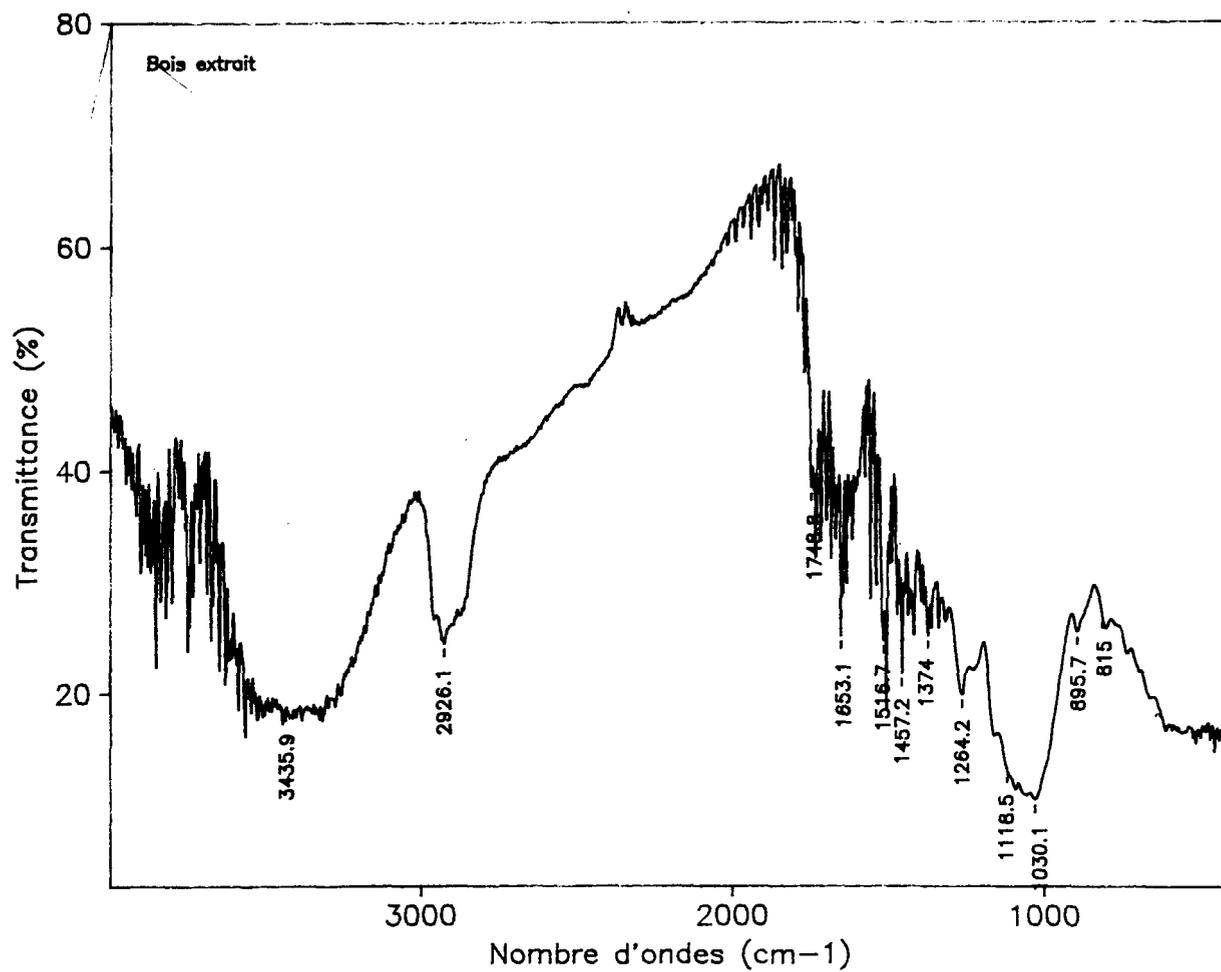


Figure 21: Spectroscopie infrarouge du bois extrait (sans extractibles).

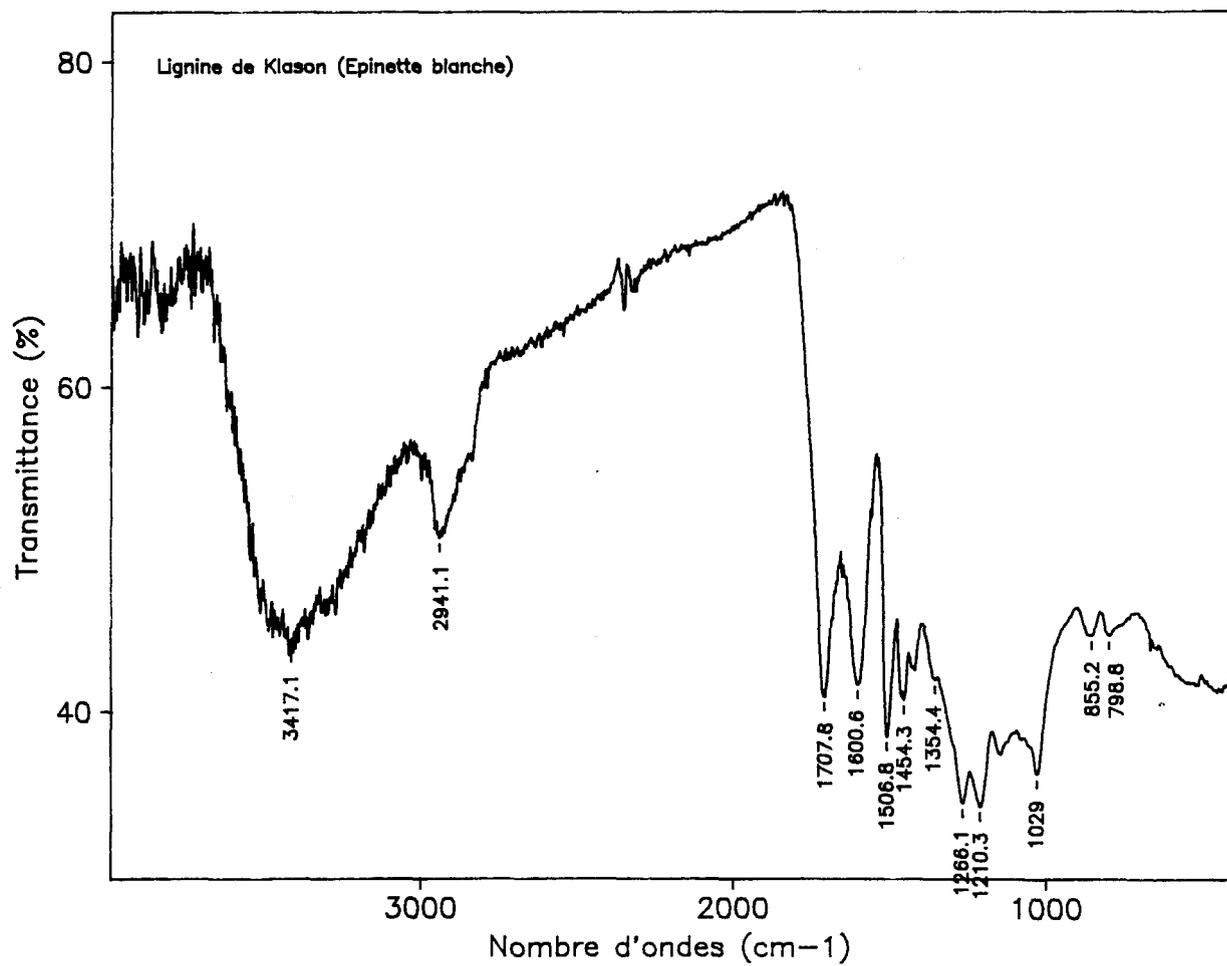


Figure 22: Spectroscopie infrarouge de la lignine de Klason.

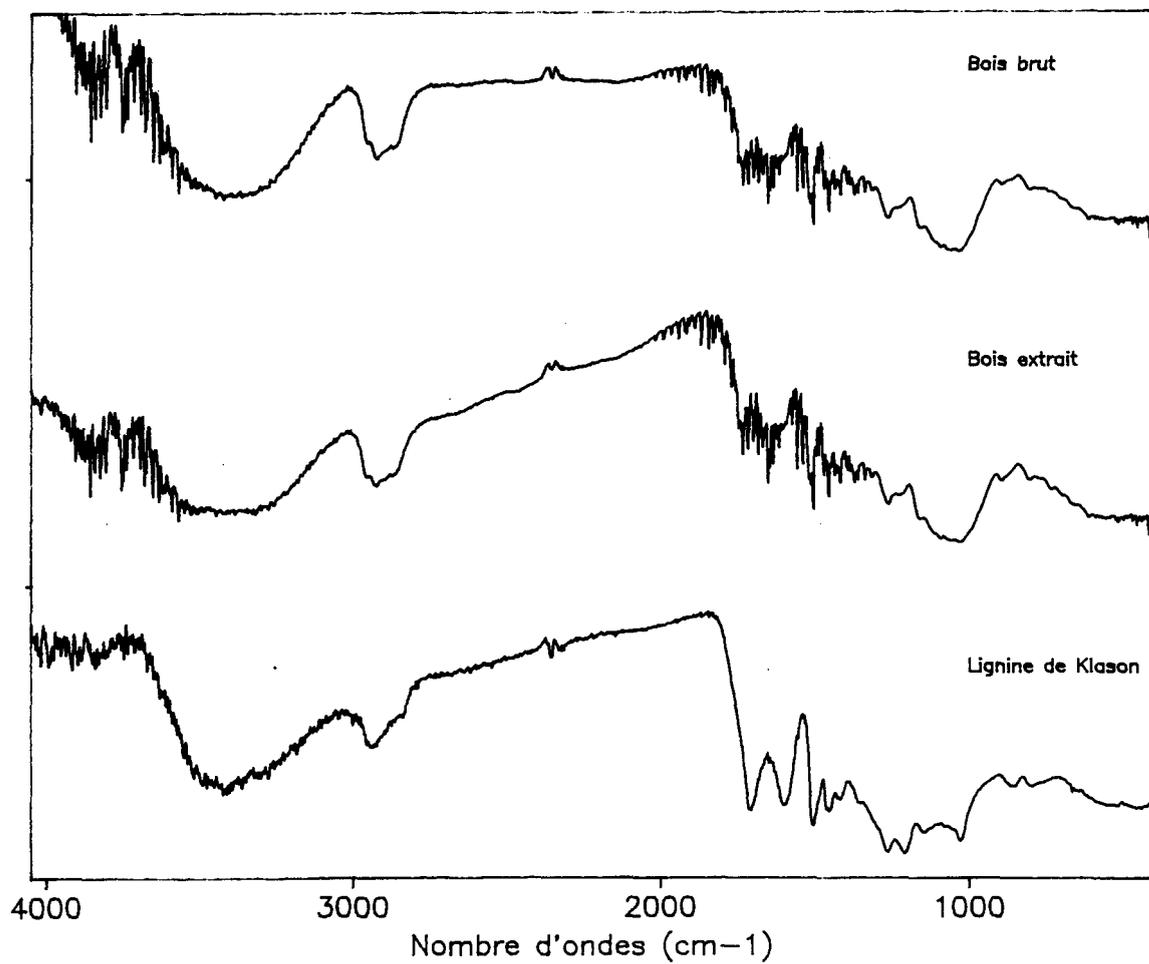


Figure 23: Comparaison des trois spectres issus de l'épinette blanche
Picea glauca (Moench) Voss.

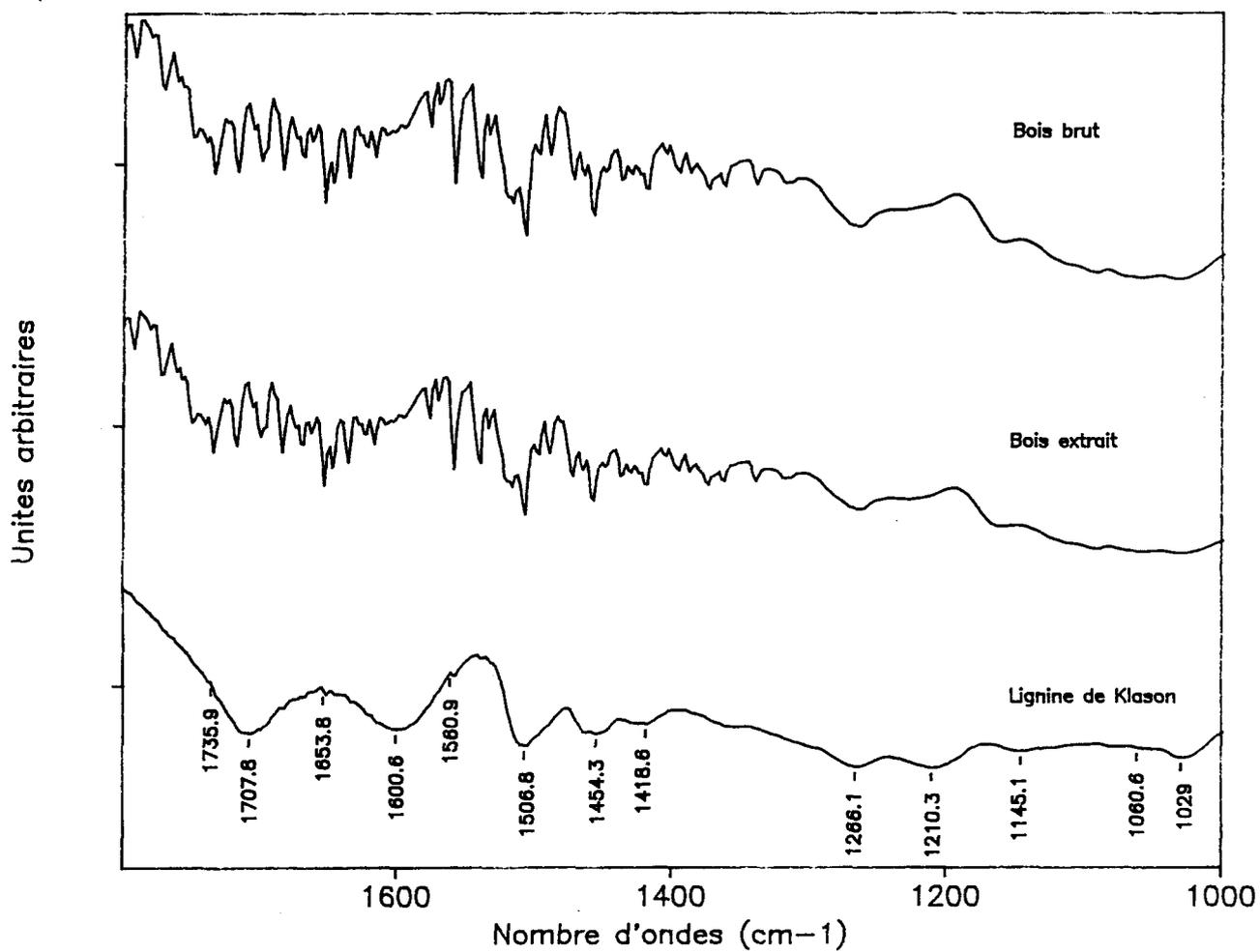


Figure 24: Spectres infrarouges du bois brut et de la lignine de Klason dans la région de 1000 à 1800 cm^{-1} .

Les unités de base constituant la lignine, se composent principalement de fonctions aromatiques, de carbonyles (C=O), d'alcools et d'éthers. Dans les spectres du bois brut, du bois extrait et de celui de la lignine de Klason, de larges bandes intenses sont observées dans les régions de 1600 à 1725 cm^{-1} . Celles-ci correspondent aux groupements carbonyles (C=O) qui se retrouvent dans la structure de la lignine. Selon la structure moléculaire de l'échantillon, la position spectrale de ce groupement peut légèrement varier en présence de conjugaisons reliées aux noyaux aromatiques. Habituellement, dans un échantillon de lignine, ce groupement principal se situe près de 1700 cm^{-1} (Fengel, D. and Wegener, G., 1984).

Les bandes d'absorption déjà observées entre 1500 et 1600 cm^{-1} , sont retrouvées dans la région de 1511 et 1596 cm^{-1} et correspondent aux vibrations de valence C=C conjuguées des systèmes aromatiques (Silverstein, R.M. *et al.*, 1991; Browning, B.L., 1967; Durig, D.T. *et al.*, 1988). Des études antérieures ont démontré que l'intensité des bandes d'absorption se trouve grandement influencée par la structure avoisinante du noyau aromatique (Katrizky, A.R., Topsom, R.D., 1977).

A partir des échantillons analysés, il existe deux (2) régions qui permettent de différencier la lignine du bois mou et celle du bois dur. Premièrement, la lignine se caractérise en infrarouge par d'importantes bandes d'absorption dans la région de 1500 et 1600 cm^{-1} . Les résultats obtenus antérieurement par différents auteurs, démontrent que des bandes caractéristiques de la lignine sont présentes entre 1500-1600 cm^{-1} . D'après les signaux observés, le spectre de la lignine de Klason montre une vibration de valence dans la région de 1517 cm^{-1} et cette région correspond aux unités de lignine

caractérisant les bois mous (Faix, O., et Beinhof, O., 1988; Owen, N.L. et Thomas, D.W., 1989).

Deuxièmement, de légères variations dans la région de 1000 à 1600 cm^{-1} permettent également de différencier le spectre de la lignine des deux (2) autres. Ces deux (2) bandes d'absorption permettant la différenciation, présentent des intensités se situant dans les régions variant de 1510 à 1600 cm^{-1} et 1250 à 1300 cm^{-1} (Figure 25). Ces absorptions caractéristiques permettent de retrouver la présence d'un feuillu par le groupement syringyle qui se caractérise par une absorption à 1300 cm^{-1} (Fengel, D. and Wegener, G., 1984). Les échantillons analysés présentent une vibration reliée au noyau aromatique dans la région de 1270 cm^{-1} , caractéristique des bois mous, et signe du groupement guaïacyle. Selon les spectres obtenus, l'absence du signal dans la région de 1330 cm^{-1} (caractéristique du noyau syringyle), permettent d'affirmer que les échantillons analysés proviennent d'un conifère.

La bande d'absorption retrouvée à 1029 cm^{-1} correspond à des déformations RC-H et aux alcools R-OH, ce qui implique des fonctions alcools en bout de chaîne. La région variant de 1085 à 1035 cm^{-1} donne un maximum d'absorption à 1060 cm^{-1} pour les échantillons de bois brut et de bois extrait. Cette région d'absorption demeure spécifique aux groupements cellulosiques et permet d'observer la présence de traces des groupements cellulosiques pour le spectre de la lignine comparé à celui du bois brut et du bois extrait.

Selon la littérature, les absorptions situées entre 1000 et 1100 cm^{-1} correspondent aux différents sucres. Dans les échantillons de bois brut et de bois

extrait, la présence de polysaccharides est observée entre 1000 et 1100 cm^{-1} . Les deux (2) spectres de bois brut et de bois extrait présentent également une importante absorption, caractéristique des sucres et des vibrations C-OR, dans la région de 1210 cm^{-1} (Fengel, D. and Wegener, G., 1984).

Une interprétation plus détaillée concernant les analyses spectroscopiques infrarouges est décrite aux tableaux IX et X pour l'échantillon de bois brut et de bois sans extractibles; l'interprétation du spectre infrarouge de la lignine de Klason est décrite au tableau XI.

Des spectres ont également été réalisés à partir du solvant utilisé pour l'élimination des extractibles. Celui-ci renferme les extractibles de la matière végétale extraite à l'aide du soxhlet et les résultats démontrent les groupements fonctionnels caractérisant les acides résiniques et diverses fonctions alcools (Figure 26). Ces résultats permettent d'établir un parallèle entre la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire et la spectroscopie infrarouge.

Afin de vérifier l'absence de cellulose dans l'échantillon de lignine, des spectres de soustraction ont été réalisés à partir du spectre du bois brut et celui de la lignine. Le spectre résultant de ces différences, renferme les principales bandes caractéristiques de la cellulose dans la région de 1060 cm^{-1} . Ce dernier est par la suite comparé à un échantillon de cellulose et l'ensemble des deux (2) spectres démontrent les similitudes (Figure 27).

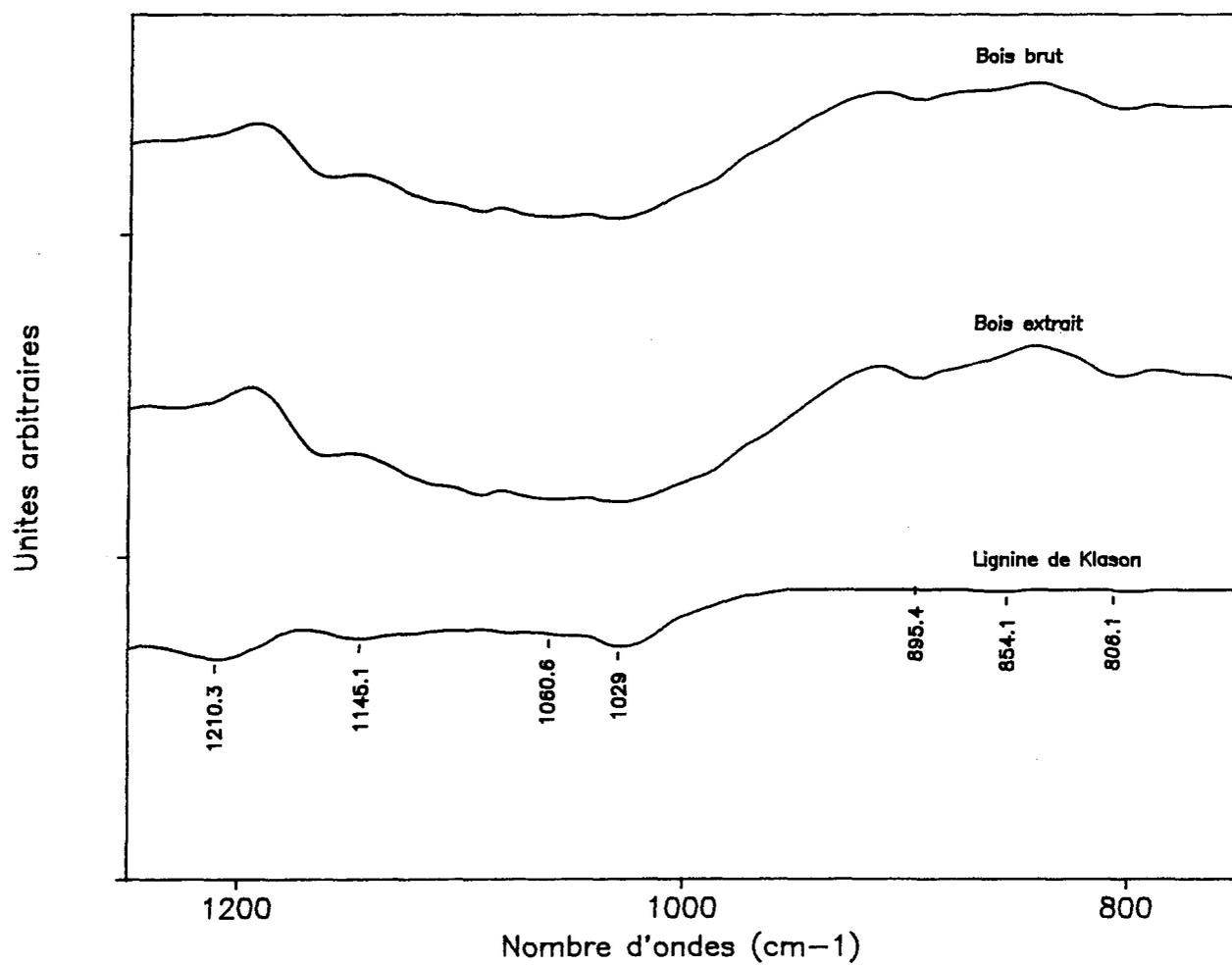


Figure 25: Spectres infrarouges de l'épinette blanche dans la région de 800 à 1300 cm^{-1} .

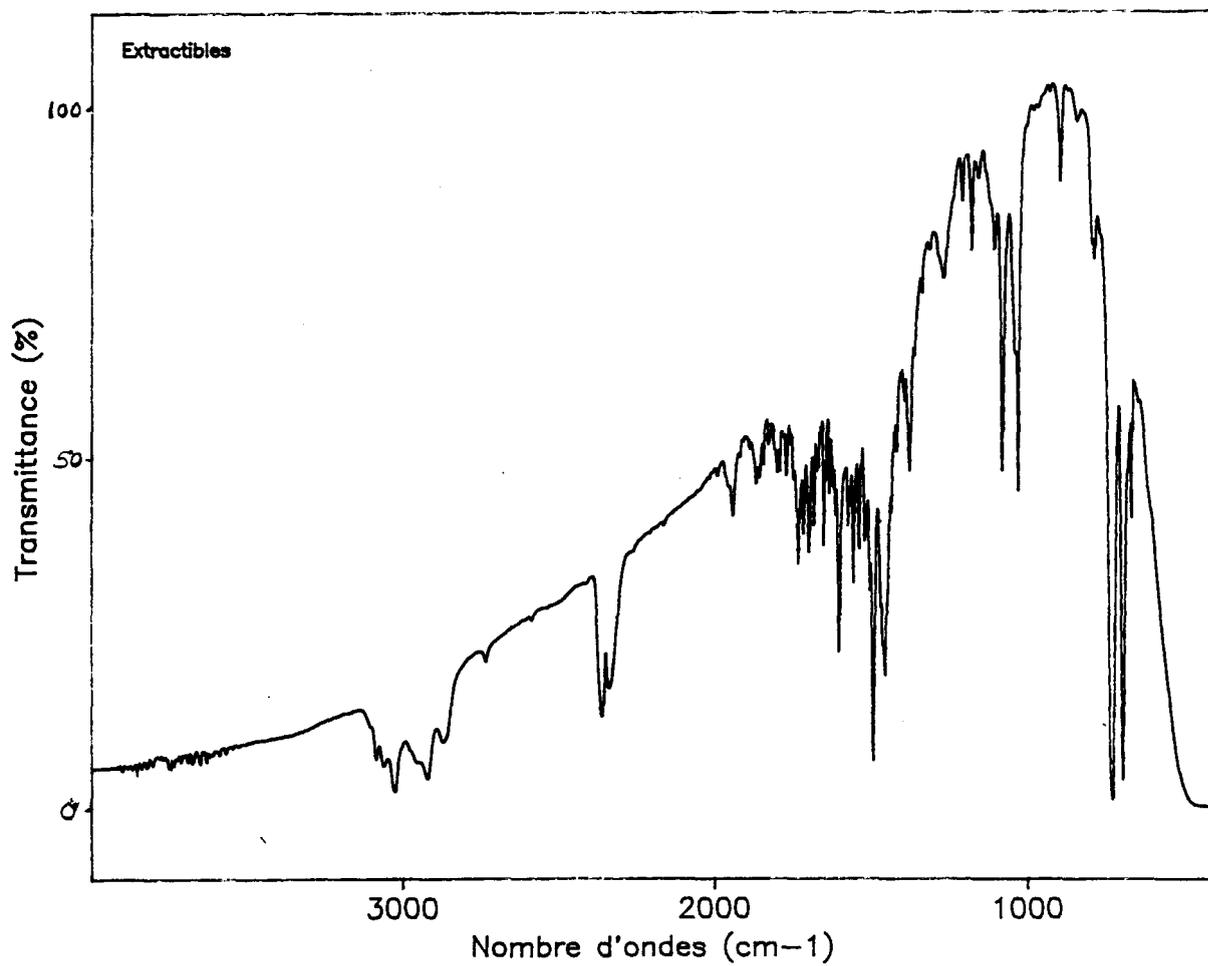


Figure 26: Spectre infrarouge des extractibles.

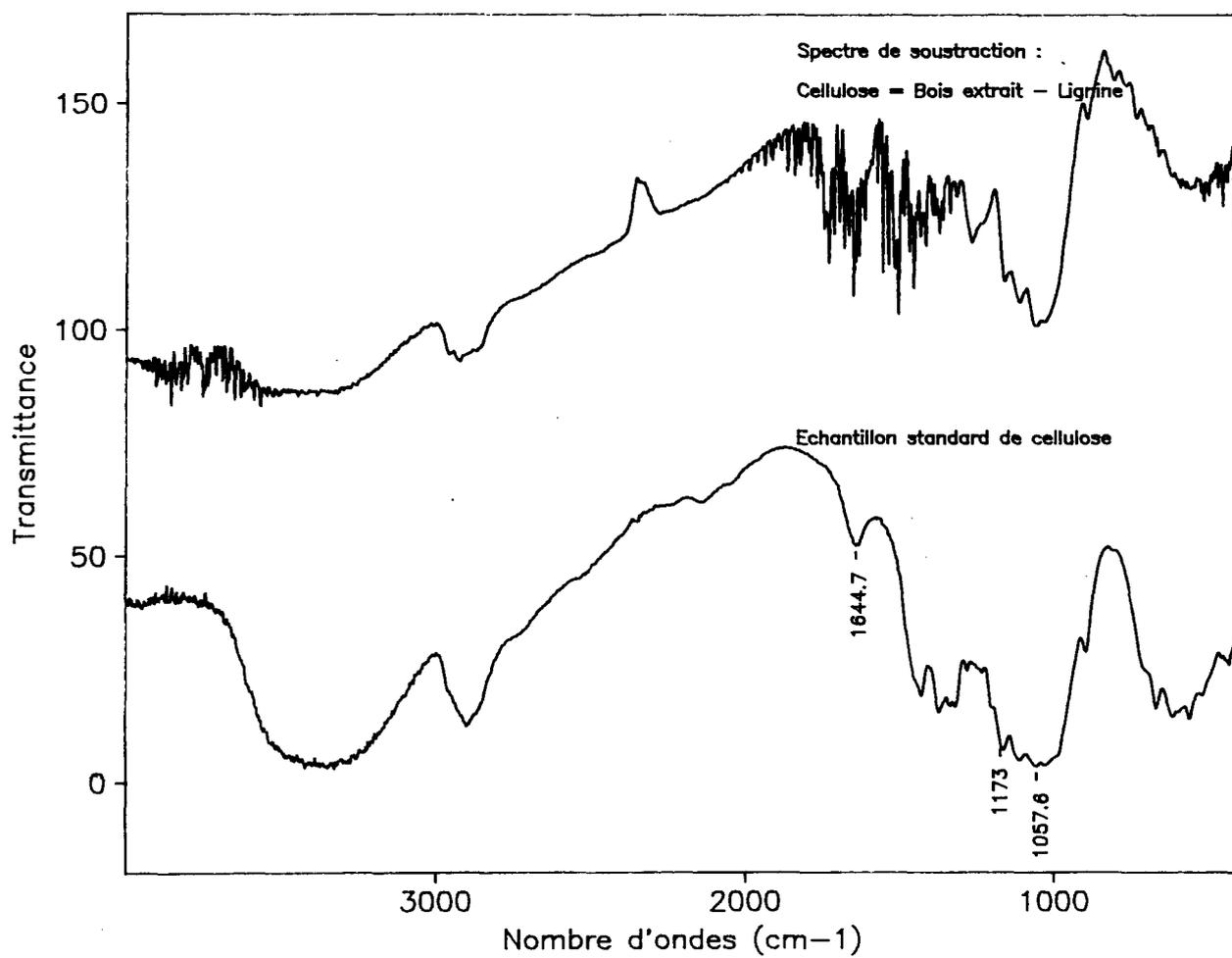


Figure 27: Spectre infrarouge de soustraction représentant la cellulose.

TABLEAU IX
Interprétation des spectres infrarouges du bois brut
de l'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss)

No.	cm ⁻¹	Signaux obs. Trans. (%)	Interprétation
01	457.4	20.3	benzène monosubstitué; disubst.: ortho, méta;
02	612.4	21.9	—
03	802.3	30.3	benzène trisubstitué 1,2,4;
04	895.9	32.2	aromatique C-H;
05	1032.7	16.3	gr. guaïacyl C-H, C-OH;
06	1063.2	16.9	—
07	1160.6	20.5	—
08	1265.0	22.0	éthers aromatiques; alcool aliph.:prim.,sec.,ter.; phénols; noyau guaïacyl;
09	1338.7	25.9	C=C conjugué;
10	1362.6	25.9	phénols; alcool aliph.:prim.,sec.,ter.;
11	1373.9	25.2	déformation C-H asym. dans CH ₃ ;
12	1395.6	28.2	déformation C-H asym. dans CH ₃ ;
13	1418.7	28.6	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
14	1436.2	30.3	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
15	1457.1	24.1	déformations C-H asym. dans CH ₂ ;
16	1472.4	30.4	—
17	1488.9	34.7	—
18	1507.2	20.5	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
			benzène trisubstitué: 1,2,4;

Légende:

--- : Non interprété

TABLEAU IX (SUITE)

No.	Signaux obs. cm ⁻¹	Trans. (%)	Interprétation
19	1517.0	26.3	—
20	1540.1	30.7	—
21	1558.3	29.7	benzène trisubstitué: 1,2,4;
22	1576.5	39.7	—
23	1616.5	34.4	vibr. noyau aromatique;
24	1635.7	30.8	benzène trisubstitué: 1,2,4; C=C conjugué avec le benzène;
25	1647.0	28.9	C=C conjugué avec le benzène;
26	1652.9	26.4	C=C conjugué avec le benzène;
27	1669.4	34.5	vibr. val. C=O conj.;
28	1683.5	32.3	vibr. val. C=O conj.;
29	1699.0	33.8	vibr. val. C=O conj.;
30	1716.9	31.6	vibr. val. C=O non conj.;
31	1733.5	31.6	—
32	1771.4	46.5	—
33	2876.2	42.5	—
34	2924.6	39.0	vibr. val. C-H, aromatique;
35	3394.3	29.5	—
36	3779.7	68.9	—

Légende:

--- : Non interprété

TABLEAU X
Interprétation des spectres infrarouges du bois extrait
de l'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss)

No.	Signaux obs. cm ⁻¹	Trans. (%)	Interprétation
01	418.6	12.4	---
02	517.7	15.5	---
03	895.7	25.6	aromatique C-H;
04	1030.1	10.5	gr. guaiacyl C-H, C-OH;
05	1264.2	19.9	éthers aromatiques; alcool aliph.: prim., sec., ter.;
06	1338.7	25.9	phénols; noyau guaiacyl; C=C conjugué;
07	1362.6	25.9	phénols; alcool aliph.: prim., sec., ter.;
08	1374.0	25.2	déformation C-H asym. dans CH ₃ ;
09	1395.4	28.2	déformation C-H asym. dans CH ₃ ;
10	1418.7	25.2	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
11	1436.2	27.0	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
12	1457.2	21.8	déformations C-H asym. dans CH ₂ ;
13	1472.5	27.0	déformations C-H asym. dans CH ₂ ;
14	1489.2	31.7	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
15	1507.2	18.6	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
16	1516.7	24.7	benzène trisubstitué: 1,2,4;
17	1540.2	29.7	vibr. aromatiques dans le noyau;
18	1558.6	28.5	benzène trisubstitué: 1,2,4;

Légende:

--- : Non interprété

TABLEAU X (SUITE)

No.	Signaux obs. cm ⁻¹	Trans. (%)	Interprétation
19	1576.5	39.4	benzène trisubstitué: 1,2,4;
20	1608.1	38.1	vibr. noyau aromatique;
21	1616.6	33.8	C=C conjugué dans noyau arom.;
22	1635.8	29.9	benzène trisubstitué: 1,2,4; C=C conjugué avec le benzène;
23	1647.0	28.9	C=C conjugué avec le benzène;
24	1653.1	25.1	C=C conjugué avec le benzène;
25	1669.5	33.8	vibr. val. C=O conj.;
26	1683.7	32.1	vibr. val. C=C conj.;
27	1699.3	35.5	vibr. val. C=C conj.;
28	1717.2	33.6	vibr. val. C=O non conj.;
29	1733.7	32.1	—
30	1844.3	58.0	—
31	1868.3	58.8	—
32	2926.1	24.4	vibr. val. C-H, aromatique;
33	3567.4	16.2	vibr. val. O-H; ponts H intermol;
34	3751.4	23.8	vibr. val. O-H; ponts H intermol;
35	3854.3	22.3	vibr. val. O-H; ponts H intermol

Légende:

--- : Non interprété

TABLEAU XI
Interprétation des spectres infrarouges de la lignine
de Klason extrait de l'épinette blanche
(*Picea glauca* (Moench) Voss)

No.	Signaux obs. cm ⁻¹	Trans. (%)	Interprétation
01	457.2	30.3	benzène monosubstitué;
02	518.5	41.7	benzène disubst.: ortho, méta;
03	798.8	44.8	éthers aliphatiques; benzène disubstitué: para;
04	855.2	44.8	benzène trisubstitué: 1, 2, 4;
05	1029.0	36.4	benzène trisubstitué: 1, 2, 4;
06	1092.7	30.9	déformation C-H, C-O; gr. guaïacyl C-H, C-OH;
07	1145.1	37.5	gr. O-H second.; éthers aliph.; éthers aromatiques; benzène trisubstitué: 1,2,4; benzène disubstitué: méta;
08	1210.3	34.4	benzène monosubstitué; benzène trisubstitué: 1,2,4; benzène disubstitué: méta;
09	1266.1	34.6	éther aromatique: phénol; éthers aromatiques;
10	1338.6	44.1	alcool aliph.:prim.,sec.,ter.;
11	1362.3	45.2	phénols; noyau guaïacyl; C=C conjugué; alcool aliph.:prim.,sec.,ter.;
12	1373.9	46.4	phénols; alcool aliph.:prim.,sec.,ter.;
			CH ₂ , torsion et balancement; déformation C-H asym. dans CH ₃ ;

Légende:

--- : Non interprété

TABLEAU XI (SUITE)

No.	Signaux obs. cm ⁻¹	Trans. (%)	Interprétation
13	1396.0	46.6	—
14	1418.6	42.8	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
15	1436.2	46.1	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
16	1454.3	41.0	déformations C-H asym. dans CH ₂ ;
17	1472.7	43.9	C-H, alcane
18	1489.6	43.5	—
19	1506.8	39.0	vibr. val. C-C dans noyau arom.;
			benzène trisubstitué: 1,2,4;
20	1540.6	41.3	—
21	1558.4	38.7	benzène trisubstitué: 1,2,4;
22	1576.4	47.4	vibr. noyau aromatique;
23	1616.6	41.9	vibr. noyau aromatique;
24	1635.7	44.2	benzène trisubstitué: 1,2,4;
			C=C conjugué avec le benzène;
25	1652.7	40.5	vibr. val. C=O conj.; (ald.)
26	1684.2	38.5	—
27	1699.3	34.3	vibr. val. C=O non conj.;
28	1716.5	34.4	—
29	1733.2	40.6	—
30	2145.6	31.8	vibr. val. C=O non comj.;
31	2791.9	60.4	—
32	2875.7	54.6	vibr. val. O-H;
33	2941.1	51.0	vibr. val. C-H, CH ₃ sym.;
34	3000.8	54.8	vibr. val. C-H, aromatique;
35	3120.1	53.6	vibr. val. C-H, aromatique;
36	3222.7	49.4	—
37	3255.5	48.1	—
38	3423.3	44.0	vibr. val. O-H; ponts H intermolécul.

Légende:

--- : Non interprété

3.4 Analyses spectroscopiques U.V.

En ultraviolet, la lignine de Klason de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss montre une région où l'absorbance varie de 240 à 280 nm pour donner un maximum à 267 nm (Figure 28). D'après les résultats obtenus antérieurement, pour l'épinette blanche, par Katayama, T. et Sogo, M., (1986), les maxima d'absorption se situent à 205, 240 et 262 nm.

Par ailleurs, les spectres montrent un maximum d'absorption à 276,8 nm pour la lignine de Klason. Cette absorption est caractéristique des unités guaiacyles retrouvées dans les fragments de lignine de conifère. Les autres signaux obtenus, pour l'hêtre japonais, ont une absorption maximale à 280 nm. Il est probable que les spectres d'essence résineuses peuvent légèrement différer des espèces à bois durs. D'autres chercheurs ont estimé une absorption maximale vers une longueur d'onde de 240 nm; ce qui permet de proposer la présence de systèmes conjugués et de noyaux aromatiques (Anlgren, P. et Goring, D., 1971).

Suite à la biotransformation de cette lignine de Klason par *Phanerochaete chrysosporium*, les résultats obtenus pour les temps de fermentation de 0 à 68 heures, offrent aucun changement apparent (Figure 29). Par contre, des changements sont observés au bout de 238 heures pour donner un maximum d'absorption à 264 nm. Ce processus peut expliquer le début d'une modification de la structure moléculaire de la lignine de Klason lorsque celui-ci se trouve en présence de *Phanerochaete chrysosporium* (Figure 30).

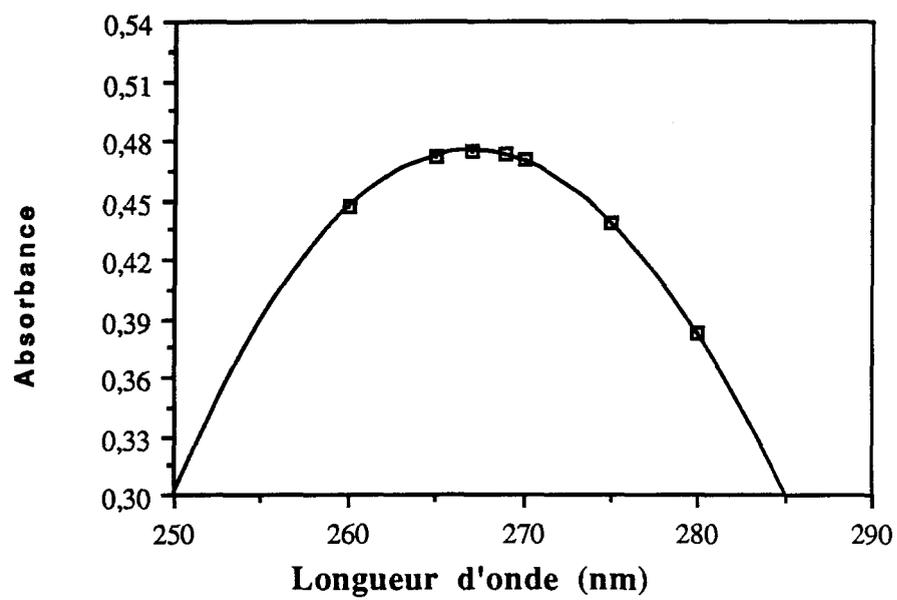


Figure 28: Spectre UV de la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche.

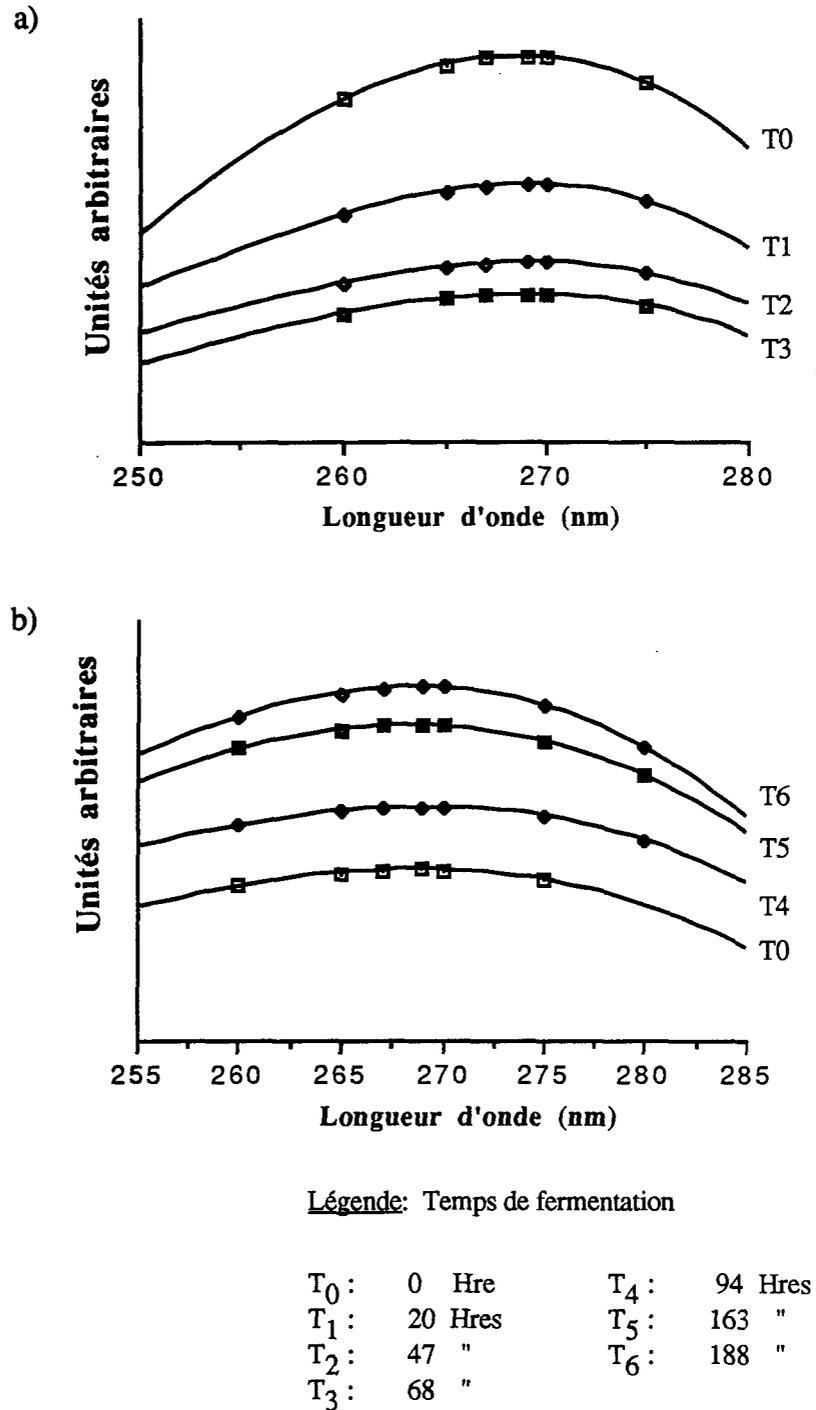
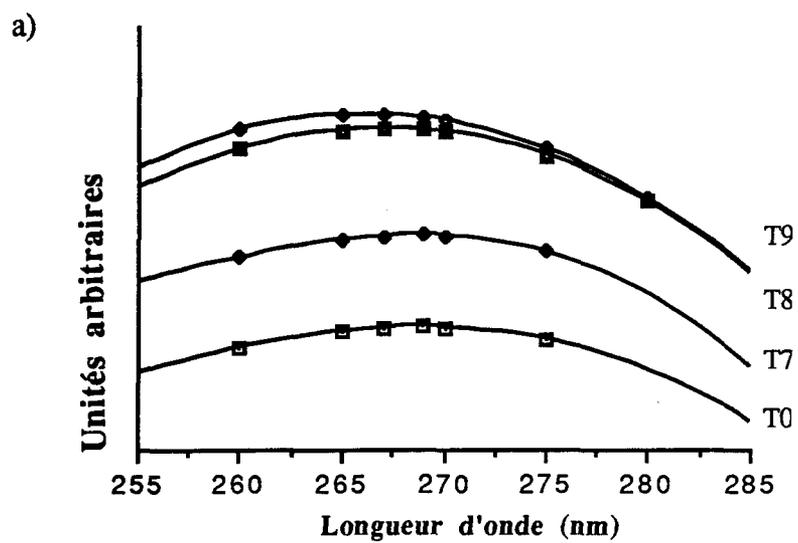


Figure 29 : Comparaison de spectres UV de la lignine de Klason biotransformée entre 0 et 188 heures.



Légende:

Temps de fermentation

T₀: 0 Hre

T₇: 212 Hres

T₈: 238 "

T₉: 266 "

Figure 30: Comparaison de spectres UV de la lignine de Klason biotransformée à partir de 212 heures.

3.5 Interprétation des RMN du carbone-13 et FAB/MS

3.5.1 Généralités

Les échantillons obtenus ont été analysés par RMN du carbone-13 selon la méthode CP/MAS (Cross Polarization/ Magic Angle Spinning) et par FAB/MS (Fast Atom Bombardment/ Mass Spectroscopy) en phase solide. La technique désignée pour l'analyse de substances solides en RMN du carbone-13 (Résonance magnétique nucléaire) consiste à éliminer l'anisotropie des déplacements chimiques occasionnant des bandes larges. Dans le cas d'un solide, la contribution de l'anisotropie au déplacement chimique est exprimée selon une équation comportant un facteur $(3 \cos^2\theta - 1)/R^3$ où θ est l'angle entre la liaison considérée et le champ appliqué (Abraham, R.J., 1988).

Pour l'analyse en phase solide, la molécule subit une rotation rapide à un angle de $54^\circ 44'$ (angle magique du spin; Magic Angle Spinning) par rapport au champ magnétique d'où l'obtention d'une anisotropie nulle ($3 \cos^2 \theta - 1 = 0$). En utilisant les techniques de découplage dipolaire, la rotation à l'angle magique et la polarisation croisée, celles-ci permettent de produire des spectres RMN de solides à haute résolution (Abraham, R.J., 1988; Hachey, J.-M., 1992).

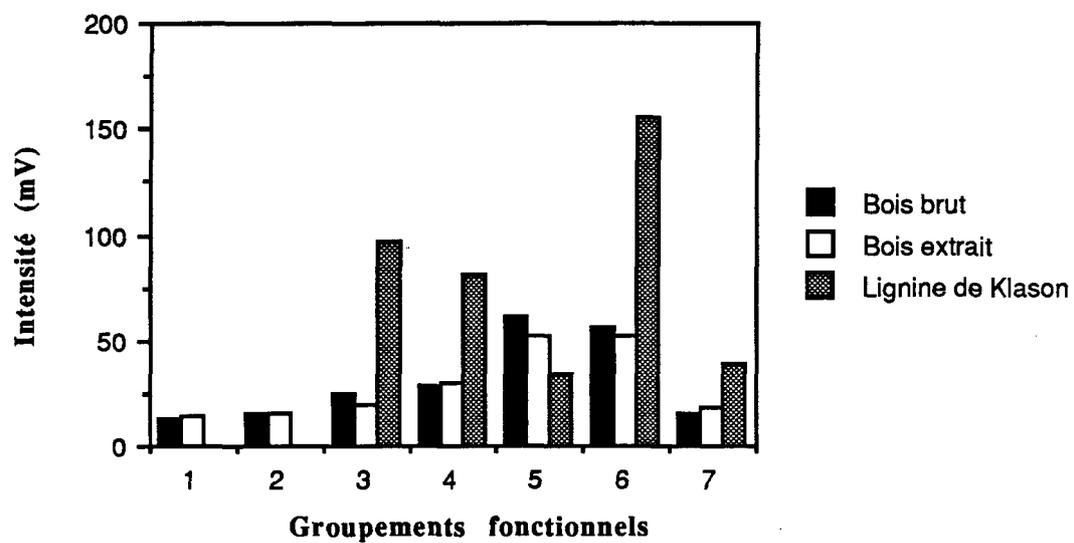
Les spectres obtenus par RMN du carbone-13, en phase solide, ont été interprétés à l'aide d'un logiciel conçu de manière à faire ressortir la position des carbones dans différentes unités phénylpropanoïdes de la lignine (Larouche, R. et al,

1991). Ce système informatique fait référence à tous les déplacements chimiques rapportés dans la littérature pour diverses lignines ou molécules modèles. Cette base de données permet de retrouver facilement des unités de bases spécifiques à notre échantillon de lignine.

3.5.2 Distribution des groupements fonctionnels

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du carbone-13 permet l'identification des différents types d'unités associées au carbone par les déplacements chimiques spécifiques variant de 0 à 250 ppm. Les différents groupements fonctionnels caractéristiques de la lignine sont représentés dans des régions précises. La compilation des données RMN conduit à une distribution des déplacements chimiques selon sept (7) régions se différenciant par la nature des carbones retrouvés dans la molécule.

Les régions sélectionnées ont été divisées comme suit: la région des aldéhydes et cétones (203 à 184 ppm); les acides carboxyliques (183 à 159 ppm); les carbones aromatiques quaternaires (158 à 125 ppm); les carbones aromatiques tertiaires (124 à 107 ppm); les carbones aliphatiques tertiaires oxygénés (106 à 58 ppm); les groupements méthoxyles reliés aux carbones aromatiques (57 à 54,5 ppm) et finalement, les carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés comprenant les carbones de type β (< 54,5 ppm) dans les unités β -5' et les unités β - β' (Figure 31). Cette compilation, des groupements fonctionnels, est basée sur les études antérieures de Sjöholm, R. *et al.*, 1992 et de Robert, D. et Chen, C.L., 1989.



Légende:

- 1- Aldéhydes et cétones (203-184 ppm)
- 2- Acides carboxyliques (183-159 ppm)
- 3- Carbones arom. quaternaires (158-125 ppm)
- 4- Carbones arom. tertiaires (124-107 ppm)
- 5- Carbones aliphatiques oxygénés (106-58 ppm)
- 6- Carbones arom. méthoxyles (57-54,5 ppm)
- 7- Carbones aliphatiques non-oxygénés (<54,5)

Figure 31: Représentation des différents groupements fonctionnels reliés à la spectrométrie RMN du carbone-13.

Les trois types d'échantillons analysés par RMN du carbone-13 sont issus de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss. Les échantillons se différencient par les étapes de préparation: l'un se compose de bois brut (Figure 32), ensuite celui de bois extrait (Figure 33) et l'autre, de la lignine de Klason (Figure 34). Ces trois (3) échantillons présentent des similitudes lors de l'interprétation de l'ensemble des signaux. Les différences majeures observées correspondent à la présence de fonctions cellulosiques et d'hémicelluloses dans les échantillons de bois brut et extrait (Zech, et al, 1987; Sjöström, R. et al, 1992).

La Figure 31 montre les caractéristiques importante attendues: l'intensité relative des carbones aromatiques et des méthoxyles (CH_3O) est beaucoup plus grande dans le cas de la lignine de Klason que pour les deux (2) autres échantillons.

Il est à souligner que l'intégration quantitative selon la méthode de découplage inverse (Inverse Gate Decoupling, IGD) n'est pas admise sans en reconnaître les limites (Sjöholm, R. et al, 1992). La RMN quantitative du carbone-13 continue d'être un champ de recherche très actif¹.

1- Dr. Minh Tan Phan Viet, Université de Montréal, Communication privée (1992).

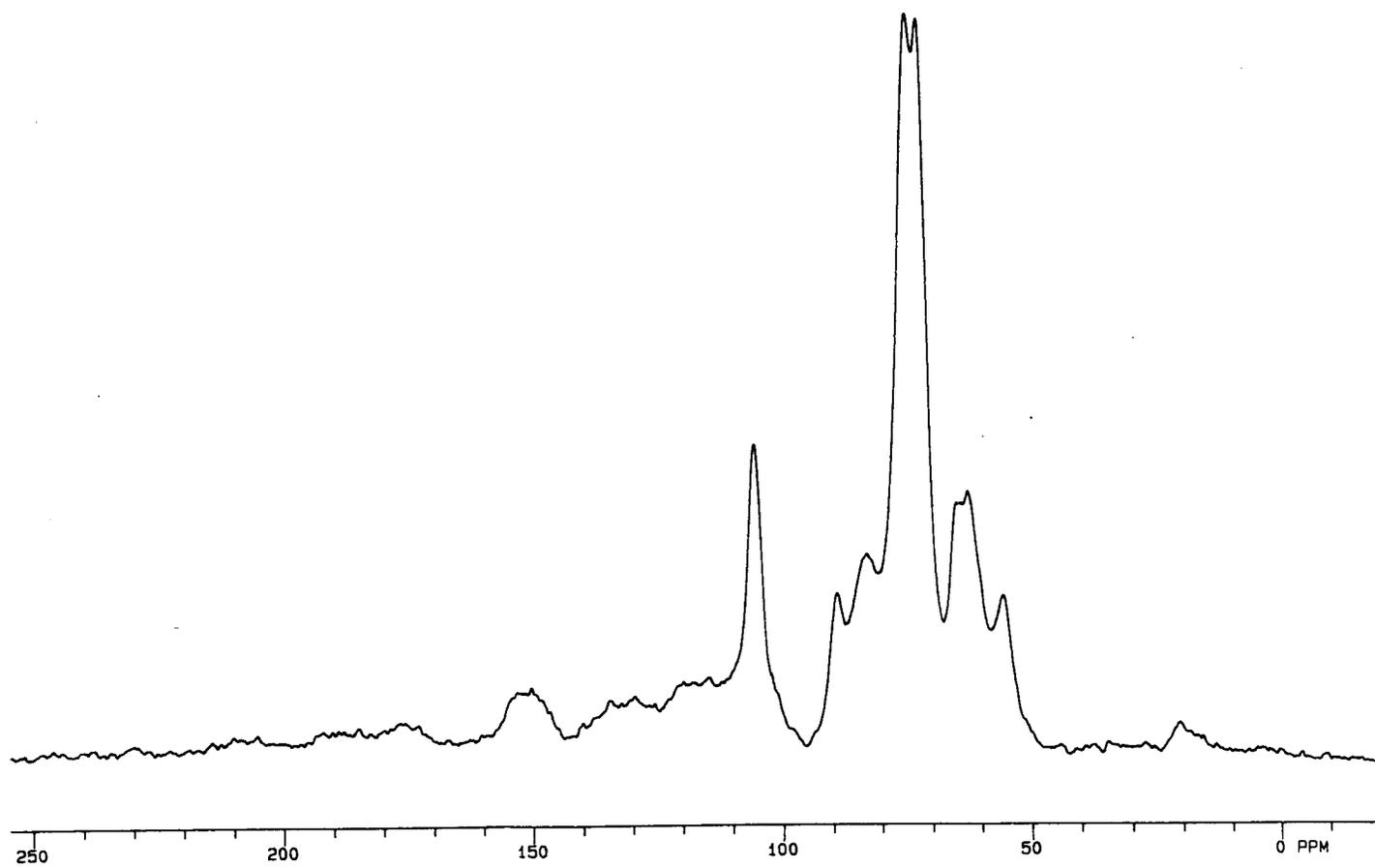


Figure 32: Spectre RMN du carbone-13 du bois brut.

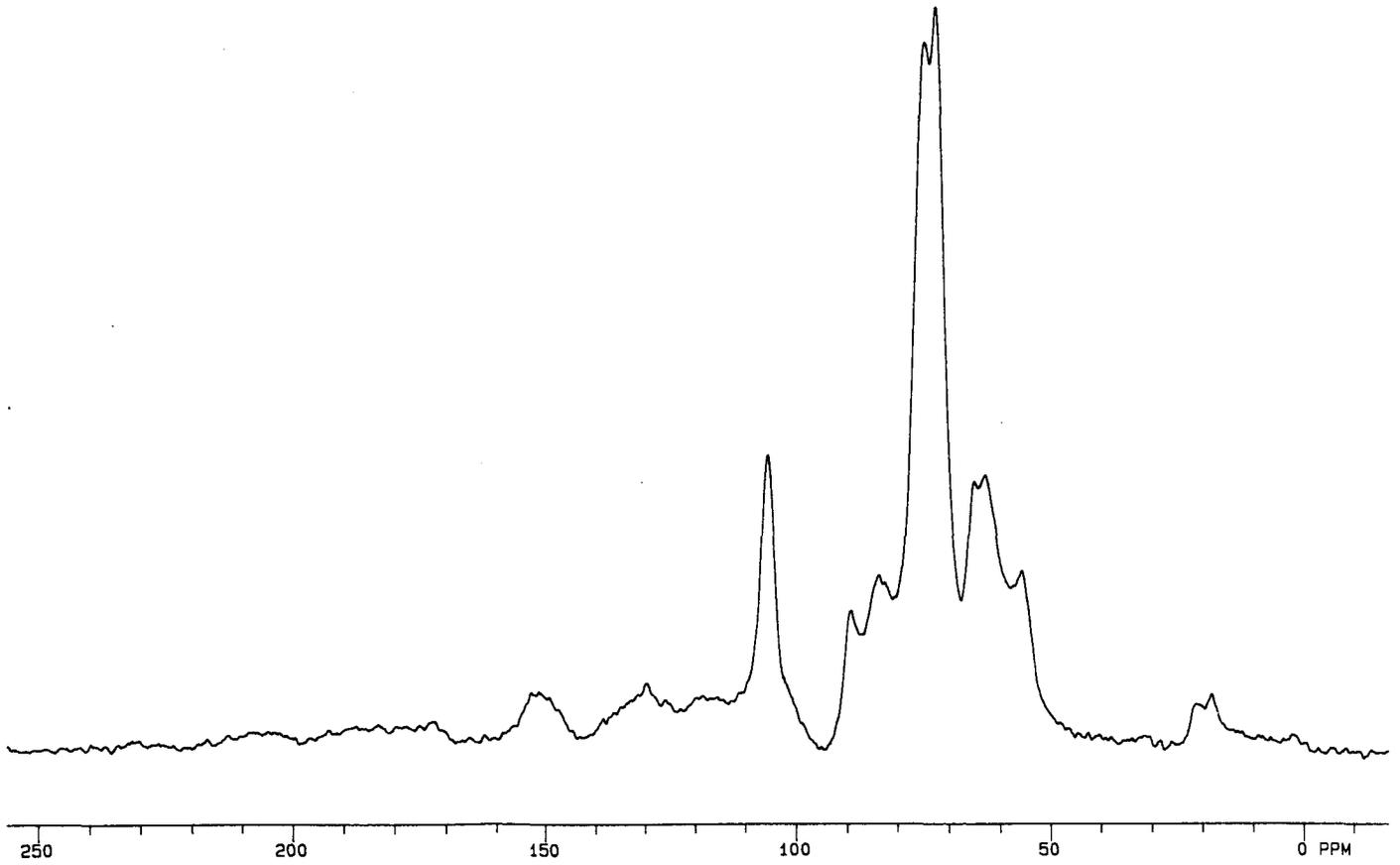


Figure 33: Spectre RMN du carbone-13 du bois extrait.

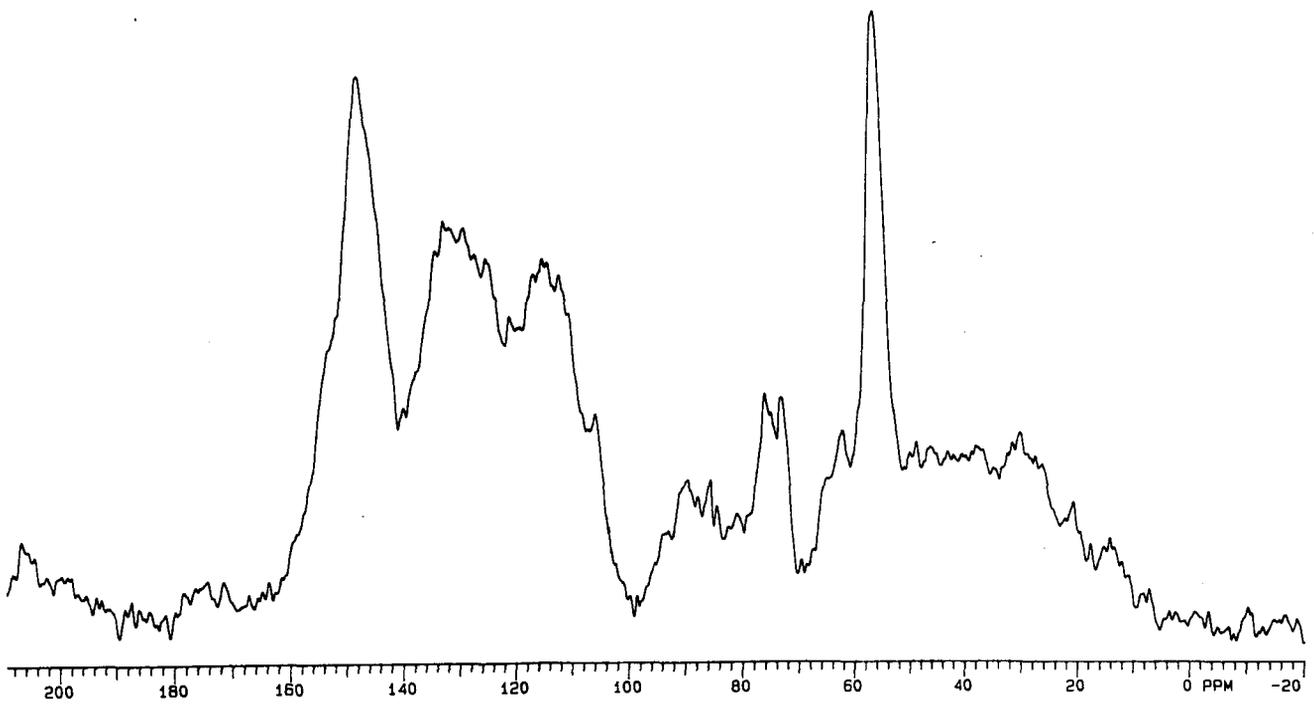


Figure 34: Spectre RMN du carbone-13 de la lignine de Klason.

3.5.2.1 Aldéhydes et cétones

Les fonctions aldéhydes et cétones se retrouvant dans les modèles de lignines, donnent des déplacements chimiques variant de 203 à 184 ppm. Les fonctions aldéhydes et cétones sont également présentes dans les deux (2) échantillons de bois brut et extrait et ce, sensiblement dans les mêmes proportions, sauf que l'échantillon de lignine de Klason ne renferme que des traces (Tableau XII). D'après (Kringstad, K.P. et Mörck, R., 1983), une interprétation de ces groupements fonctionnels permet de suggérer la présence d'une fonction aldéhyde ou cétone sur le carbone en position alpha. Les déplacements chimiques rapportés dans le Tableau XIII réfère à la référence 1 figurant en Annexe.

3.5.2.2 Acides carboxyliques

Les groupements fonctionnels d'acides carboxyliques retrouvés dans les échantillons de bois brut, de bois sans extractibles et de lignine sont observés dans la région variant de 184 à 159 ppm (Tableau XIV). Les intensités des déplacements chimiques obtenues par RMN du carbone-13 permettent l'estimation de la très faible proportion d'acide carboxylique comprise dans l'échantillon de la lignine de Klason. Comparativement aux échantillons de bois brut et de bois sans extractibles, l'intensité de ceux-ci est plus élevée. Les résultats énoncés au tableau XV implique la présence d'acides résiniques ainsi que des acides carboxyliques présents dans les échantillons de

TABLEAU XII

Déplacements chimiques observés en
RMN du carbone-13 de
l'épinette blanche (203-184 ppm)

(aldéhydes et cétones conjugués $>C=O$).

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
01	203.637	—	—	20.88
02	202.613	—	14.060	—
03	199.308	13.693	14.634	—
04	184.846	—	13.419	—
05	184.749	—	13.403	—

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
Extrait: Bois brut sans extractible
Lignine: Lignine de Klason
---- : Intensité inférieure à 10

TABLEAU XIII

Interprétation des spectres
de résonance magnétique nucléaire du carbone-13
de l'épinette blanche (203-184 ppm)

(aldéhydes et cétones conjugués $>C=O$).

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
01	203.637		—
02	202.613		—
03	199.308	1	C- α du composé no. 36
04	184.846		—
05	184.749		—

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
Extrait: Bois brut sans extractible
Lignine: Lignine de Klason
---- : Intensité inférieure à 10

* Les composés numérotés sont rapportés dans l'Annexe.

TABLEAU XIV

Déplacements chimiques observés en
RMN du carbone-13 de
l'épinette blanche (183-159 ppm)

(acides carboxyliques -COOH)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
01	182.686	—	14.848	—
02	182.027	—	14.794	—
03	181.347	—	13.910	—
04	180.715	—	13.747	—
05	179.500	—	14.254	—
06	178.722	—	14.281	—
07	178.214	—	13.762	—
08	177.593	—	14.607	—
09	176.659	14.246	—	—
10	175.952	—	15.288	—
11	174.056	—	18.123	—
12	174.202	15.608	—	—
13	173.208	—	18.123	—
14	172.771	16.476	—	—
15	172.430	—	17.496	—
16	172.160	—	17.582	—
17	171.700	14.780	17.543	—
18	171.118	—	17.788	—
19	169.271	—	15.874	—
20	168.251	—	13.503	—
21	166.182	—	14.092	—
22	164.287	—	16.026	—

TABLEAU XIV (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
23	161.738	---	13.403	---
24	161.613	---	13.416	---
25	161.273	---	13.415	---
26	161.127	---	13.456	---
27	159.086	---	17.759	---

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
 Extrait: Bois brut sans extractible
 Lignine: Lignine de Klason
 ---- : Intensité inférieure à 10

TABLEAU XV

Interprétation des spectres
de résonance magnétique nucléaire du carbone-13
de l'épinette blanche (183-159 ppm)

(acides carboxyliques -COOH)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation *
01	182.686	5	C-O-Me, aliphatique COOH
02	182.027		—
03	181.347		—
04	180.715	14	C=O dans l'unité quinones
05	179.500		—
06	178.722		—
07	178.214		—
08	177.593		—
09	176.659	10	CO (esters aliphatique ou acetyl), C-6 des acides uroniques, C- γ de l'acide cinnamique & esters
10	175.952	2	Composé. carboxylique
11	174.056	1	Comp. 22 & 27,
		12	aliphatique R-COOH
12	174.202	1	Composé 21
		8	C=O dans -C-C(-OH)-COOH
13	173.208	1	C-Beta (no. 18) et C- γ (no. 28) COOH (guaiacyl-CHOH-COOH)
14	172.771	1	C-Beta (no. 17)
15	172.430	1	C-Beta (no. 19)
16	172.160	1	C-Beta (no. 17)
17	171.700	8	C=O in -R-O-CH ₂ COOH et C=O in R-CH ₂ -CH ₂ COOH
18	171.118	6	Carbonyl primaire CO
		10	CO des esters aliphatiques ou acétyls, C-6 de l'acide uronique, C- γ de l'acide cinnamique & esters

TABLEAU XV (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
19	169.271	6	Carbonyl CO
20	168.251	1	C- γ (no. 31)
21	166.182	10	CO des esters aliphatiques ou acetyls, C-6 de l'acide uronique, C- γ de l'acide cinnamique & esters
22	164.287	—	—
23	161.738	10	C-4 de l'unité p-coumaryl étherifié ou non substitué et carbonyl CO
24	161.613	4	Esters p-hydroxybenzoïques en C-4
25	161.273	—	—
26	161.127	—	—
27	159.086	9	Groupement méthoxyl aromatique en C-1

Légende :

Brut:	Bois brut (avec extractible)
Extrait:	Bois brut sans extractible
Lignine:	Lignine de Klason
---- :	Intensité inférieure à 10

* Les composés numérotés sont rapportés dans l'Annexe.

bois brut et de bois extrait. Cette affirmation permet de d'énoncer que les extractibles contenus dans le bois ont été éliminés suite à l'extraction de la lignine de Klason.

3.5.2.3 Composés aromatiques

Les carbones liés aux composés aromatiques se retrouvent dans la région de 158 à 107 ppm. Les carbones aromatiques comprennent deux (2) grandes catégories: les carbones aromatiques de type quaternaire et de type tertiaire.

Les carbones aromatiques quaternaires se retrouvent dans l'intervalle de déplacements chimiques de 158 à 125 ppm (Tableau XVI). L'échantillon de lignine de Klason présente des déplacements chimiques de même type que les deux (2) autres échantillons et contribue à la présence de nombreuses unités dimériques de type β -O-4' et β -5' (Hassi, H.Y. *et al*, 1987). L'unité guaiacyl demeure un élément majeur dans l'interprétation des carbones aromatiques quaternaires (Tableau XVII). Le spectre de la lignine présente une intensité relative de deux (2) à trois (3) fois plus intense que le spectre de bois brut et de bois extrait. Cette forte intensité permet de différencier la lignine d'un échantillon de bois non traité.

Concernant les carbones aromatiques tertiaires, ils sont observés dans la région variant de 125 à 107 ppm (Tableau XVIII). Les résultats obtenus à partir des trois (3) types d'échantillons ont tendance à refléter la distribution des carbones aromatiques quaternaires. Le spectre de la lignine de Klason présente des intensités deux (2) fois plus fortes que les spectres de bois brut et de bois sans extractibles. Après interprétation

TABLEAU XVI

Déplacements chimiques observés en
RMN du carbone-13 de
l'épinette blanche (158-125 ppm)

(carbones aromatiques quaternaires)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
01	156.753	19.242	—	—
02	155.954	—	25.950	—
03	153.767	—	33.602	—
04	153.156	—	34.704	—
05	152.454	30.615	—	—
06	152.163	—	37.642	—
07	151.300	29.561	37.641	78.843
08	150.607	—	35.684	—
09	150.143	33.941	—	—
10	149.219	32.899	—	—
11	149.003	—	37.189	—
12	148.420	33.718	—	—
13	148.274	—	35.574	—
14	147.275	31.607	34.527	140.00
15	145.310	24.897	—	—
16	143.657	19.782	22.754	—
17	142.609	—	20.891	—
18	141.664	16.175	20.933	—
19	141.373	—	20.880	—
20	140.644	15.878	—	—

TABLEAU XVI (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
21	139.526	18.608	—	55.225
22	138.651	—	25.878	—
23	138.138	—	24.988	—
24	137.409	21.335	—	—
25	136.583	21.459	—	—
26	136.415	—	26.034	—
27	135.562	23.709	28.833	—
28	134.860	22.452	—	—
29	133.877	—	—	95.193
30	133.472	26.379	29.731	—
31	132.451	27.954	—	102.631
32	131.350	—	—	101.122
33	130.896	25.258	—	100.513
34	130.280	—	—	98.283
35	130.021	—	34.417	—
36	129.584	23.833	—	97.575
37	128.806	—	31.473	100.77
38	128.725	—	—	100.798
39	128.000	23.954	30.739	96.81
40	127.861	22.624	—	—
41	126.500	—	26.989	94.129
42	126.208	—	26.778	—
43	126.063	24.162	—	—
44	125.528	—	26.091	—

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
 Extrait: Bois brut sans extractible
 Lignine: Lignine de Klason
 ---- : Intensité inférieure à 10

TABLEAU XVII

Interprétation des spectres
de résonance magnétique nucléaire du carbone-13
de l'épinette blanche (158-125 ppm)

(carbones aromatiques quaternaires)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation *
01	156.753	8	C-4 des unités aromatiques
02	155.954	14	C-4 des unités aromatiques
03	153.767	1 2	C-4 (no. 36) Carbones aromatiques oxygénés en C-3 et C-4 pour le guaïacyl
04	153.156	1 9 13	C-4 (no. 49) C-3- dans guaïacyl C-3 dans les unités étherifiées et les unités 5-5' C-4 dans l'unité β -O-4' étherifiées C-5 dans les unités étherifiées
05	152.454	9 10 14	C-4- dans l'unité β -O-4' du comp.19, 20, 21 C-3 de l'unité β -O-4' du comp.23, 24, 26 C-3 de l'alcool coniféryl et C-3/5 dans l'unité sinapyl étherifié C-3/C-5 de l'unité 4-O-5'
06	152.163	4	C-3 et C-5 dans les unités syringyls étherifiées
07	151.300	6 8	C- α dans Ga-3 (a-OAc) C-4 dans unités guaïacyls étherifiées avec group. C=O
08	150.607	1	C-4 dans (no. 51)
09	150.143	1	C-3 (no. 5) et C-4 (no. 8,14,45)
10	149.219	1 4 9 14	C-3 (no. 43 et 48) Unités guaïacyls étherifiées en C-3 C-3 de l'unité β -5' du comp.29 et 32 Unité guaïacyl étherifié en C-3

TABLEAU XVII (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
11	149.003	1 8,12 9	C-3 dans (no.45) C-3 des unités guaiacyls étherifiés C-3 de l'unité monomérique du composé 11
12	148.420	1	C-3 (no. 47 et 9)
13	148.274	1 6 9	C-3 dans (1, 30, 33, 38, 40) C-4 de l'unité guaiacyl de type β -O-4' (erythro) C-3 et C-4 de l'unité syringyl des comp. 4 et 5
14	147.275	1 9 14	C-3 dans (9 et 58) C-4 de l'unité β -O-4' du comp. 20 C-3 de l'unité guaiacyl non-étherifié
15	145.310	4 9	unités guaiacyles non-etherifiées en C-4 C-4 de l'unité monomérique du composé 10
16	143.657	9	C-4 de l'unité β -5' du comp. 27
17	142.609	1 9	C-4 dans (no. 9) C-1 de l'unité monomérique du composé 4,
18	141.664	1	C-1 de l'unité no. 12 et C-4 de l'unité no.52
19	141.373	1	C-4 dans (no. 53)
20	140.644	1 6	C-4 dans (no. 55), unité guaiacyl
21	139.526	12	C-4 de l'unité guaiacyl
22	138.651	1 9	C-1 dans (no. 20), C-1 de l'unité monomérique du composé 10
23	138.138	1 9 14	C-1 de l'unité guaiacyl du composé no. 29 C-1 dans l'unité β -O-4' du composé no. 18 C-1 de l'unité α -ar, unité guaiacyl
24	137.409	10	C-1 de l'alcool coniféryl (ar-CHO ou ar-CH ₂ R)
25	136.583	1 6	C-1 dans (no. 8) et C- α de l'unité guaiacyl acétyl
26	136.415	6	C-1 de l'unité coniféryl lié à α -CHO ou α -CH ₂ R, C-4 de l'unité sinapyl et l'unité phénylcoumarane

TABLEAU XVII (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation *
27	135.562	9	C-1 de l'unité monomérique du comp. 6, C-4 de l'unité β -O-4' du comp. 26 et C-5 de l'unité β -5' du comp. 30
28	134.860	4 9	C-1/4 dans l'unité guaiacyl et C-4 dans l'unité β -O-4' du comp. 21,25.
29	133.877	1	C-1 dans (no. 7, 45 et 8)
30	133.472	1 9	C-1 dans (no. 57), C-5 dans l'unité β -5' du composé no. 27 C-5 dans l'unité β -5' du composé no. 28 C-1 dans l'unité β -O-4' du composé no. 19
31	132.451	1 9	C-1 dans (no. 27 et 46), C-1 dans l'unité β -5' du composé no. 28
32	131.350	1 4 9 12	C-1 dans (no. 21), C2/C6 des liaisons esters, C-1 dans l'unité β -5' du composé no. 29 C-2/C-6 de l'unité guaiacyl étherifié et non-étherifié
33	130.896	1	C-1 de l'unité no. 16 et 24
34	130.280	1 7 9	C-1 de l'unité no. 38, C-1 dans phénylcoumarane, C-1 dans l'unité β -O-4' du composé no. 16
35	130.021	1 6 9	C-1 dans comp. 34 C-1 de l'unité phénylcoumarane C-1 de l'unité β -O-4' du comp. 21, 25
36	129.584	10 1 10 14	C- α du C-2/6 de l'alcool p-coumaryl insaturé en α , β C-1 du comp. (4, 33) C-2/C-6 de l'alcool p-coumaryl et C- β de l'alcool cinnamyl C- β dans l'unité Ar-CH=CH-CHO

TABLEAU XVII (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation *
37	128.806	1	C-1 du comp. 11, 48
		5	C- α /C-2 de l'unité guaïacyl-CH=CH et C-6 de l'unité para-hydroxyphenyl
		6	C-1 de l'unité phénylcoumarane
		7	C-2 de l'unité p-hydroxyphenyl et C- β de l'alcool cinnamyl
		10	C- β de l'unité p-coumaryl et C-2/6 de l'alcool cinnamyl
		12	C-2/C-6 aromatique
38	128.725	1	C-4 de l'unité β -O-4' du comp.11
		5	C- α /C-2 de l'unité guaïacyl-CH=CH et C-6 de l'unité p-hydroxyphényl,
		6	C-1 Phénylcoumarane,
39	128.000	10,12	C-2/6 de l'unité p-coumaryl et C- β dans l'alcool cinnamyl
		1	C-1/C-4 de l'unité du comp. 44 et 29,
40	127.861	8	C- α /C- β dans l'unité aromatique -CH=CH-CH ₂ OH,
		9	C-3 de l'unité monomérique du comp. 4 et 9,
41	126.500	1	C-5 du 12, C-4 du 26, C-1 du 31, C- β du 35,
		9	C-6 du 51, C-1 du 54, C-5 du 56.1, C-3 du composé no. 9
42 29	126.208	1	C-1/C-4 du comp. no. 30 et 19
		9	C-2/C-4 de I-CH ₂ OH et I-CHOH-CH ₃
43	126.063	1	C-1 du comp. 17, C-2 du comp.28 et 40, C-4 du comp.
		8	C-5 du comp. 52 et 53 et C-alpha du comp. 37
		9	C-4/C-5/C-6 des comp. no. 28, 52, 5,
44	125.528	8	C-5/C-5' des unités 5-5' non étherifiés
		9	C-1 de l'unité β -O-4' du comp. 25
		1	C-6 du comp. 6

Légende :

Brut:	Bois brut (avec extractible)
Extrait:	Bois brut sans extractible
Lignine:	Lignine de Klason
---- :	Intensité inférieure à 10

* Les composés numérotés sont rapportés dans l'Annexe.

TABLEAU XVIII

Déplacements chimiques observés en
RMN du carbone-13 de
l'épinette blanche (124-107 ppm)

(carbones aromatiques tertiaire)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
01	124.966	23.452	---	93.206
02	124.361	---	27.386	91.984
03	122.271	---	29.084	---
04	123.557	26.503	---	---
05	123.184	---	---	83.425
06	121.154	27.186	31.047	---
07	120.706	---	---	78.572
08	119.377	29.118	27.918	75.619
09	119.102	---	---	75.548
10	118.859	---	---	75.872
11	118.616	---	---	75.639
12	118.286	28.069	31.407	---
13	117.654	28.770	31.013	---
14	116.585	29.408	31.795	89.199
15	115.294	30.981	31.145	---
16	114.873	---	---	93.255
17	114.079	29.277	---	92.186
18	113.863	---	29.977	---
19	113.172	---	---	86.449
20	112.978	---	---	86.326
21	112.232	28.481	---	---
22	111.930	---	---	88.968
23	111.697	---	---	85.120
24	111.309	28.864	32.963	---
25	110.580	28.870	31.577	---
26	110.180	---	---	79.217

plus spécifique (Tableau XIX), les unités retrouvés sont de même type que ceux décrit pour les carbones aromatiques quaternaires et ceux-ci sont en grande majorité des carbones issus des unités dimériques de type β -O-4' et β -5'

3.5.2.4 Carbones aliphatiques oxygénés

Les groupements fonctionnels des carbones aliphatiques oxygénés renferment les fonctions cellulosiques et hémicellulosiques et représentent environ 68,8 % de la matière végétale séchée (Mullins, E.J. et McKnight, T.S., 1981). Suite aux analyses spectroscopiques RMN du carbone-13, les déplacements chimiques reliés à la cellulose et aux hémicelluloses observés varient de 108 à 58 ppm. Concernant les échantillons de bois brut et de bois sans extractibles, de fortes intensités s'observent pour les déplacements chimiques à 72 et 75 ppm (Tableau XX). L'interprétation de ces signaux permettent de suggérer la présence de groupements cellulosiques de types D-hexopyranoses (β -glucose, β -tallose), D-pentapyranoses (β -xylose), D-hexofuranoses (α -gallose) et D-hexopyranoses (β -altrose) (Bock, K. et Pedersen, C., 1983).

L'interprétation décrite au Tableau XXI reliée à cette région permet de proposer la présence de groupements hémicellulosiques et cellulosiques. Et pour les groupements hémicellulosiques, les monosaccharides retrouvés dans les deux échantillons de bois (celui de bois brut et celui de bois sans extractibles), sont en majorité des pyranoses et des furanoses. Les résultats obtenus sont en accord avec les interprétations présentées antérieurement (Arnaud, P., 1983; Taylor, et al, 1983).

TABLEAU XIX

Interprétation des spectres
de résonance magnétique nucléaire du carbone-13
de l'épinette blanche (124-107 ppm)

(carbones aromatiques tertiaire)

No.	Dépl. chim. Signal (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
01	124.966	1 5	C-5 dans (no.51) C- α de l'unité guaiacyl-CH=CH C-2 de l'unité catécol
02	124.361	5	C-5 et C-alpha dans (no.41 et 38)
03	122.271	1 9	C-1 dans (no.14), C-6 dans (18 et 38), C-1 de l'unité syringyl du comp. 5, 6
04	123.557	1 8 9 14	C-6 dans (no.48) C-6 dans l'unité acide vanillique C-1 de l'unité syringyl, C-6 dans l'unité β -O-4' des comp. 19,20,21 C-6 dans l'unité guaiacyl with a-CO
05	123.184	1 9	C-6 dans (no.24), C-1 dans l'unité β -O-4' du composé no. 21
06	121.154	1 9	C-6 des unités 3, 32, 44, 46, 48, 59, C- β du composé 41 C-1 de l'unité syringyl du comp. 4
07	120.706	1	C-6 dans (no. 12),
08	119.377	1 4 9	C-6 dans (8, 27, 34, 58), C-6 de l'unité guaiacyl C-6 de l'unité monomérique no.5, de l'unité β -5' du composé no. 27 et de l'unité β -5' du composé no. 30
09	119.102	1 6 9	C-1 dans (no. 40), C-6 dans (no. 42, 57), C-6 dans (test) β -aryl ether (erythro-2) et (test) β -aryl ether C-6 de l'unité no.6 et dans l'unité β -O-4' du comp no. 19

TABLEAU XIX (suite)

No.	Dépl. chim. Signal (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
10	118.859	1 6 9 14,15	C-6 dans (no. 9), C-5,6 de l'unité guaïacyl C-6 dans l'unité β -5' du composé no. 28 C-6 dans l'unité β -5' du composé no. 19 C-6 et C-5 de l'unité guaïacyl
11	118.616	9	C-6 dans l'unité β -5' du composé no. 31, C-6 dans l'unité β -O-4' du composé no. 20, 24
12	118.286	9	C-1 de l'unité syringyl
13	117.654	6	C-5 et C-6 de l'unité phenylcoumarane et guaïacyl
14	116.585	1	C-5 dans (no.48),
15	115.294	1 4 9	C-5 dans (no.44) C-5 du guaïacyl et C-3 de l'unité ester, C-5 de l'unité monomérique no. 5, 10, C-6 dans l'unité β -5' du composé no. 30 C-5 dans l'unité β -O-4' du composé no. 19
16	114.873	1 9 14	C-5 dans (no. 18) C-2 de l'unité guaïacyl du comp. 2, 3 C-5 dans l'unité guaïacyl
17	114.079	1 6 9	C-2 dans (no. 13,16,46,48et 59) C-5 dans β -aryl ether (threo-1), C-5 dans l'unité β -O-4' du composé no. 16
18	113.863	1 6 9	C-2 dans (3, 14, 44 et 45), C-5 dans (no. 6, 57), C-8 dans (no. 26) et C-6 dans (no. 58), C-2 du guaïacyl lié au carbonyle (C=O) C-2/6 du méthoxyl aromatique du comp. 2 et C-5 dans l'unité β -O-4' du comp.no. 15
19	113.172	1 9	C-2 dans (no.15), C-2 dans l'unité β -O-4' du composé no. 15 et no. 17 C-5 du monomère no.12, C-5 dans l'unité β -5' du composé no. 19 et de l'unité β -O-4' du composé no. 20
20	112.978	1 9	C-2 dans (no. 46), C-5 dans l'unité β -O-4' du comp. 16, 24

TABLEAU XIX (suite)

No.	Dépl. chim. Signal (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
21	112.232	1	C- α en no.42, C-2 dans (no. 12,25 et 30), C-5 dans (no.5)
		2	C-2,5,6 du noyau guaïacyl
		9	C-5 dans l'unité β -5' du composé no. 31
22	111.930	1	C-2 de (no.24,31,36,47 et 49),
		9	C-5 de l'unité monomérique du comp. 6, 11 et
		15	C-2 de l'unité guaïacyl
23	111.697	1	C-2 dans (no. 5),
		4,12	C-2 de l'unité guaïacyl
24	111.309	1	C-2 dans (5, 54, 56 et 58),
		9	C-2 de l'unité monomérique no. 6,
25	110.580	9	C-2 dans l'unité β -5' du composé no. 30 et 31,
			C-2 dans l'unité β -O-4' du composé no. 15 et 20
26	110.180	1	C-2 de l'unité no. 9 et
		9	C-2 dans l'unité β -5' du composé no. 28

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
 Extrait: Bois brut sans extractible
 Lignine: Lignine de Klason
 ---- : Intensité inférieure à 10

* Les composés numérotés sont rapportés dans l'Annexe.

TABLEAU XX

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

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
01	107.993	—	—	53.390
02	107.096	—	—	49.244
03	106.951	—	—	49.253
04	106.709	—	—	53.108
05	105.525	—	93.307	52.884
06	105.163	90.160	—	—
07	103.791	—	—	26.351
08	103.354	—	—	23.625
09	103.170	—	—	20.453
10	102.392	39.450	35.099	—
11	102.198	39.585	34.974	—
12	101.761	38.073	—	—
13	100.956	—	31.805	—
14	99.282	—	26.574	—
15	99.087	—	26.563	—
16	98.067	21.726	—	—
17	97.629	—	21.469	—
18	96.463	—	20.784	—
19	95.512	16.084	18.614	—
20	94.421	17.148	19.268	—
21	94.227	—	19.260	—
22	93.714	17.447	—	—
23	93.449	17.305	—	22.041
24	92.526	—	21.696	22.692

TABLEAU XX (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
25	89.415	—	52.275	35.755
26	89.269	—	52.225	—
27	88.999	48.838	—	33.131
28	88.628	—	—	31.382
29	85.468	—	—	35.848
30	84.274	—	—	28.992
31	84.090	—	58.760	—
32	83.486	57.495	58.166	20.406
33	82.244	—	55.874	23.654
34	81.028	51.865	57.294	—
35	80.850	—	—	26.879
36	80.413	—	—	26.020
37	79.004	—	—	26.469
38	75.796	—	—	58.326
39	74.931	177.824	176.216	—
40	74.678	—	—	53.262
41	72.571	180.301	170.000	57.425
42	64.822	—	55.795	36.123
43	65.086	61.065	—	—
44	62.705	65.824	58.368	—
45	61.944	—	—	48.623
46	58.892	—	41.169	—
47	58.066	—	42.246	—

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
 Extrait: Bois brut sans extractible
 Lignine: Lignine de Klason
 ---- : Intensité inférieure à 10

TABLEAU XXI

Interprétation des spectres
de résonance magnétique nucléaire du carbone-13
de l'épinette blanche (107-58 ppm)

(carbones aliphatiques oxygénés)

No.	Dépl. chim. Signal (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
01	107.993		---
02	107.096	9	C-2 dans l'unité β -O-4' du composé no. 23, 24, 25 et 26
03	106.951	9	C-2 dans l'unité β -O-4' du composé no. 23, 24, 25 et 26
04	106.709	9	C-2 dans l'unité β -O-4' du composé no. 23, 24 et 26
05	105.525	5	C-2/6 de l'unité syringyl
06	105.163	5,11,15	C-2/6 de l'unité syringyl
07	103.791	9	C-2 de l'unité monomérique du comp. no.8, C-2 dans l'unité β -O-4' du composé no. 17, 18, 22 et 24,
		16	C-1 du D-hexofuranoses (β -glucose),
08	103.354	11	C-2/6 de l'unité syringyl,
09	103.170	5	C-2/6 de l'unité syringyl,
10	102.392	5	C-2 de l'unité syringyl,
		16	C-1 du D-hexofuranoses (α -altrose),
11	102.198	5	C-2 de l'unité syringyl,
		11	unités d'hydrates de carbone,
		16	C-1 du D-hexofuranoses (α -altrose),
12	101.761	11	unités d'hydrates de carbone,
		16	C-1 du D-hexofuranoses (β -allose, β -gallose),
13	100.956	5	C-1 des hydrates de carbone
14	99.282		---
15	99.087		---
16	98.067		---
17	97.629	16	C-1 de l'unité D-pentopyranoses (α -arabinose et β -xylose)
18	96.463	16	C-1 de l'unité. D-hexopyranoses (β -glucose)
19	95.512	16	C-1 de l'unité. D-hexopyranoses (α -tallose)
20	94.421	16	C-1 de l'unité D-hexopyranoses (β -allose, β -gulose, β -mannose, α -ribose)

TABLEAU XXI (suite)

No.	Dépl. chim. Signal (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
21	94.227	16	C-1 de l'unité D-hexopyranoses (β -allose) et D-pentopyranoses (α -ribose)
22	93.714	16	C-1 de l'unité D-hexopyranoses (α -allose, α -gulose et β -idose)
23	93.449	16	C-1 de l'unité D-hexopyranoses (α -gallose, α -gulose et α -idose) et D-pentopyranoses (β -arabinose)
24	92.526	1 16	C- α du compose no.5, C-1 de l'unité D-hexopyranoses (β -altrose)
25	89.415	6	C- β de l'unité β -aryl éther (thréo-1)
26	89.269	6	C- β de l'unité β -aryl éther (thréo-1)
27	88.999	6	C- β de l'unité β -aryl éther (thréo-1)
28	88.628	1	C- α du compose no.50
29	85.468	1,12 16	C- β du compose no.47 et de l'unité guaïacyl en β -O-4' C-4 de l'unité D-hexofuranoses (α -allose et α -altrose)
30	84.274	1 12 16	C- β de l'unité 47, C- β du l'unité guaïacyl de type β -O-4' C-4 de l'unité D-hexofuranoses (α -allose et α -altrose)
31	84.090	16	C-4 de l'unité D-hexofuranoses (α -allose et α -altrose)
32	83.486	14	C- β de l'unité β -O-4'
33	82.244	6 16	C- β de l'unité β -aryl ether (érythro-2), C-2 de l'unité D-hexofuranoses (α -allose, β -altrose, β -gallose et β -glucose)
34	81.028	—	—
35	80.850	—	—
36	80.413	6,11,14	C- β de l'unité β -O-4'
37	79.004	—	—
38	75.796	6 16	C- β de l'unité β -aryl éther, C-5 de l'unité D-hexopyranoses (β -gallose, β -idose), C-3 de l'unité D-hexofuranoses (β -altrose)
39	74.931	3 6	C-3 du α (Methyl O-(2-hydroxypropyl)- α , β -D- glucopyranosides, C-2 du β (Methyl O-(2-hydroxypropyl)- α , β -D- glucopyranosides, C- α de l'unité β -O-4'

TABLEAU XXI (suite)

No.	Dépl. chim. Signal (δ en ppm)	Réf.	Interprétation *
39	74.931	11 12 16	unité d'hydrate de carbone C- α de l'unité β -O-4' C-2 du D-hexopyranoses (β -glucose), D-pentopyranoses (β -xylose), C-3 de l'unité D-hexofuranoses (α -gallose) et C-5 de l'unité D-hexopyranoses (β -altrose)
40	74.678	3 6,11,12 16	C-2 du β (Methyl O-(2-hydroxypropyl)- α , β -D- glucopyranosides, C-3 du α (Methyl O-(2-hydroxypropyl)- α , β -D- glucopyranosides, C- α de l'unité β -O-4', C-5 de l'unité D-hexopyranoses (β -gulose)
41	72.571	1 11 16	C- α du compose no.21, 22, 47 et C- β du comp. 46, unités d'hydrates de carbone C-2 de l'unité D-hexopyranoses (α -glucose, β -tallose,), unité D-pentopyranoses (α -xylose) et D-hexofuranoses (α -allose), C-3/5 du D-hexopyranoses (α -idose) et D-hexofuranoses (α -altrose)
42	64.822	16	C-5 de l'unité D-pentopyranoses (β -lyxose),
43	65.086	12 16	C- γ de l'unité β -5' C-4 de l'unité D-hexopyranoses (β -altrose), C-5 de l'unité D-pentopyranoses (β -lyxose)
44	62.705	1,4 8 12 14 16	C- γ du compose no. 35, 48, 49, C- β de l'unité β -1' C- γ de l'unité guaïacyl de type β -5' et β -1' C- γ de l'unité β -O-4' d'un carbonyle; c- γ de l'unité β -5' C- γ de l'unité β -5' et β -1' C-6 de l'unité D-hexopyranoses (β -altrose)
45	61.944	11 15	unité anhydroxylose unité guaïacyl de type β -O-4' C-6 de l'unité D-hexopyranoses (β -allose, β -gallose, β -glucose, α -gulose, β -idose et α , β -mannose) C-5 de l'unité D-pentopyranoses (α -xylose)
46	58.892	3	unité methoxyle de Beta (Methyl O-(2-hydroxypropyl)- alpha, Beta-D- glucopyranosides
47	58.066	----	----

Légende :

Brut:	Bois brut (avec extractible)
Extrait:	Bois brut sans extractible
Lignine:	Lignine de Klason
----- :	Intensité inférieure à 10

* Les composés numérotés sont rapportés dans l'Annexe.

Enfin, pour les différents échantillons de bois, le déplacement chimique vers 105 ppm présente un signal d'une intensité significative. Ce déplacement chimique est attribué aux groupements aromatiques ayant une structure moléculaire de même type que l'unité syringyle (Fengel, D. et Wegener, G., 1984).

3.5.2.5 Groupements méthoxyles

Les méthoxyles sont propres à chacune des unités de lignine de l'espèce étudiée (épinette blanche), soient le guaïacyle et le syringyle. L'unité guaïacyle demeure toutefois la plus importante. La région permettant l'interprétation de ce groupement se situe entre 54,5 et 57 ppm (Tableau XXII et XXIII) et ces variations s'expliquent par la complexité de la lignine. En spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone-13, certains déplacements chimiques de OCH₃ ont été observés dans la région de 55 à 56 ppm (Huguchi, T., 1980).

L'unité guaïacyle de la lignine contribue également à des déplacements chimiques de 148 ppm pour le carbone aromatique en position trois (3), de 146 et 153 ppm pour le carbone aromatique en position quatre (4). Ces caractéristiques ont été observées dans le cas d'une structure modèle de type β -O-4' (Leary, G.J. *et al.*, 1986). Il est estimé que la lignine de Klason issues de l'épinette blanche, présente les mêmes particularités que celle décrite précédemment. Suite à l'interprétation des résultats, la structure moléculaire de la lignine de Klason renferme plusieurs unités dimériques de type β -O-4'.

TABLEAU XXII

Déplacements chimiques observés en
RMN du carbone-13 de
l'épinette blanche (57-54,5 ppm)

(groupements méthoxyles sur les carbones aromatiques)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
01	57.580	—	41.675	—
02	55.987	—	—	155.438
03	55.490	56.023	52.908	—

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
Extrait: Bois brut sans extractible
Lignine: Lignine de Klason
---- : Intensité inférieure à 10

TABLEAU XXIII

Interprétation des spectres
de résonance magnétique nucléaire du carbone-13
de l'épinette blanche (57-54,5 ppm)

(groupements méthoxyles sur les carbones aromatiques)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
01	57.580		—
02	55.987	4	Méthoxyle (OCH ₃)
03	55.490	6	Méthoxyle dans l'unité β -aryl éther (threo-1)
		6	Méthoxyle dans l'unité β -aryl éther (3)
		8,15	Méthoxyle dans l'unité aromatique

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
 Extrait: Bois brut sans extractible
 Lignine: Lignine de Klason
 ---- : Intensité inférieure à 10

* Les composés numérotés sont rapportés dans l'Annexe.

3.5.2.6 Composés aliphatiques non-oxygénés

Les carbones aliphatiques non-oxygénés se retrouvent dans des chaîne linéaires reliées aux cycles aromatiques pour donner une structure des plus complexes. Les signaux obtenus par RMN du carbone-13 entre 51 à 31 ppm sont associés aux carbones aliphatiques tertiaires (Tableau XXIV) et l'interprétation de ces signaux est représentée au Tableau XXV. Pour les carbones aliphatiques non oxygénés, de 30 à 14 ppm, les signaux obtenus (Tableau XXVI) sont interprétés au Tableau XXVII).

Selon la nature du composé, les carbones aliphatiques positionnés sur la chaîne latérale peuvent donner un déplacement chimique différent. Ce déplacement chimique peut se délocaliser et interférer dans les régions, attribuées aux carbones aromatiques quaternaires et tertiaires, variant de 100 à 135 ppm (Morck, R., *et al.*, 1986; Robert, D., et Chen, C.L., 1989; Sjöholm, R., *et al.*, 1992).

La matrice de la lignine de Klason est forcément différente de la matrice de la lignine dans le bois brut et le bois extrait.

TABLEAU XXIV

Déplacements chimiques observés en
RMN du carbone-13 de
l'épinette blanche (51-31 ppm)

(carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
01	51.078	—	—	38.794
02	50.057	—	—	42.605
03	49.290	19.358	—	—
04	48.794	—	—	45.560
05	48.075	16.737	—	—
06	47.411	—	—	40.337
07	46.909	17.405	—	—
08	46.169	—	—	44.226
09	45.148	—	—	42.323
10	44.846	15.428	—	—
11	44.495	—	—	39.395
12	43.766	—	—	40.893
13	43.339	14.900	—	—
14	43.047	14.960	—	42.929
15	42.048	13.948	—	42.037
16	41.346	14.733	—	40.576

TABLEAU XXIV (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
17	40.763	14.680	—	—
18	40.509	—	—	42.351
19	39.780	—	—	41.694
20	38.743	13.911	—	42.911
21	38.090	14.249	—	44.403
22	37.518	—	—	43.966
23	37.058	—	—	43.367
24	36.680	13.985	—	43.242
25	36.194	14.087	—	—
26	35.271	13.692	—	—
27	34.844	—	—	—
28	33.931	14.685	—	—
29	33.510	—	—	38.743
30	32.619	14.675	—	—
31	32.317	—	—	42.557
32	31.539	—	—	45.244
33	31.382	14.640	—	44.928

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
 Extrait: Bois brut sans extractible
 Lignine: Lignine de Klason
 ---- : Intensité inférieure à 10

TABLEAU XXV

Interprétation des spectres
de résonance magnétique nucléaire du carbone-13
de l'épinette blanche (51-31 ppm)

(carbones aliphatiques tertiaires non-oxygénés)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation *
01	51.078	6	C-Beta dans β -1' et unités phenylcoumaranes
02	50.057	12	C-Beta dans β -5'
03	49.290	1	C-alpha dans (no. 45)
04	48.794	5	Carbone aliphatique
05	48.075	—	—
06	47.411	5	Carbone aliphatique
07	46.909	5	Carbone aliphatique
08	46.169	5	Carbone aliphatique
09	45.148	1	C-Beta dans (no. 57)
10	44.846	1	C-Beta dans (no. 58)
		5	Carbone aliphatique
11	44.495	5	Carbone aliphatique
12	43.766	—	—
13	43.339	—	—
14	43.047	2	C-3 dans l'unité isohexane
15	42.048	—	—
16	41.346	1	C-alpha dans (no.19) et
		2	C-alpha du carbonyle
17	40.763	1	C-alpha dans (no. 18)
18	40.509	1	C-alpha dans (no. 17)
19	39.780	1	C-alpha dans (no. 32)
20	38.743	1	C-alpha dans (no. 16)
21	38.090	2	C-3 des alcanes aliphatiques
22	37.518	1	C-alpha du comp. no. 57

TABLEAU XXV (suite)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
23	37.058	2	C-3 des alcanes aliphatiques
24	36.680	2	C-3 des alcanes aliphatiques
25	36.194	2	C-3 des alcanes aliphatiques
26	35.271	1	C-alpha du comp. no. 28
27	34.844	1	C-alpha du comp. no. 56,
		2	C-3 des alcanes aliphatiques
28	33.931	1	C-alpha du comp. no. 52,
29	33.510	5	C-aliphique des alcanes
30	32.619	3	C-3 des alcanes aliphatiques
31	32.317	2	C-3 des alcanes aliphatiques
32	31.539	1	C-beta du comp. no. 41 et 52,
		2	C-1 des alcanes aliphatiques
33	31.382	1	C-beta du comp. no. 41 et 52

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
 Extrait: Bois brut sans extractible
 Lignine: Lignine de Klason
 ---- : Intensité inférieure à 10

* Les composés numérotés sont rapportés dans l'Annexe.

TABLEAU XXVI

Déplacements chimiques observés en
RMN du carbone-13 de
l'épinette blanche (30-14 ppm)

(carbones aliphatiques non-oxygénés)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Intensité		
		Brut	Extrait	Lignine
01	30.157	—	—	47.955
02	29.606	13.772	—	—
03	28.915	—	—	42.508
04	28.283	—	—	41.301
05	27.484	—	—	41.816
06	26.366	—	—	39.666
07	24.227	—	—	27.829
08	23.509	15.764	—	—
09	22.089	—	—	25.525
10	21.370	18.325	—	—
11	20.517	17.554	20.865	29.805
12	19.561	—	—	21.943
13	19.388	—	17.332	22.016
14	18.745	15.527	—	—
15	17.989	—	21.163	—
16	17.336	15.404	14.073	—
17	14.906	14.004	—	—
18	14.031	13.920	—	20.455

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
Extrait: Bois brut sans extractible
Lignine: Lignine de Klason
---- : Intensité inférieure à 10

TABLEAU XXVII

Interprétation des spectres
de résonance magnétique nucléaire du carbone-13
de l'épinette blanche (30-14 ppm)

(carbones aliphatiques non-oxygénés)

No. Signal	Dépl. chim. (δ en ppm)	Réf.	Interprétation*
01	30.157	1	C-Beta du composé no.27
02	29.606	2	C-2/4 des alcanes (heptane et méthyl-3 pentane)
03	28.915	2	C-1 des alcanes (2,2-diméthylbutane) et alcane dans les groupements alkyl saturés
04	28.283	1,2	C-alpha du comp. 15 et C-2 des alcanes
05	27.484	2	C-1 des alcanes (2,2,3-triméthylbutane)
06	26.366	---	---
07	24.227	1	C-Beta du composé no.57
08	23.509	2	C-2 des alcanes
09	22.089	2	C-1 de l'isopentane
10	21.370	---	---
11	20.517	1 6 15	C-alpha des composés 10, 12, 53, 54, 55 et 56 unité acétyl groupement méthyl acétyl
12	19.561	2	C-1 du 2,3-diméthylbutane
13	19.388	2	C-1 du 2,3-diméthylbutane
14	18.745	2,5	C-4 du 3-méthylpentane et groupement acétyl
15	17.989	1	C- γ de l'unité 34, 57 et 58
16	17.336	---	---
17	14.906	---	---
18	14.031	2	C-1 des alcanes

Légende :

Brut: Bois brut (avec extractible)
Extrait: Bois brut sans extractible
Lignine: Lignine de Klason
---- : Intensité inférieure à 10

* Les composés numérotés sont rapportés dans l'Annexe.

3.5.3 Comparaison des spectres:

L'unité de base de la lignine de conifère est le guaiacyle caractérisé par la présence d'un groupement méthoxyle apparaissant près de 55 ppm. A la suite des résultats obtenus, la lignine de Klason présente une intensité nettement supérieure dans la région de 55 ppm comparativement aux échantillons de bois brut et de bois sans extractibles. Cette constatation s'explique par le fait que les échantillons de bois brut renferment une multitude de composantes telles que la cellulose et les hémicelluloses qui par contribution de l'ensemble de ces constituants, minimisent l'intensité relative du groupement méthoxyle par rapport à l'ensemble des déplacements chimiques détectés. La lignine de Klason, en l'absence d'extractibles, de groupements cellulosiques et hémicellulosiques, permet l'obtention d'une intensité plus importante en groupements méthoxyles.

Les résultats expérimentaux observés en RMN du carbone-13 (Figure 35) montrent que la partie aromatique des unités phénylpropanoïdes, dont les déplacements chimiques varient entre 160 et 107 ppm, demeure plus intense pour la lignine de Klason que celle obtenue pour le bois brut et le bois extrait. Les spectres de bois brut et de bois extrait, se caractérisent par d'importants groupements cellulosiques caractérisés par des déplacements entre 108 et 58 ppm. Il faut cependant noter que certains déplacements chimiques de la partie alkyle oxygéné (alcools et éthers) de l'unité phénylpropanoïde apparaissent dans la même région que les alkyles oxygénés de la cellulose et des hémicelluloses (Himmelsbach, D.S. et Barton, F.E., 1980) et occasionnent une intensité plus importante.

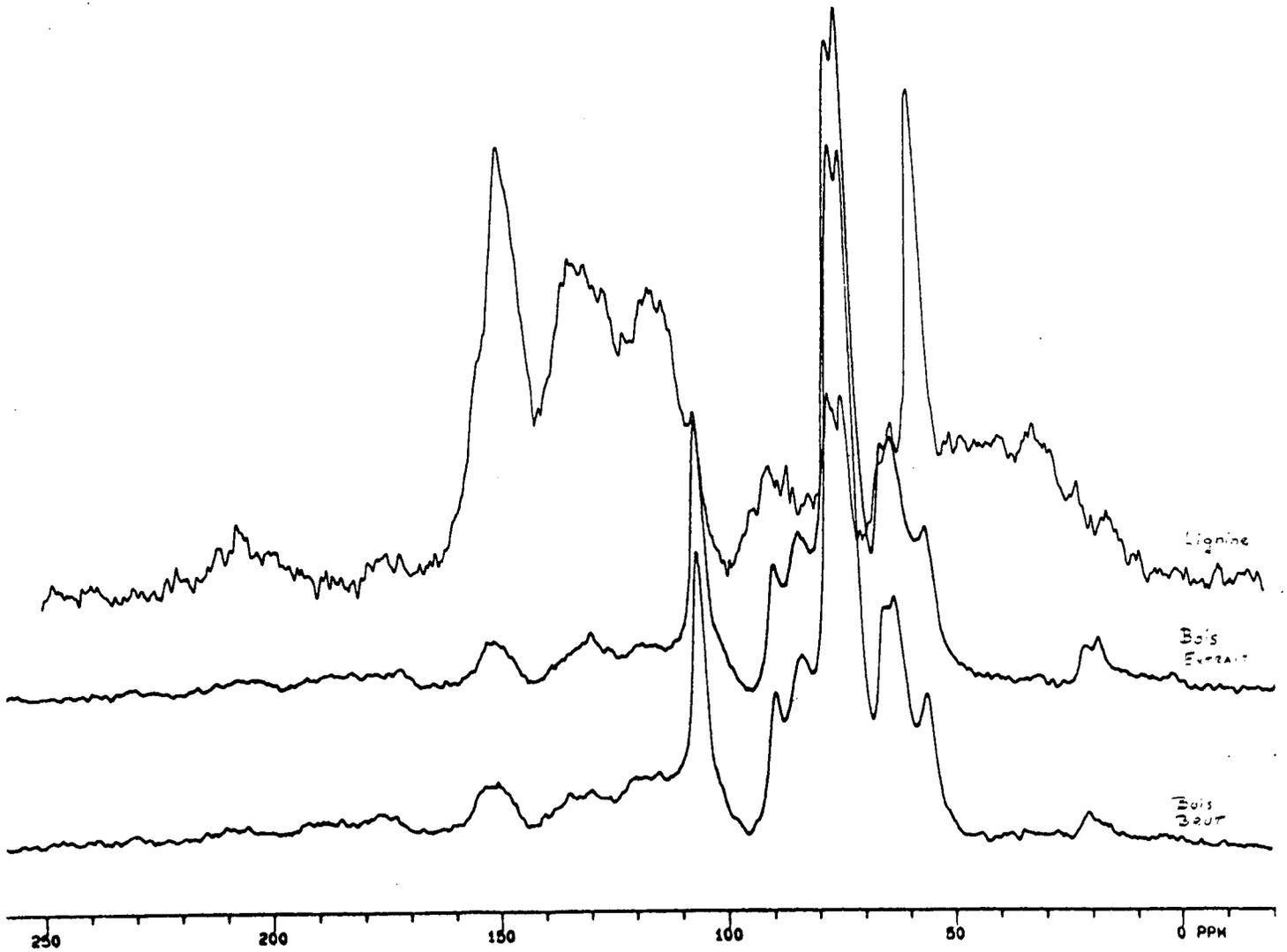


Figure 35: Superposition de spectres obtenus par RMN du carbone-13.

Par comparaison, les spectres obtenus renferment certains composés aliphatiques retrouvés vers 25 ppm, des groupements méthoxyles vers 55 ppm et des carbones aromatiques tertiaires caractéristiques de la lignine vers 110 ppm. Les spectres RMN du carbone-13 appuient les résultats obtenus par spectrométrie infrarouge lors de l'interprétation des groupements cellulosiques et de la fonction guaiacyle présente dans le noyau aromatique.

Le spectre du bois extrait devient presque similaire à celui du bois brut sauf que ce dernier offre un signal plus faible dans la région de 30 à 50 ppm. Cette caractéristique démontre la contribution des acides résiniques et des extractibles présents dans l'échantillon de bois brut. Suite à l'interprétation des déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13, une multitude d'unités monomériques et dimériques ont été proposées et sont illustrées en annexe. Ces unités font référence aux travaux réalisés antérieurement par différents auteurs. Les unités monomériques suggérées sont issues principalement du noyau guaiacyle et les dimères les plus présents, constituent majoritairement des structures de type β -O-4' et β -5'. Certaines sous-structures présentes dans la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss seront illustrées; elles forment des oligolignols.

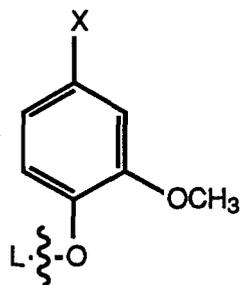
3.5.4 Sous-structures monomériques

Les unités monomériques retrouvées par spectrométrie RMN du carbone-13 et par FAB/MS ont été comparées à la littérature afin de développer certains modèles de

base. Ces unités ont été sélectionnées lorsqu'elles comportaient un minimum de quatre (4) déplacements chimiques identiques à ceux retrouvés expérimentalement. Chaque carbone positionné sur le noyau aromatique ou sur la chaîne latérale possède un déplacement chimique qui lui est propre selon son environnement. Les résultats obtenus suggèrent que l'unité β -O-4' est un élément important dans l'interprétation de la structure de la lignine de Klason extraite de conifère.

Les résultats obtenus démontrent qu'à partir de l'unité phénylpropanoïde, les structures monomériques de la lignine de Klason existent sous plusieurs formes. Les structures monomériques élucidées ont comme unités de base, la fonction guaiacyle (Figure 36). Le substituant fixé sur le carbone aromatique numéro un (1) est représenté par le symbole "X". Lorsqu'il y a variation du substituant "X", les sous-structures monomériques retrouvées pour la lignine de Klason, sont appuyées par l'analyse des déplacements chimiques observés en RMN du carbone-13 et par les fragments retrouvés en spectrométrie de masse par atomes rapides (FAB/MS) (Figure 37). La précision utilisée permettant une interprétation en spectrométrie de masse (FAB/MS) est de l'ordre de $\pm 0,05$ u.m.a. (Larouche, R. *et al*, 1992).

Après compilation des résultats, les fonctions alcools et acides sont également présentes dans certaines unités de lignine mais, en faible proportion. Les trois (3) unités de base issues de l'alcool phénylpropanoïde tels que: le trans-coniférol, le trans-sinapol, le trans-p-coumarol sont identifiées par FAB/MS (Figure 38).



Variation du X	m/z	RMN du carbone-13					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
1- H	123,04	119,4	113,0	148,3	147,3	11,3	121,2
2- CHO	151,04	129,5	111,9	148,3	—	116,6	125,5
3- CH ₂ OH	153,06	133,9	111,3	146,3	145,3	115,3	119,4
4- COOH	167,03	124,3	114,1	168,2	151,3	115,3	122,3
5- CH ₂ CH ₃	151,07	135,5	113,2	148,2	145,3	116,6	120,7
6- CH ₂ CH ₂ OH	167,07	130,9	114,1	147,3	145,3	115,3	121,2
7- CHOH-CH ₃	167,07	138,6	110,2	147,3	145,3	115,3	118,6
8- CHOHCOOH	197,04	131,4	111,7	147,3	—	115,3	119,4
9- CH ₂ CH ₂ CH ₃	165,09	133,5	111,7	143,7	145,3	133,9	116,6
10- COCH ₂ CH ₃	179,07	130,9	111,9	149,3	153,8	111,9	122,3
11- CH=CH-CH ₂ OH	179,07	129,2	111,0	148,1	146,6	115,9	119,7
12- CH=CH-CHO	177,05	129,6	112,9	148,3	150,6	117,6	122,3
13- CH=CH-COOH	193,05	127,8	111,9	149,2	151,3	112,9	122,8

L : unité de lignine

Figure 36: Sous-structures monomériques de la lignine de Klason.

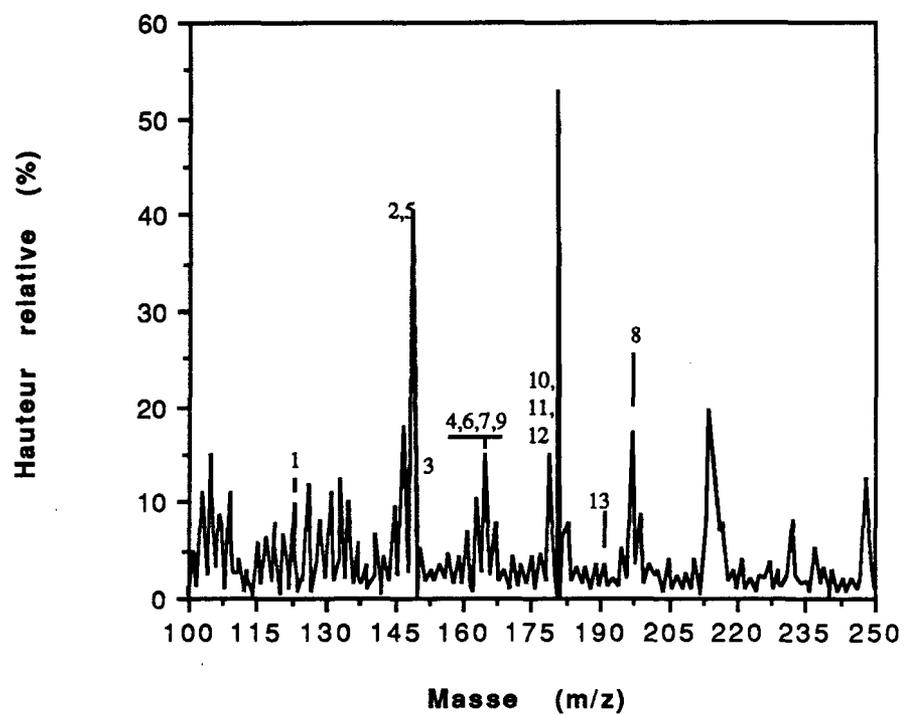
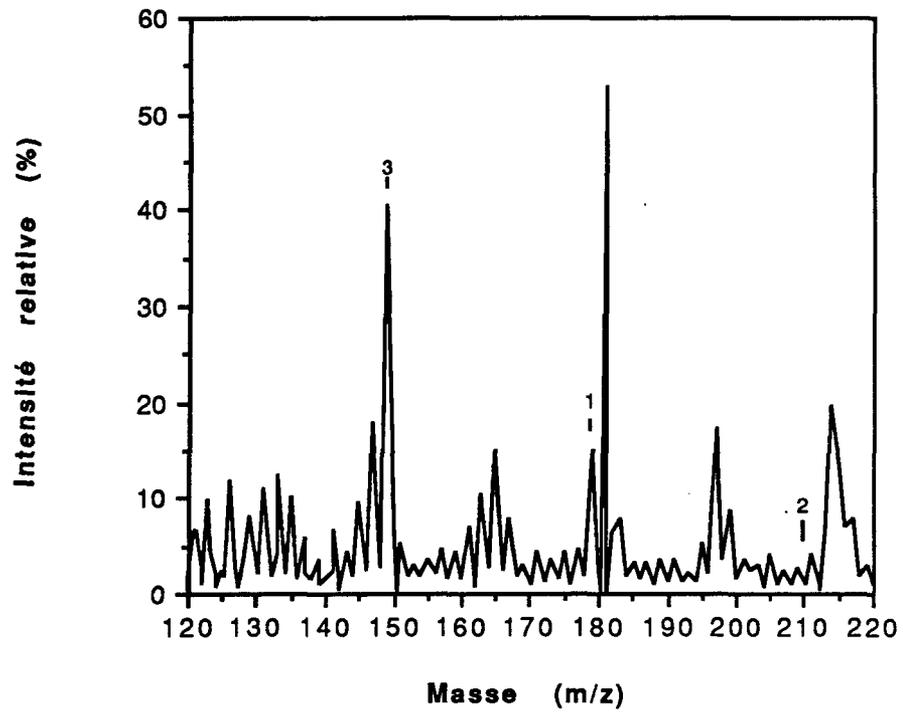


Figure 37 : Spectre FAB/MS des unités monomériques issus de la lignine de Klason



Légende :

- 1- Trans-coniférol
- 2- Trans-sinapol
- 3- Trans-p-coumarol

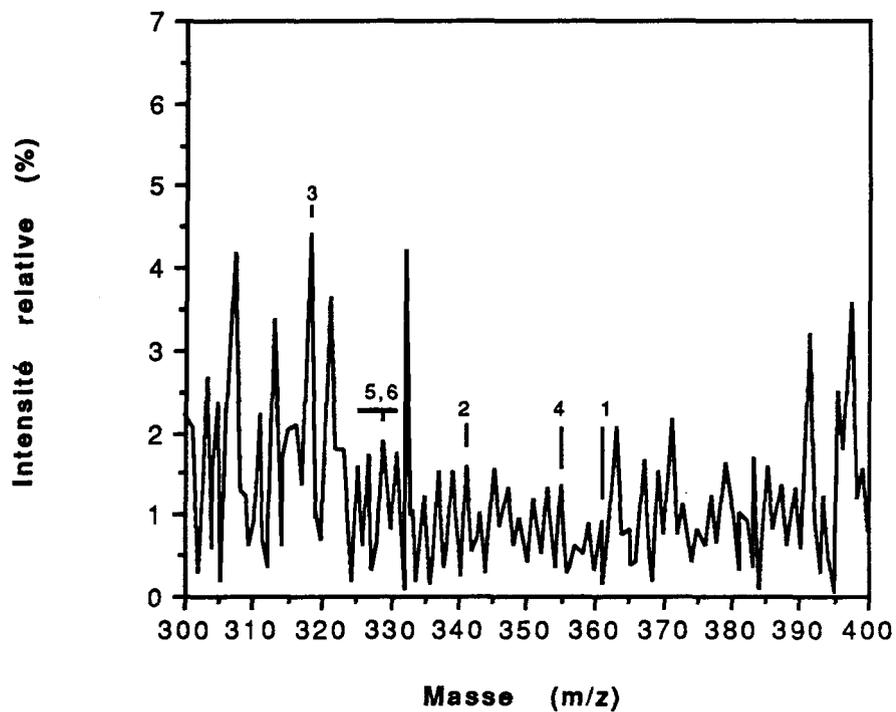
Figure 38: Unités de base issues d'alcools phénylpropanoïdes identifiées par FAB/MS.

3.5.5 Sous-structures dimériques

Les principales unités dimériques de base sont formées, suite à des mécanismes de polymérisation radicalaire et ce, à partir d'unités monomériques (Huguchi, T., 1985). Les résultats obtenus par RMN du carbone-13 et du FAB/MS, suggèrent la présence des principales unités phénylpropanoïdes dans la structure de base de la lignine. Les unités monomériques retrouvées précédemment, permettent l'élaboration de structures dimériques de la lignine. Les unités guaiacyles et para-hydroxyphényles caractérisent la majorité des unités de base de la lignine extraite de conifère. Les structures dimériques retrouvés présentent des liens interunités de type β -O-4', β -5', β -1', β - β ', 5-5' et 4-O-5' et sont détectés par spectrométrie de masse par atomes rapides (FAB/MS) (Figure 39).

3.5.5.1 Unités dimériques de type β -O-4'

Les fragments obtenus par spectrométrie de masse par atomes rapides (FAB/MS) et les déplacements chimiques observés par RMN du carbon-13 sont comparés à la littérature et permettent de proposer des modèles dimériques possibles de type β -O-4'. Suite à une interprétation des résultats obtenus pour l'ensemble du spectre, deux (2) structures dimériques de type β -O-4' sont retrouvées, les déplacements chimiques pour les carbones β sont de 85,1 ppm (Lapierre, C. *et al.*, 1987). Ces structures se composent de deux (2) unités: une phénylpropanoïde ayant en position α sur la chaîne latérale un groupement hydroxyle et en position β un éther aromatique; l'autre unité est un guaiacyl diversement substitué.



Légende:

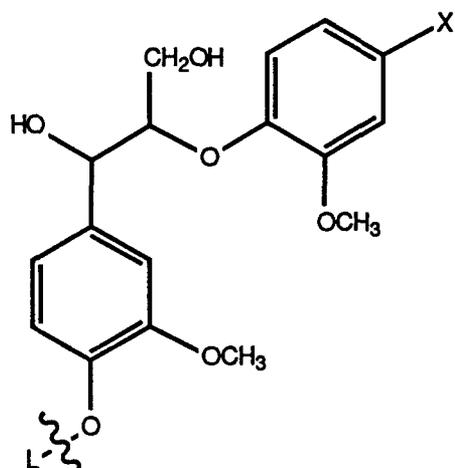
- I- Éther guaiacylglycérol β -aryl (β -O-4')
- II- Phénylcoumarane (β -5')
- III- Diarylpropane (β -1')
- IV- Pinorésinol (β - β')
- V- Biphényle (5-5')
- VI- Biphényléther (4-O-5')

Figure 39: Identification de sous-structures dimériques de base de la lignine.

Un autre dimère est représenté dans la Figure 40. Il est caractérisé par la présence d'une double liaison sur la chaîne latérale en position α . Le second cycle aromatique renferme un groupement "X" positionné sur le carbone un (1). Ce substituant "X" permet de retrouver neuf (9) possibilités pour chacune des structures dimériques de type β -O-4'.

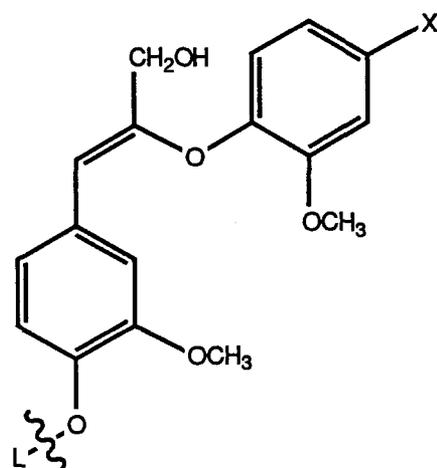
Les probabilités de retrouver la structure dimérique ayant une double liaison en position α - β de la chaîne latérale sont plus grandes pour un type de lignine traitée avec une solution d'acide sulfurique. La lignine en milieu acide se déhydrate favorisant ainsi la formation de systèmes conjugués avec les noyaux aromatiques (Fengel, D. et Wegener, G., 1984). Les résultats obtenus sont confirmés par spectrométrie RMN du carbone-13 et par FAB/MS (Figure 41).

a)

Variation de "X"m/z

1-	CHO	347,11
2-	CH ₃	333,13
3-	CH ₂ OH	349,13
4-	COOH	363,11
5-	CH ₂ -CH ₃	347,15
6-	CH ₂ -CH ₂ OH	363,14
7-	CHOH-CH ₃	363,14
8-	CHOH-COOH	393,12
9-	H	318,11

b)

Variation de "X"m/z

10-	H	301,11
11-	CHO	329,10
12-	CH ₃	315,12
13-	CH ₂ OH	331,12
14-	COOH	345,09
15-	CH ₂ -CH ₃	329,14
16-	CH ₂ -CH ₂ OH	345,13
17-	CHOH-CH ₃	345,13
18-	CHOH-COOH	375,11

L : unité de lignine

Figure 40: Sous-structures dimériques de type β -O-4'.

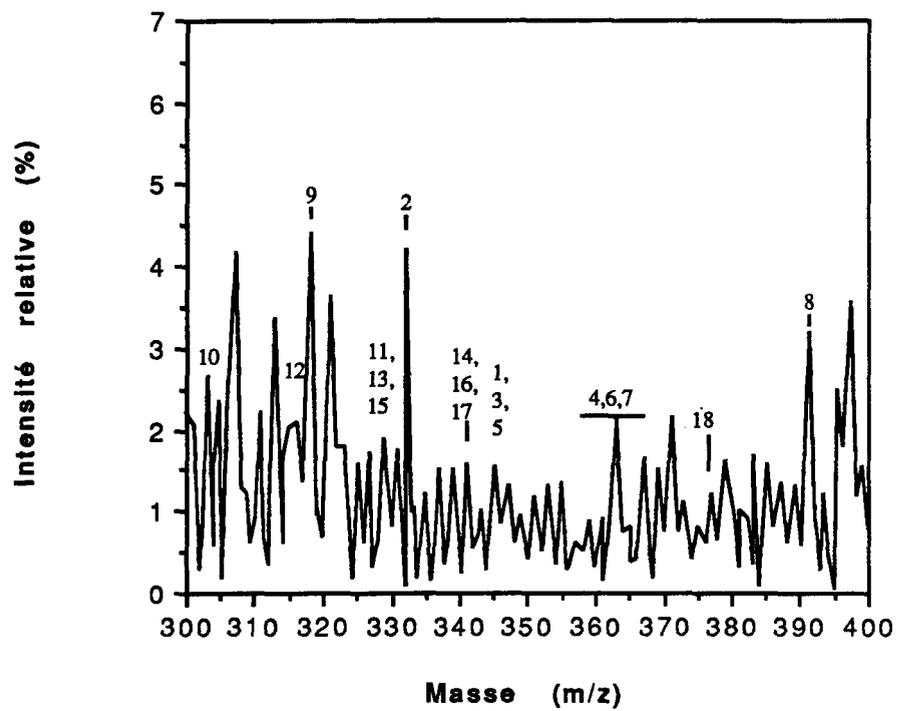


Figure 41: Spectre FAB/MS des unités dimériques de type β -O-4'

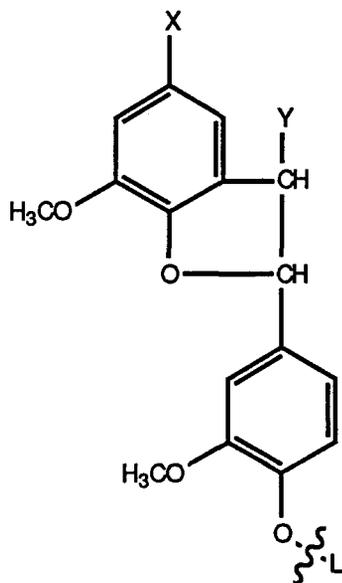
3.5.5.2 Unités dimériques de type β -5'

Le dimère de type β -5' présent dans la lignine est d'une importance de 10% (Higuchi, T., 1985) et sa structure se présente sous deux (2) formes. Suite aux résultats obtenus pour l'analyse de la lignine de Klason, un des dimères de type β -5' renferme une double liaison en position α de la chaîne latérale (Figure 42). Les modèles correspondants dans la littérature diffèrent par la valeur du déplacement chimique de la position du quatrième carbone aromatique. Ce carbone est alors lié à un groupement hydroxyle qui permet la formation de liaisons interunités dans la structure de la lignine.

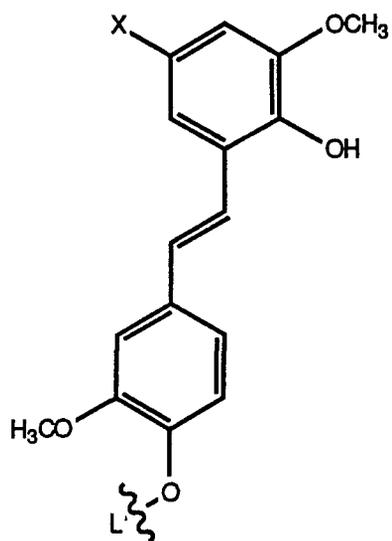
3.5.5.3 Unités dimériques de type β -1'

L'unité dimérique de type β -1' retrouvée existe sous deux (2) formes possibles (Kringstad, K.P. et Mörck, R., 1983). Ces structures renferment les deux (2) unités guaiacyles à chaque extrémité et les différences consistent en un groupement CH_2OH et hydrogène substitué sur la chaîne latérale en position β . Ces structures sont ainsi illustrées à la figure 43 et le spectre du FAB/MS est représenté à la figure 44.

a)

Variation de "X"m/z1- CH₂CH₂CH₃ 312,142- CH=CHCH₃ 310,12

b)

Variation de "X"m/z

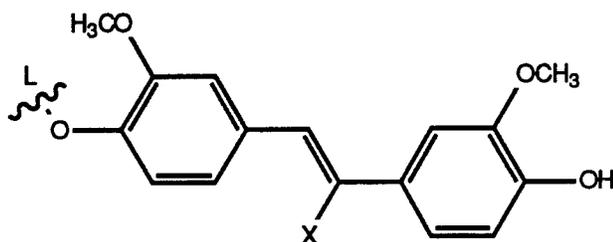
3- H 271,09

4- CH₂CH₂OH 315,125- CH₂[CH₂]₂OH 329,14

L : unité de lignine

Figure 42: Structures dimériques de type β -5'.

c) Dimère de type β -1'



	<u>Variation de "X"</u>	<u>m/z</u>
6-	H	271,09
7-	CH ₂ OH	301,11

Figure 43: Structures dimériques de type β -1'.

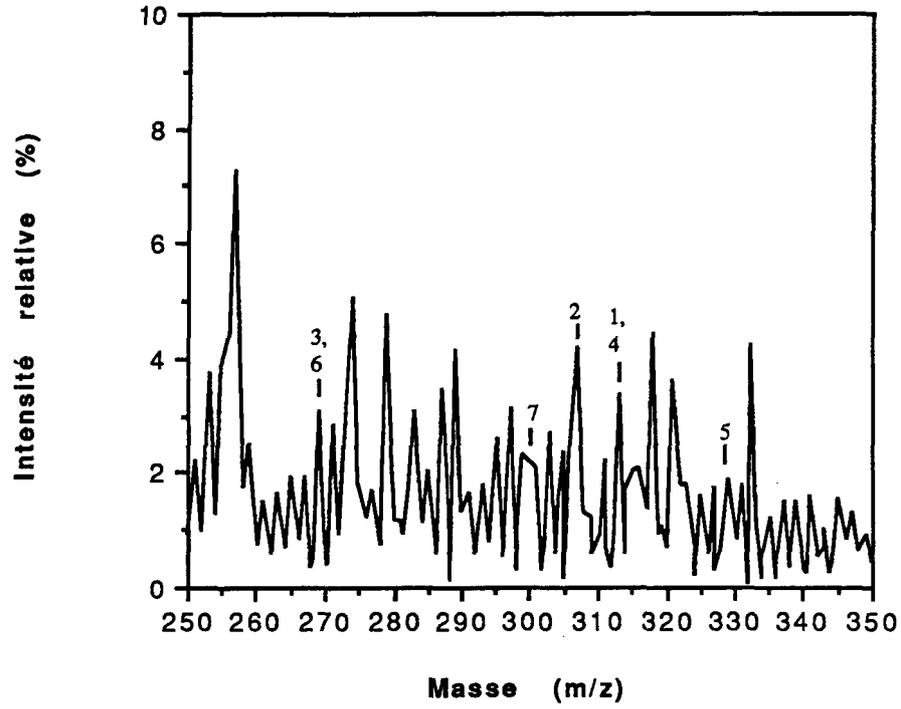


Figure 44: Spectre FAB/MS des unités dimériques de type β -5' et β -1'.

3.5.5.4 Unités dimériques de type β - β'

L'unité β - β' est caractérisée en RMN du carbone-13 par un déplacement chimique de 85,1 ppm pour le carbone α , de 53,1 ppm pour le carbone β et de 71,3 ppm, pour le carbone γ (Lapierre, C. *et al*, 1987). L'unité pinorésinol de structure β - β' a été identifiée; le groupement hydroxyle positionné sur le noyau aromatique, permet la formation de liens interunités.

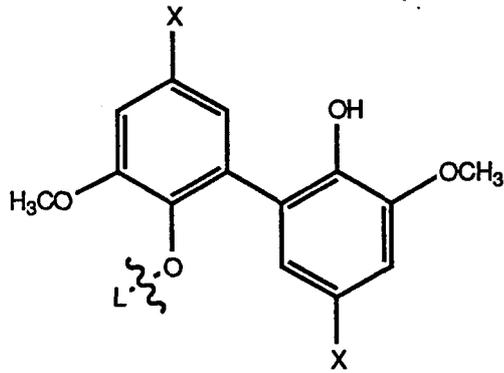
3.5.5.5 Unités dimériques de type 5-5'

La structure biphényle, d'une importance relative de 10%, est identifiée en trois (3) structures différentes de type 5-5'. Ces structures se différencient par la présence d'un substituant "X" en position un (1) du carbone aromatique (Figure 45). Le substituant suggère des fonctions aldéhyde et aliphatique. Le groupement hydroxyle du noyau aromatique permet la formation de liens interunités via un mécanisme radicalaire.

3.5.5.6 Unités dimériques de type 4-O-5'

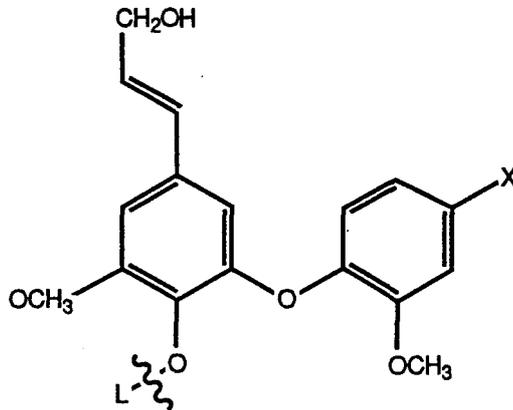
Cette structure étant la moins abondante n'est toutefois pas négligeable. Suite à l'interprétation des résultats, la structure dimérique de type 4-O-5' est obtenue et présente trois substituants différents. La structure de base contient une substituant "X" en position un (1) sur le carbone aromatique et ces mêmes substituants sont interprétés par FAB/MS (Figure 46).

a) Dimère de type 5-5'



<u>Variation de "X"</u>		<u>m/z</u>
1-	CHO	272,07
2-	CH ₃	258,09
3-	CH ₂ CH ₃	272,10

b) Dimère de type 4-O-5'



<u>Variation de "X"</u>		<u>m/z</u>
4-	CHO	329,1
5-	CH ₃	315,1
6-	CH ₂ CH ₂ CH ₃	343,1

L : unité de lignine

Figure 45: Identification de sous-structures dimériques de type 4-O-5' et 5-5'.

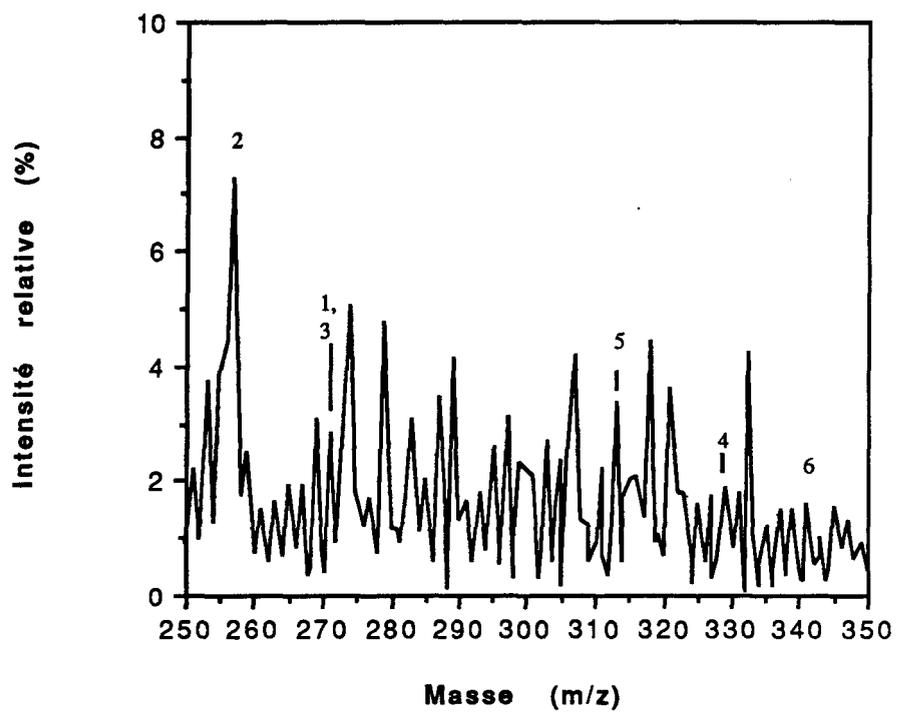


Figure 46: Spectre FAB/MS des unités dimériques de type β -5' et β -1'.

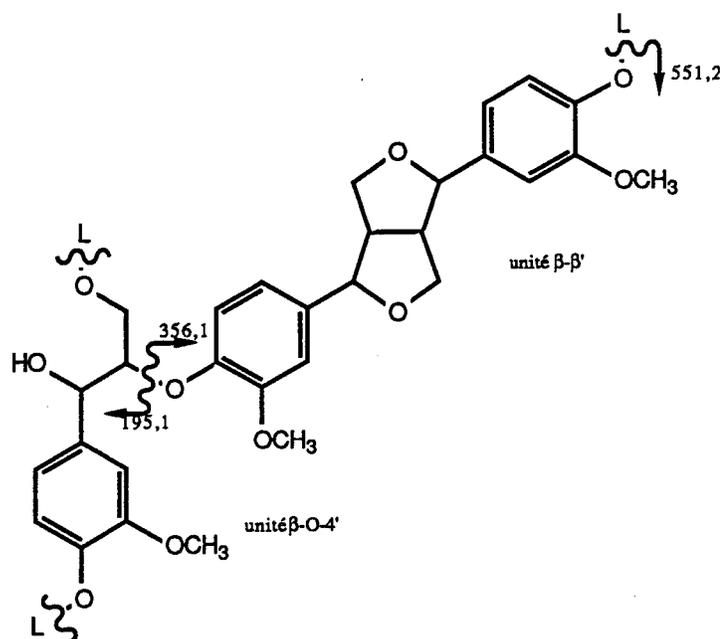
3.5.6 Caractérisation d'oligolignols

Les oligolignols sont des unités polymériques de lignine contenant jusqu'à quatre (4) unités phénylpropanoïdes. Ces unités renferment les structures dimériques retrouvées précédemment. La majorité des structures retrouvées, contiennent des liaisons interunités de type β -O-4'.

Pour les structures ayant trois (3) cycles aromatiques, les résultats proposent comme trimère une structure de type β -O-4' et β - β '. Le fragment identifié possède une masse moléculaire de l'ordre de 551 u.m.a. (Figure 47).

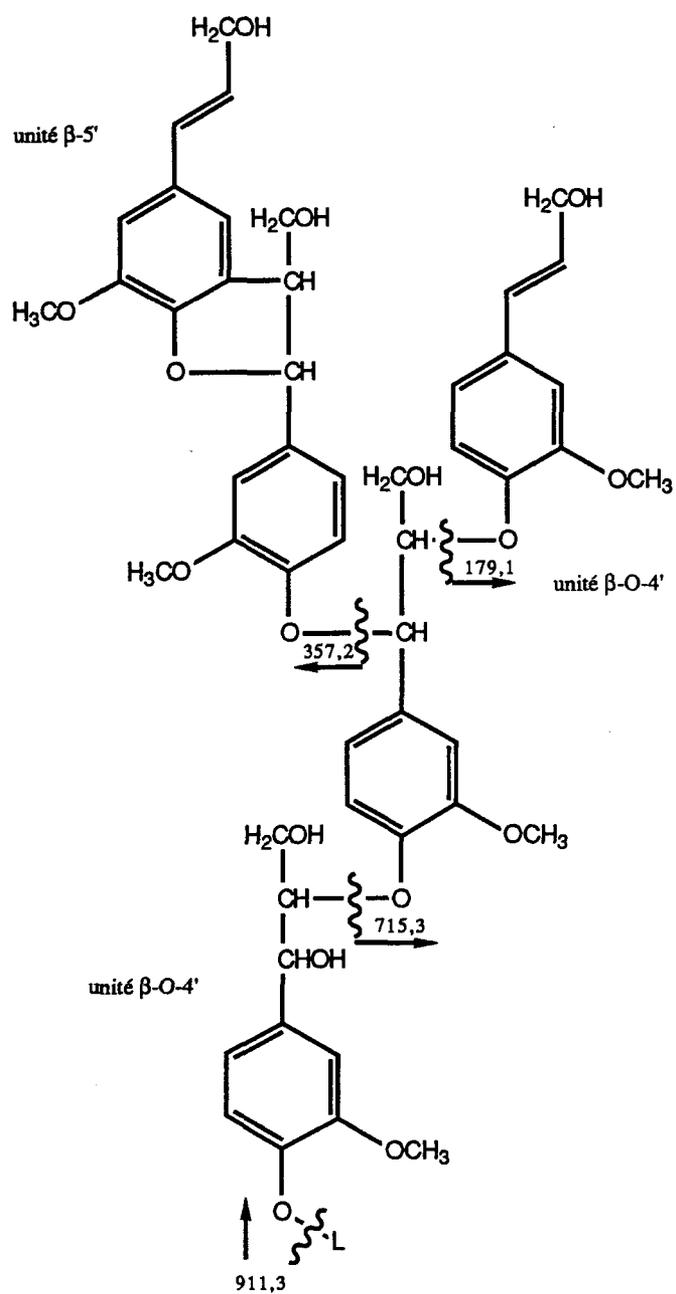
Concernant les structures se composant de cinq (5) noyaux aromatiques, les résultats démontrent la présence de deux (2) tétramères. La masse moléculaire totale pour l'unité polymérique de type β -O-4' pour l'ensemble de ce fragments atteint 911,3 u.m.a. et lorsque quatre (4) unités sont considérées, ce fragment possède une masse de 715,3 u.m.a. (Figure 48). Aussi, une seconde structure d'interunité de type β -O-4' et β -5' est retrouvée et ce fragment a une masse de 717,3 u.m.a. (Figure 49).

Pour les structures plus élaborées se composant de cinq (5) noyaux aromatiques et plus, les résultats proposent quatre (4) structures. Le pentalignol observé se compose de liaisons interunités de type β -O-4' et β -5'. La masse moléculaire de ce fragment est alors de 928,3 u.m.a. (Figure 50). Une seconde structure composée de six (6) unités phénylpropanoïdes permet l'obtention d'un fragment de 1106,4 de masse moléculaire. Les liens interunités sont du type β -O-4' (Figure 51).



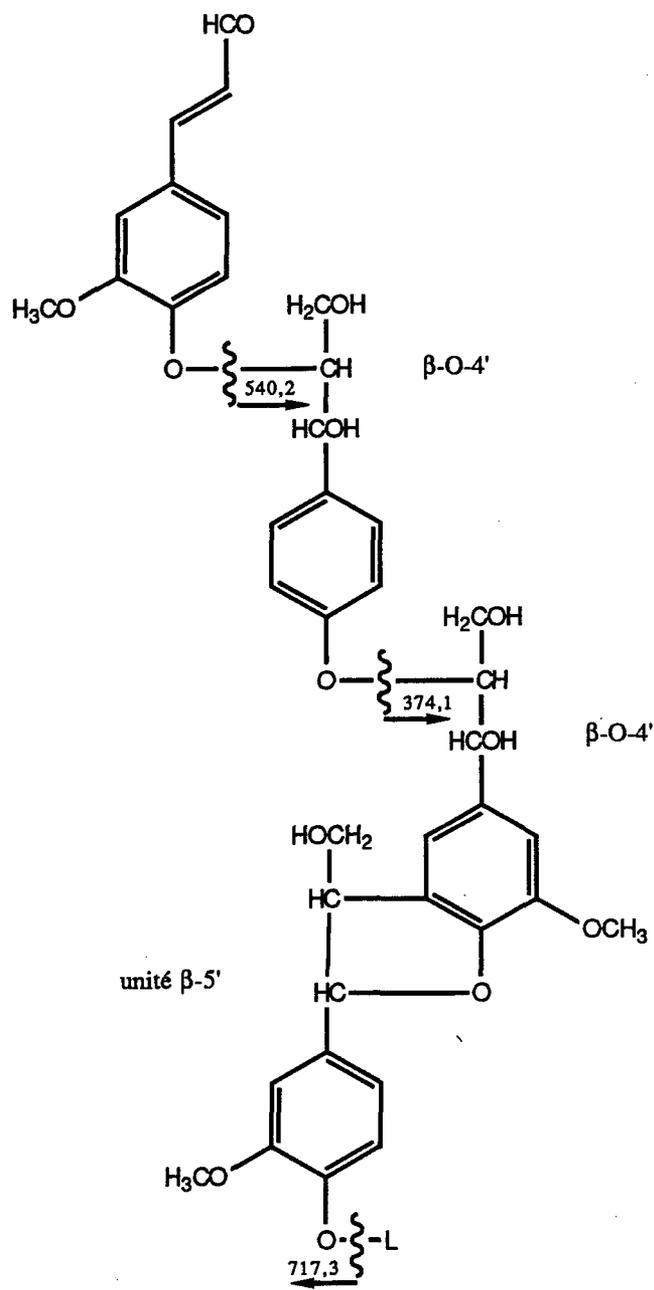
L : unité de lignine

Figure 47: Trimère de type β -O-4' et β - β' .



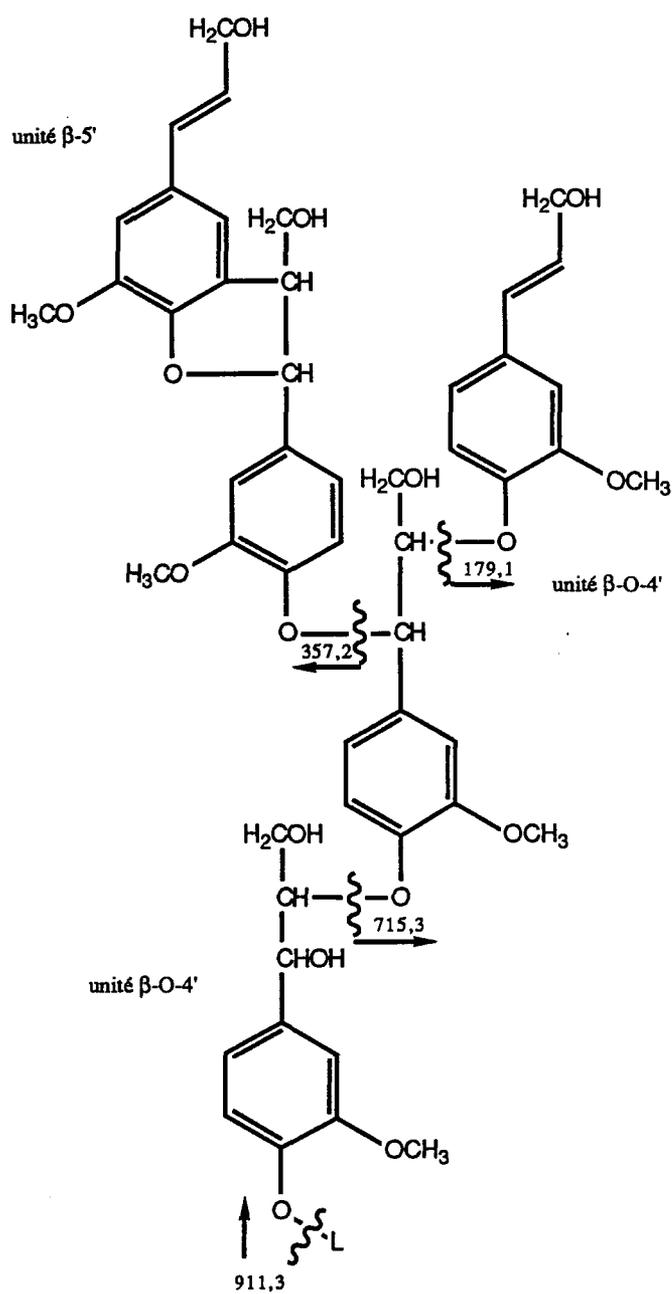
L : unité de lignine

Figure 48: Identification d'un fragment majoritaire de type β -O-4'.



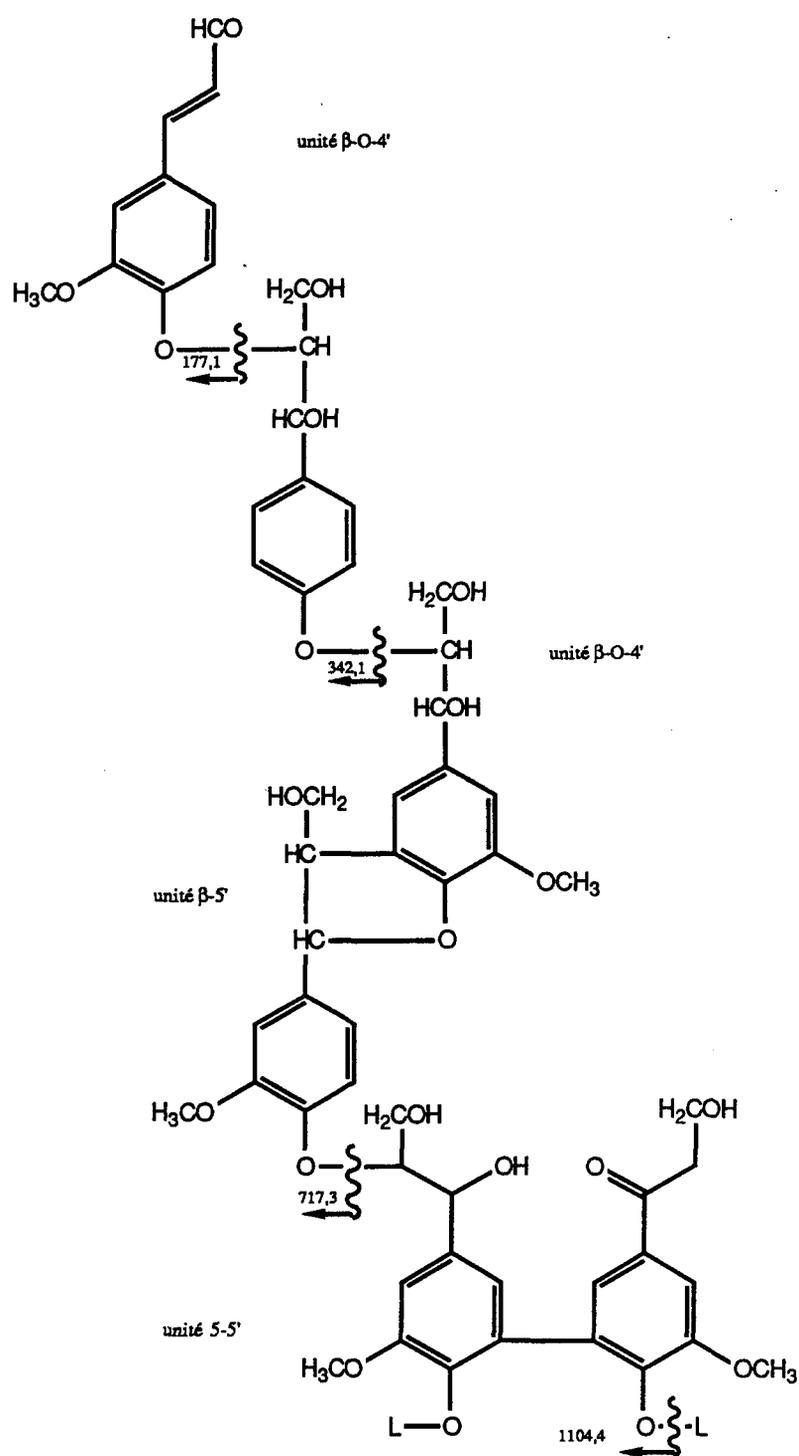
L : unité de lignine

Figure 49: Identification d'un fragment de quatre (4) unités de type β -O-4' et β -5'.



L : unité de lignine

Figure 50: Identification d'un fragment de cinq (5) unités de type β -O-4' et β -5'.



L : unité de lignine

Figure 51: Identification d'un fragment de 1104,4 u.m.a. de type β -O-4' et 5-5'

L'unité dimérique obtenue précédemment de type β - β' combinée avec une structure de type β -1' est observée par spectrométrie RMN du carbone-13 et par FAB/MS (Figure 52). Des études antérieures de biosynthèse de la lignine proposent cette structure comme fragment de la lignine de Klason (Torsell, K.B.G., 1983). La structure modèle proposée par Adler en 1977 et Sjöström en 1981, se compose de 16 unités phénylpropanoïdes. L'ensemble des liens interunités que contient ce modèle de base correspond aux résultats obtenus par spectrométrie RMN du carbone-13 et par FAB/MS. Cette structure modèle de la lignine se compose ainsi de liens interunités de type β -O-4', β -1', β -5', 5-5', β - β' et 4-O-5' (Figure 53).

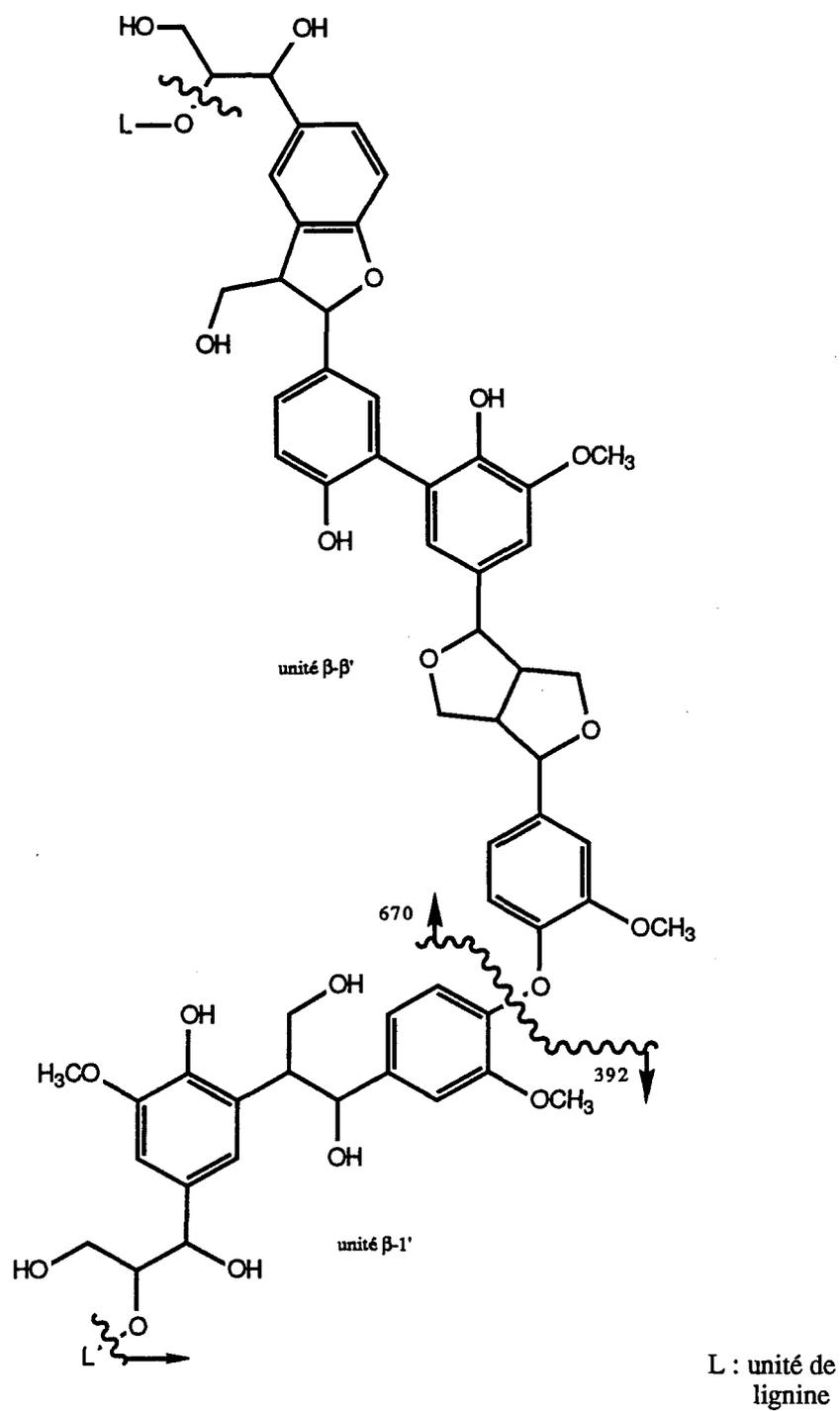


Figure 52: Schéma d'une structure de type β - β' et β -1'¹¹.

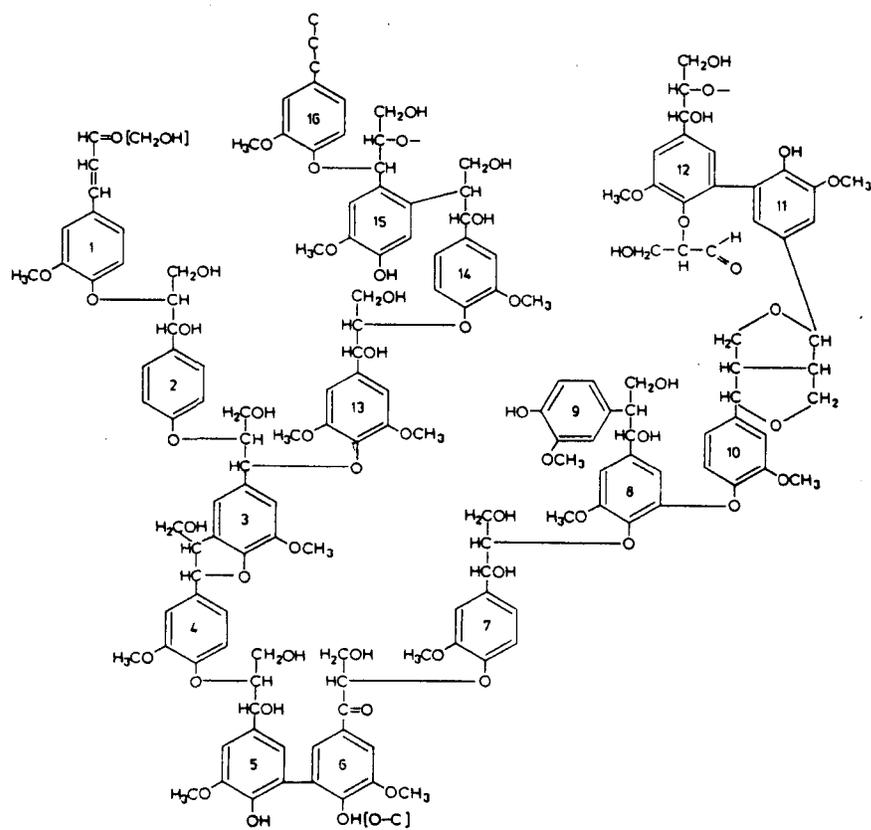


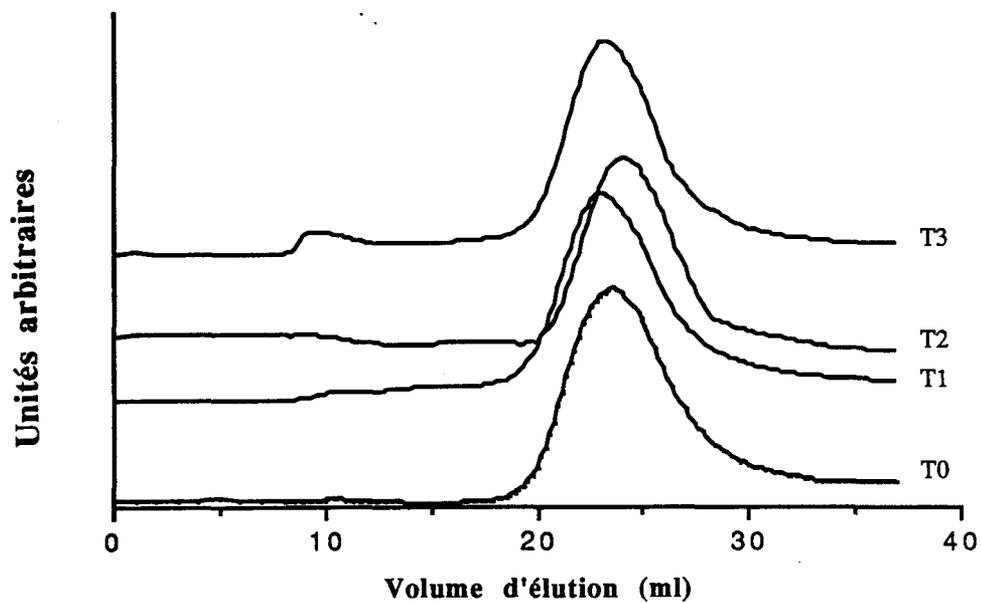
Figure 53: Structure modèle de la lignine extraite de conifère¹².

3.6 Biotransformation de la lignine de Klason

La lignine de Klason est soumise à la dégradation par l'emploi d'un basidiomycète, *Phanerochaete chrysosporium*. Les échantillons sont prélevés suivant une étape cinétique afin de vérifier l'état de la lignine après différents temps de fermentation.

Les échantillons sont analysés par chromatographie d'exclusion afin d'estimer les différentes populations de diverses masses moléculaires présentes dans la lignine. Les résultats démontrent que la lignine de Klason non biotransformée renferme deux (2) grandes populations de masses différentes. Le chromatogramme, analysé à une longueur d'onde de 280 nm, est représentatif de la littérature et donne une fonction bimodale (Connors, W.J., 1980; Chahal, D.S. et Hachey, J.-M., 1990) (Figure 54, 55 et 56). La lignine de Klason offre une faible population de l'ordre de 0,77% de masse moléculaire de 60 kDa et une population abondante de 99,23% de masse moléculaire de 1,5 kDa (tableau XXVIII).

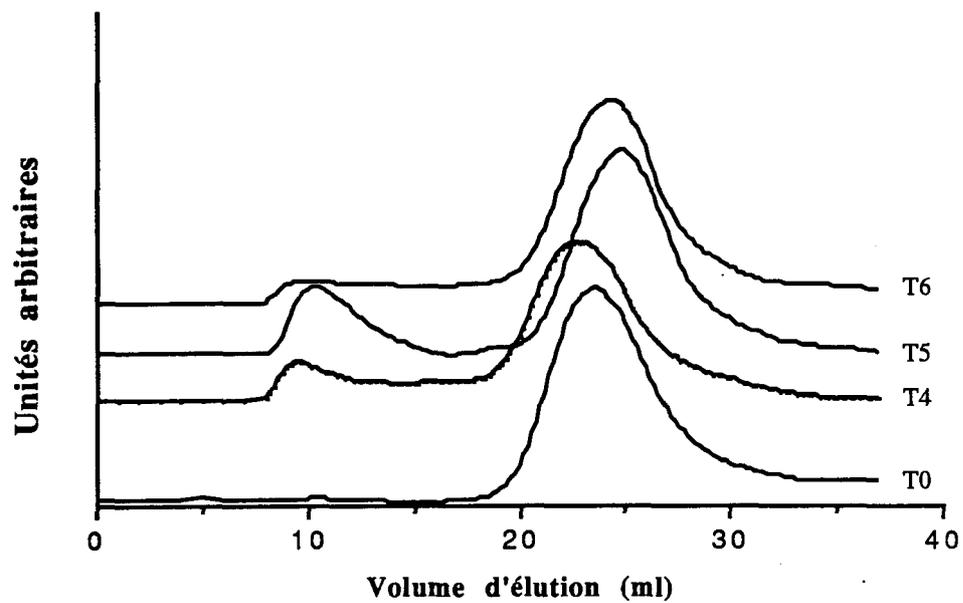
Suite à l'action du microorganisme, deux phénomènes se produisent: une augmentation de la concentration s'effectue au niveau des masses moléculaires élevées (>50 kDa) et une dépolymérisation des masses moléculaires inférieures (1 500 daltons) permettant une repolymérisation de ces fragments pour donner une population de masse moléculaire de 5 000 daltons. Pour un rendement maximal de manière quantitative correspondant à des populations de masses moléculaires élevées, le temps nécessaire à l'action du microorganisme sur la lignine de Klason est de 175 heures.



Légende: Temps de fermentation

T₀: 0 Hre
T₁: 20 Hres
T₂: 47 "
T₃: 68 "

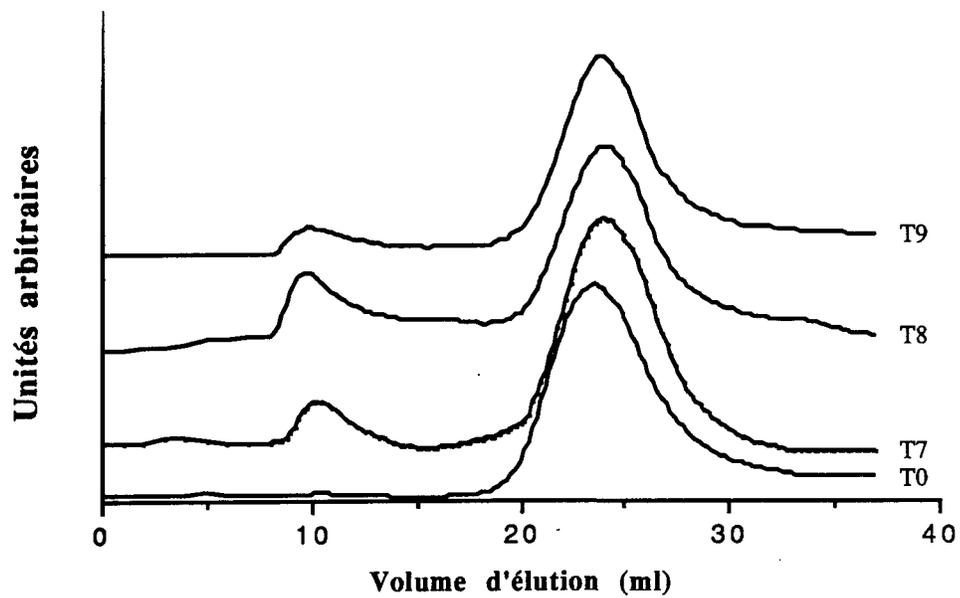
Figure 54: Chromatographe de la biotransformation de la lignine de Klason entre 0 et 68 heures.



Légende: Temps de fermentation

T₀: 0 Hre
T₄: 94 Hres
T₅: 163 "
T₆: 188 "

Figure 55: Chromatographe de la biotransformation de la lignine de Klason jusqu'à 188 heures.



Légende: Temps de fermentation

T₀: 0 Hre
T₇: 212 Hres
T₈: 238 "
T₉: 266 "

Figure 56: Chromatographe de la biotransformation de la lignine de Klason entre 212 et 266 heures.

TABLEAU XXVIII

Distribution des poids
moléculaires de la lignine de Klason
biotransformée par *Phanerochaete chrysosporium*

Temps de fermentation (Heures)	S-1 (%)	S-2 (%)	S-3(%)	S-4(%)
0	0,77	---	99,23	---
20	1,54	---	98,46	---
47	1,09	---	98,90	---
68	3,53	---	96,47	---
94	10,26	---	89,74	---
163	12,68	0,82	86,49	---
188	9,11	1,01	89,88	---
212	8,62	0,40	90,99	---
238	12,19	0,65	86,18	0,98
266	6,39	---	92,24	1,37

Légende:

S-1 : 60 000 daltons

S-2 : 5 000 daltons

S-3 : 1 500 daltons

S-4 : 700 daltons

Cette fermentation conduit à l'apparition d'unités de masse moléculaire de 5 000 daltons et au maintien des unités de 60 000 et de 1 500 daltons de masse moléculaire (Figure 57).

Après 175 heures de fermentation, deux (2) autres phénomènes s'observent: la population de 60 000 daltons se dépolymérise pour former des fragments plus petits permettant l'augmentation de la concentration des unités de 1 500 daltons. Aussi, les unités de masse moléculaire de 5 000 daltons subissent l'effet de dépolymérisation pour produire des unités de masse moléculaire de 700 daltons (Figure 58).

Au bout de 266 heures de fermentation à une température de 25° C, il est estimé que les unités de masses moléculaires de 60 000 daltons et de 5 000 daltons sont sensiblement disparues pour finalement produire des populations de masses moléculaires de 1 500 daltons et de 700 daltons. Des études antérieures ont observées les mêmes phénomènes de polymérisation et de dépolymérisation (Cyr, N., 1988; Trojanowski, A. , 1987; Larouche, R. et al, 1991; 1992).

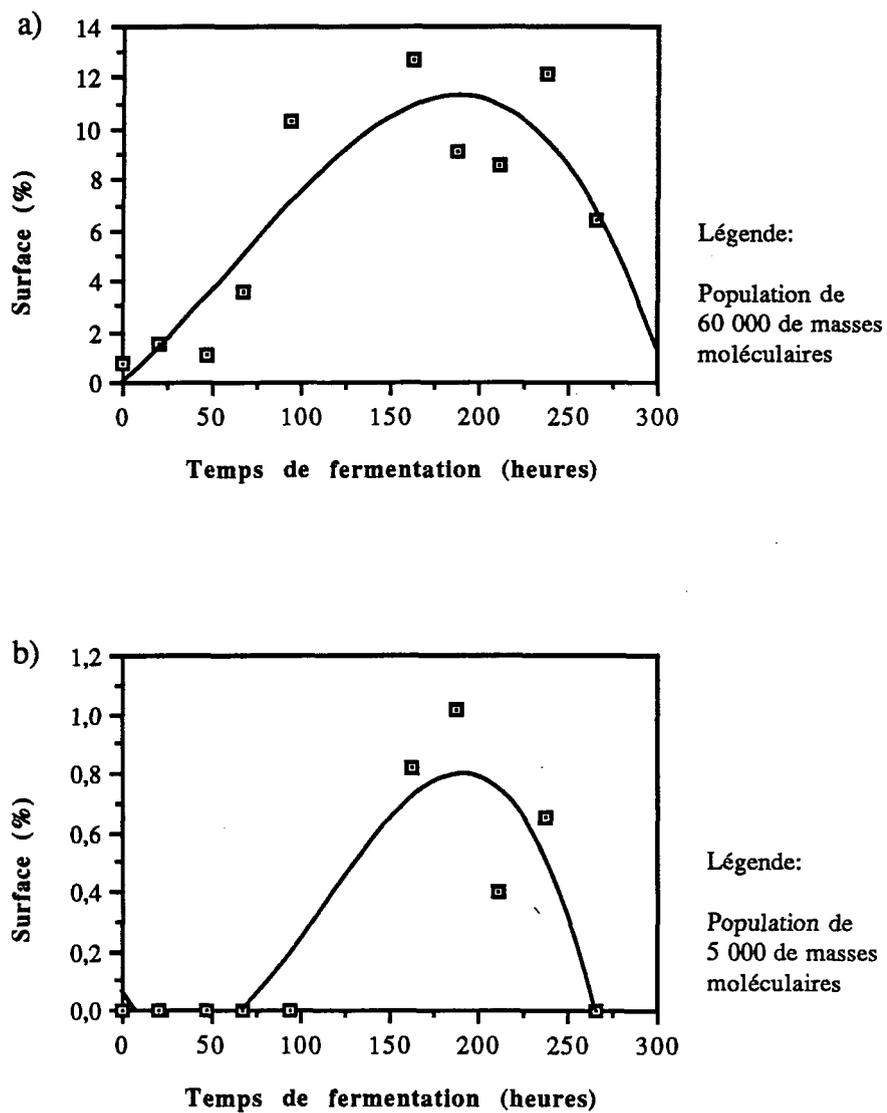


Figure 57: Evolution de la biotransformation de la lignine pour les hautes masses moléculaires.

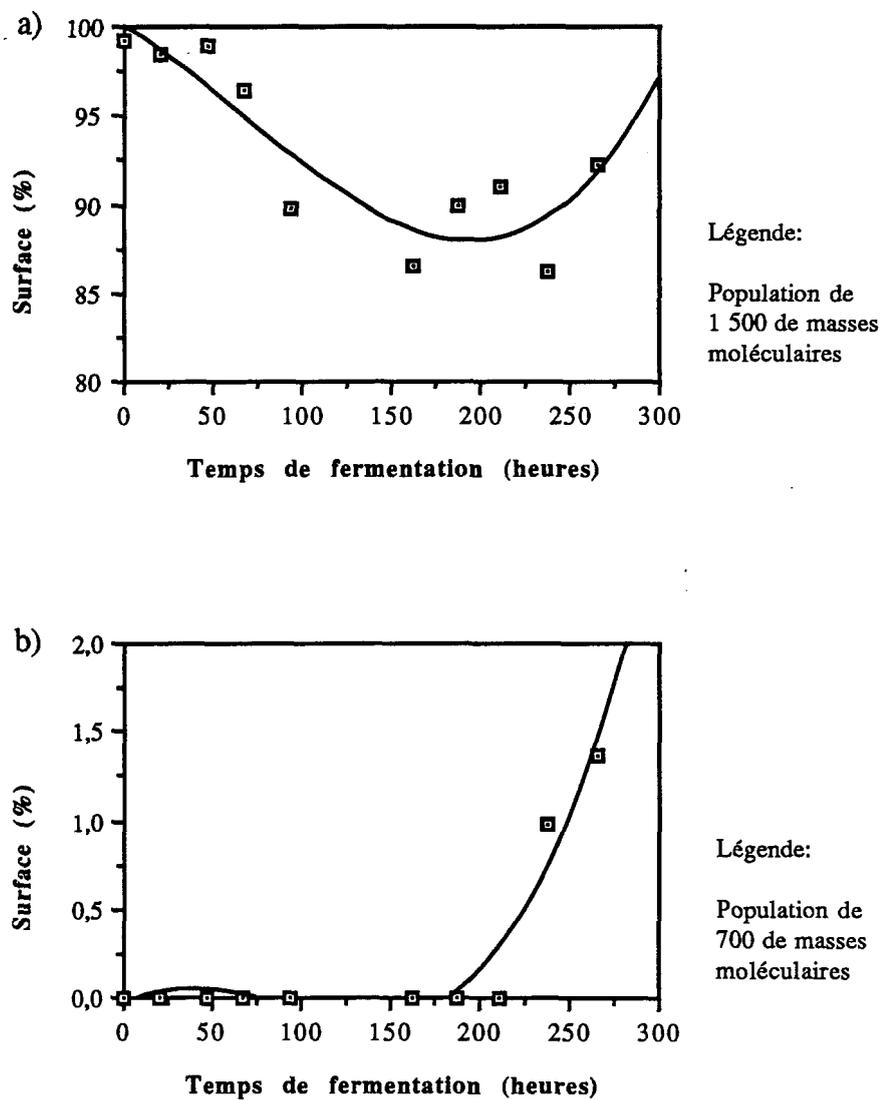


Figure 58: Evolution de la biotransformation de la lignine pour les faibles masses moléculaires.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

L'analyse de la lignine de Klason extraite, de l'épinette blanche, *Picea glauca* (Moench) Voss, a exigé la combinaison de différentes techniques spectroscopiques et analytiques afin d'identifier certaines unités de base constituant une partie de sa structure.

La caractérisation des extraits d'épinettes blanches a permis l'identification de plusieurs extractibles. L'utilisation d'un extracteur soxhlet opérant avec un mélange de solvant (toluène-éthanol) s'est avéré efficace. La technique d'extraction par soxhlet a permis l'isolation des différents extractibles. Plus d'une trentaine de composés ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à un spectromètre de masse. Certains acides résiniques contenus dans la biomasse ont pu être identifiés et les plus importants sont: l'acide sandracopimarique, isopimarique, tétra hydroabiétique, déhydroabiétique et l'acide néoabiétique.

La lignine de Klason obtenue contient deux (2) types d'unités phénylpropanoïdes: les unités guaiacyles et para-hydroxyphényles. Ces unités ont été déterminées par trois (3) méthodes spectroscopiques différentes: l'infrarouge, la RMN du carbone-13 et la spectrométrie de masse par atomes rapides (FAB/MS).

Les analyses spectroscopiques infrarouges ont déterminé la présence de groupements guaiacyles ainsi que diverses fonctions cellulosiques. Les échantillons de bois brut et de bois sans extractibles indiquent la présence des constituants cellulosiques et hémicellulosiques comparativement à l'échantillon de lignine de Klason. Les résultats obtenus par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone-13 et par

spectrométrie de masse par atomes rapides ont également permis d'élucider certains modèles dimériques de base de la lignine. Les structures dimériques identifiées comportent principalement de liens interunités de type β -O-4'. Des structures trimériques, tétramériques et pentamériques sont également proposées.

La spectroscopie RMN du carbone-13 et infrarouge suggèrent sept (7) groupements fonctionnels caractéristiques de la lignine. Ces fonctions sont les suivantes: les aldéhydes et cétones, les acides carboxyliques, les carbones aromatiques tertiaires et quaternaires, les groupements méthoxyles (OCH_3) et les carbones aliphatiques.

L'étude de la biotransformation de la lignine de Klason par *Phanerochaete chrysosporium* démontre certains mécanismes de polymérisation et de dépolymérisation. L'étude de la distribution des masses moléculaires a été effectuée par chromatographie de perméation sur gel. Au bout de 175 heures de fermentation, la concentration des unités de masses moléculaires élevées est optimum et montre un phénomène de repolymérisation dans des unités de masses moléculaires élevées (60 000 et 5 000 daltons). Après 175 heures, une dépolymérisation s'effectue au détriment des masses moléculaires élevées pour former des fragments de plus petites masses moléculaires (1 500 et 700 daltons). Il est observé qu'au bout de 266 heures de biotransformation, 10% de la lignine initiale de masse moléculaire de 1 500 a pu être dégradée au profit d'unités de masses moléculaires plus faibles (700 daltons).

BIBLIOGRAPHIE

Abraham, R.J., 1990. Introduction to NMR spectroscopy. Ed. John Wiley & Sons Ltd, 280p.

Anlgren, P. et Goring, D., 1971. William analysis of acid soluble lignin. Can J. Chem., 49, 1272.

Arnaud, P., 1983. Cours de chimie organique. Ed. Gauthier-Villars, Paris, Bordas, 505p.

Bock, K. et Pedersen, C., 1983. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, 41, 27-65.

Browning, B.L., 1967. Methods of wood chemistry, vol.2. Interscience publishers, John Wiley & Sons, New York, 812p.

Chahal, D.S. et Hachey, J.-M., Use of hemicelluloses and cellulose and degradation of lignin by *Pleurotus sajor-caju* grown on corn stalks; In Agricultural and synthetic polymers: Biodegradability and utilisation. ACS Symposium series 433, Glass, J.E. et Swift, G.(Eds), American chemical society, Washington, 1990, 304-310.

Chahal, D.S. et Khan, S.M., 1991. Production of mycelial biomass of oyster mushrooms on rice straw. Mushroom science vol.13.

- Connors, W.J., et Sarkanen., 1980. Gel chromatography and association complexes of lignin. *Holzforchung*, 34, 80-85.
- Cyr, N., Eloffson, R.M., Ripmeester, J.A., 1988. Study of lignin in forages and wood by carbon-13 CP/MAS NMR. 1. Some evidence of polymerization and depolymerization. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 6, 1197-1201.
- Durig, D.T., Esterle, J.S., Dickson T.J. et Durig, J.R., 1988. An investigation of chemical variability of woody peat by FT-IR Spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 42, 7, 1239-44.
- Evliya, E., 1989. C-13 NMR studies of a dehydropolymer (DHP) from isoeugenol; comparison with spruce lignin. *Holzforchung* 43, 61-64.
- Faix, O., et Beinhof. O., 1988. FTIR Spectra of milled wood lignins and lignin polymer model (DHP's) with enhanced resolution obtained by deconvolution. *J. of Wood Chemistry and technology*, 8, 4, 505-522.
- Fengel, D. et Wegener, G., 1984. *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, New York, 613p.
- Funaoka, M., et Abe, I., 1989. Rapid separation of wood into carbohydrate and lignin with concentrated acid-phenol system. *Tappi*, 72, 8, 145-149.

- Fukagawa, N., Meshitsuka, G., et Ishizu, A., 1991. A two-dimensional NMR study of birch milled wood lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 11, 3, 373-396.
- Fukagawa, N., Meshitsuka, G., et Ishizu, A., 1992. Isolation of a rich end-wise lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 12, 1, 91-109.
- Granath, K.A., 1967. Molecular weight distribution analysis by gel chromatography on sephadex. *J. Chromatography*, vol. 28, 69-81.
- Helrich, D.E. Kenneth, 1990. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 50 ed., Virginia, USA.
- Hachey, J.-M. et Simard, S., 1987. Extraction and analysis of the essential oil of the needles and twigs of white spruce *Picea glauca* (Moench) Voss. *J. of Wood Chemistry*; 7, 3, 333-341.
- Hachey, J.-M., et Larouche, R., 1992. Caractérisation de la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss. par RMN à l'état solide. *Annales de l'ACFAS*, Montréal, 471p.
- Hachey, J.-M., 1992. Note de cours: analyse structurale spectroscopique. UQAC, Sc. Fondamentales, 160p.

- Hassi, H.Y., Aoyama, M., Tai, D., Chen, C.L., et Gratzl, J.S., 1987. Substituent effects on ^{13}C chemical shifts of aromatic carbons in β -O-4 and β -5 type lignin model compounds. *J. Wood Chem.* 7, 4, 555-581.
- Hatfield, G.R., Maciel, G.E., Erbatur O., et Erbatur G., 1987. Qualitative and quantitative analysis of solid lignin samples by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* 59, 172-179.
- Higuchi, T., Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls; In *Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications*, vol.1. CRC Press, Inc., Kirk, T.K., Higuchi, T. et Chang, H.-M.(Eds), 1985, 237p.
- Himmelsbach, D.S., et Barton II, F.E., 1980. ^{13}C nuclear magnetic resonance of grass lignins. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1203-1208.
- Katayama, T. et Sogo, M., 1986. Degradation and stereoselective reduction of an α -ketone derivative of guaiacylglycerol- β -vanillin ether, a lignin substructure model, by *Fusarium solani* M-13-1. *Holzforschung*, 40, 175-182.
- Katrizky, A.R. et Topsom, R.D., 1977. *Chem. Ren.*, 639-658.
- Kern, H.W., 1983. Transformation of lignosulfonates by *Trichoderma harzianum*. *Holzforschung*, 37, 109-115.

- Kringstad, K.P. and Mörck, R., 1983. C-13 NMR spectra of kraft lignins. *Holzforschung* 37, 237-244.
- Lapierre, C., et Monties, B., 1987. RMN C-13 bidimensionnelle des lignines de peuplier: Étude des corrélations entre atomes de carbone et réexamen par la méthode INADEQUATE des attributions des signaux du spectre. *Holzforschung* 41, 51-58.
- Larouche, R., Hachey, J.-M., et Chahal, D.S., 1991. Extraction et caractérisation physicochimique de lignines extraites de conifères. *Annales de l'ACFAS, Sherbrooke*, 392p.
- Larouche, R., Hachey, J.-M., et Chahal, D.S., 1992. Biotransformation de lignines extraites de l'épinette blanche *Picea glauca* (Moench) Voss. par *Phanerochaete chrysosporium*. *Annales de l'ACFAS, Montréal*, 143p.
- Lauriault, J., 1988. Guide d'identification des arbres du Canada. Éditions Marcel Broquet inc., LaPrairie, 551p.
- Leary, G.J., Newman, R.H., et Morgan, K.R., 1986. A carbon-13 nuclear magnetic resonance study of chemical processes involved in the isolation of Klason lignin. *Holzforschung*, 40, 267-272.

Lee, D.S., et Perlin, A.S., 1983. Use of methanolysis in the characterization of O-(2-hydroxypropyl)cellulose by C-13 NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 124, 172-175.

Maciel, G.E., O'Donnell, D.J., Ackerman, J.J.H., Hawkins, B.H. and Bartuska, V.J., 1981. A ^{13}C NMR study of four lignins in solid and solution states. *Makromol. Chem.*, 182, 2297-2304.

Mandels, M., et Weber, J., 1969. The production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.*, 95, 391-414.

Morck, R., Yoshida H., et Kringstad, K.P., 1986. Fractionation of kraft lignin by successive extraction with organic solvents: Functional groups, C-13 NMR and molecular weight distribution. *Holzforschung* 40, 51-60.

Mullins, E.J. et McKnight, T.S., 1981. *Les bois du Canada: Leurs propriétés et leurs usages*. Éditions du Pélican, 509p.

Owen, N.L. et Thomas, D.W., 1989. Infrared studies of "hard" and "soft" woods. *Applied spectroscopy*, 43, 3, 451-455.

Pasto, Daniel J. et Johnson, Carl R., 1979. *Laboratory text for organic chemistry*. Prentice-Hall, New Jersey, 542p.

- Pellinen, J., 1985. High performance size-exclusion chromatography of lignin. *J. of chromatography*, 328, 299-308.
- Pharmacia cie, 1985. Filtration sur gel, théorie et pratique. Pharmacia Fine Chemicals, 63p.
- Robert, D., Mollard, A., et Barnoud, F., 1989. ^{13}C NMR qualitative and quantitative study of lignin structure synthesized in *Rosa glauca* calluses; *Plant Physiol. Biochem*; 27, 2, 297-304.
- Robert, D., et Chen, C.L., 1989. Biodegradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*: Quantitative analysis of biodegraded spruce lignins by ^{13}C NMR spectroscopy. *Holzforschung* 43, 5, 323-332.
- Roquebert, Marie-France, 1986. Moisissure, nuisances et biotechnologie. Éd. Le Rocher, Coll. Science et Découverte, 177p.
- Sanders, J.K.M. et Hunter, B.K., 1988. Modern NMR spectroscopy: A guide for chemists. Oxford University Press, 308p.
- Schoemaker, H.E., Meijer, E.M., Leisola, M.S.A., Haemmerli, S.D., Waldner, R., Sanglard, D., and Schmidt, H.W.H., Oxidation and reduction in lignin biodegradation. In *Plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation*, ACS Symposium series 399, Lewis, Norman G., Paice, Michael G. (Eds), American chemical society, Washington, 1989, 454-471.

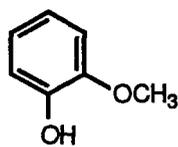
- Schultz, T.P. and Glasser, W.G., 1986. Quantitative structural analysis of lignin by diffuse reflectance fourier transform infrared spectrometry. *Holzforschung*, 40, 37-44.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. and Morrill, T.C., 1991. Spectrometric identification of organic compounds. Ed. John Wiley & Sons, 4^{ed}, 419p.
- Sjöström, E., 1981. Wood chemistry: Fundamentals and applications. Academic Press inc., Orlando, 223p.
- Sjöholm, R., Holmbom, B., et Akerback, N., 1992. Studies of the photodegradation of spruce lignin by NMR spectroscopy. *J. of Wood Chem. and technol.*, 12, 1, 35-52.
- Taylor, M.G., Deslandes, Y., Bluhm, T. et Marchessault, R.H., 1983. Solid state ¹³C NMR characterization of wood. *Tappi Journal*, 66, 6, 92-94.
- Torsell, Kurt B. G., 1983. Natural product chemistry: A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. Ed. John Wiley & Sons limited. New York, 401p.
- Vogel, A.I., 1978. Textbook of practical organic chemistry including qualitative organic analysis. 4^{ième} éd., Longman Group Limited London, 1368p.

- Watanabe T., et Koshijima, T., 1988. Application of APT pulse sequence to facilitate C-13 NMR analysis of lignin. *Wood Res.*, 75, 41, 13-20.
- Yildirim, H. et Holmbom, B., 1978. Investigations on the wood extractives of pine species from turkey: Composition of fatty and resin acids in *Pinus silvestris* and *Pinus nigra*. *Acta Academiae Aboensis, Ser. B.*, 37, 4, 1-6.
- Zech, W., Johansson, M.-B., Haumaier, L. and Malcolm, R.L., 1987. CPMAS ¹³C NMR and IR spectra of spruce and pine litter and of the Klason lignin fraction at different stages of decomposition. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 150, 262-265.

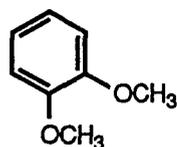
ANNEXE

Structures tirées des références suite à des interprétations

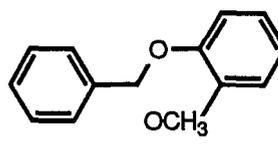
a) Structures tirées de la référence no.1:



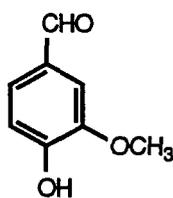
1



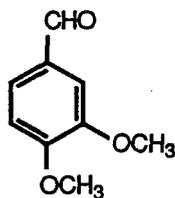
2



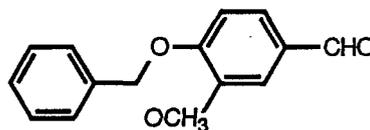
3



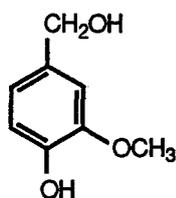
4



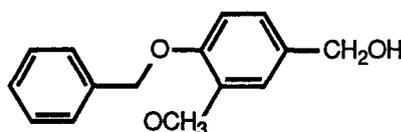
5



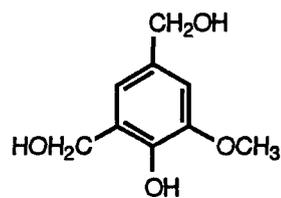
6



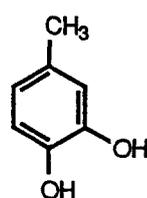
7



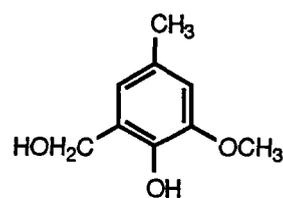
8



9

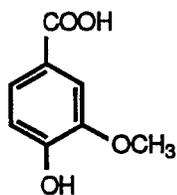


11

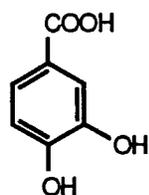


12

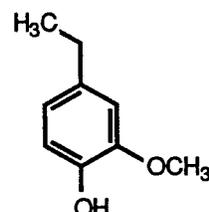
Structures tirées de la référence no.1: (suite)



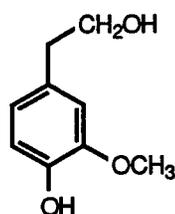
13



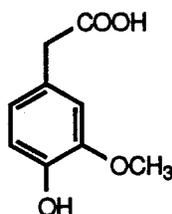
14



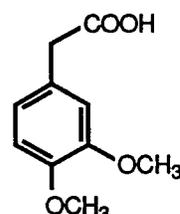
15



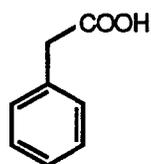
16



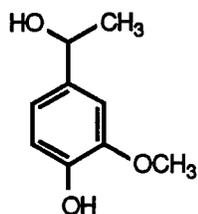
17



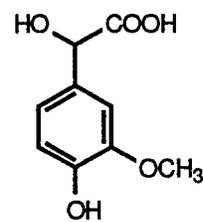
18



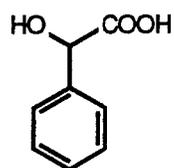
19



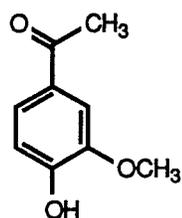
20



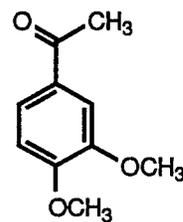
21



22

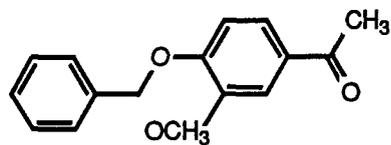


23

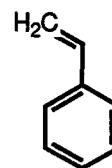


24

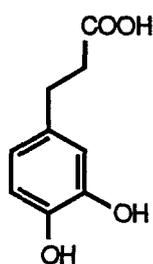
Structures tirées de la référence no.1: (suite)



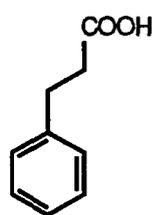
25



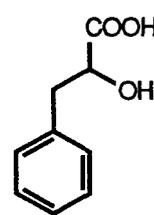
26



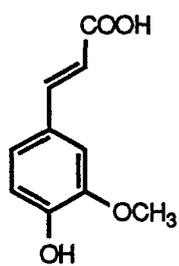
27



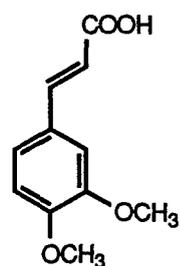
28



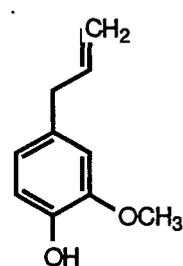
29



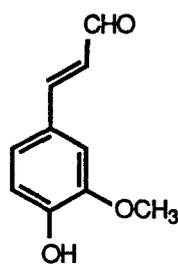
30



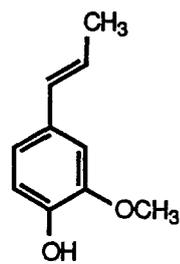
31



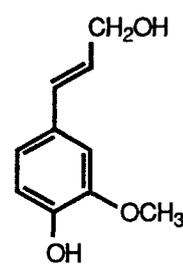
32



33

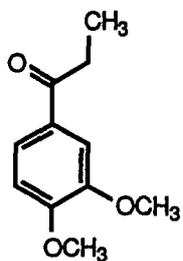


34

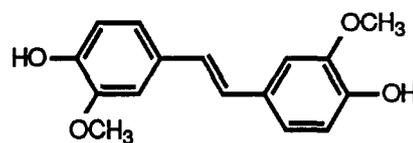


35

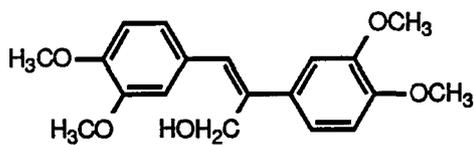
Structures tirées de la référence no.1: (suite)



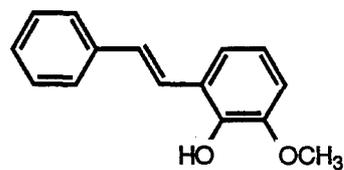
36



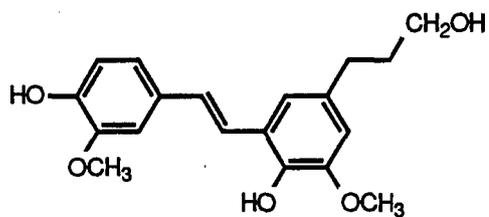
37



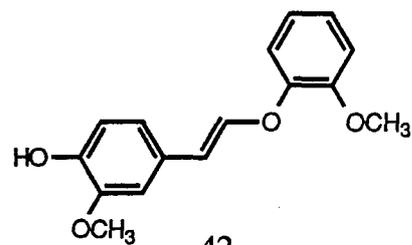
38



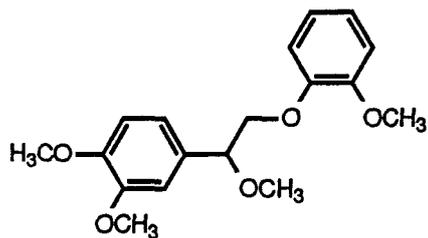
40



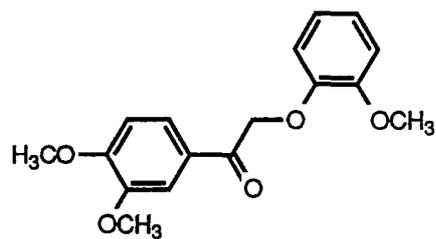
41



42

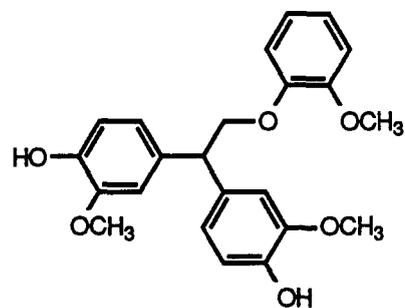


43

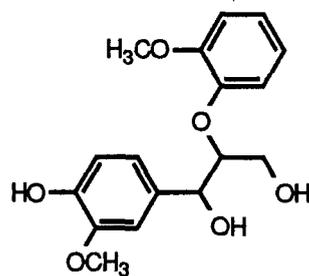


44

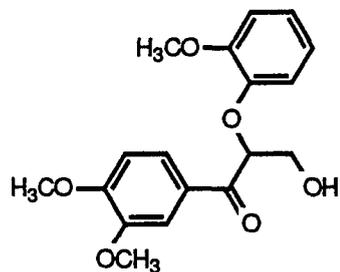
Structures tirées de la référence no.1: (suite)



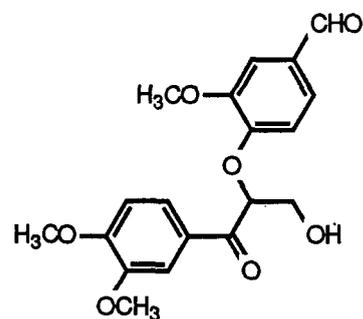
45



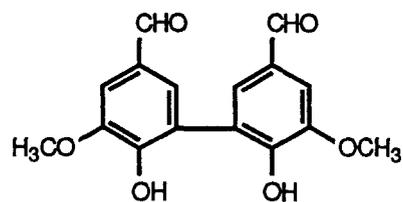
47



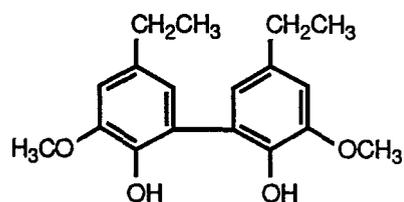
48



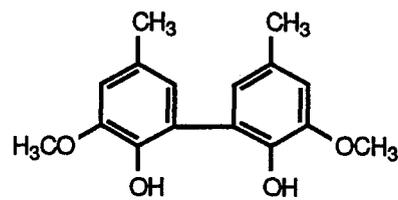
49



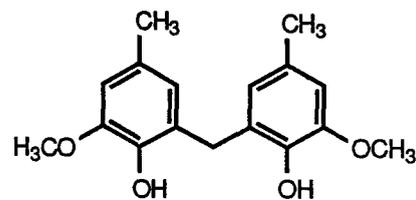
51



52

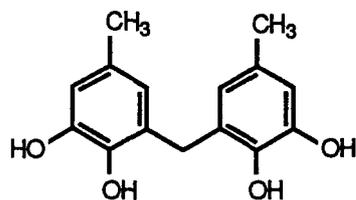


53

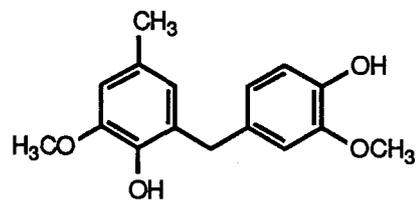


54

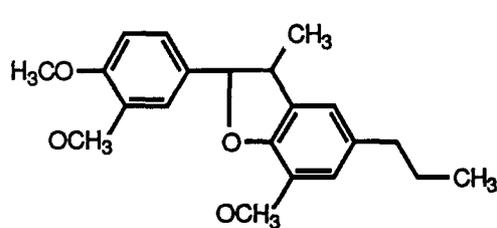
Structures tirées de la référence no.1: (suite)



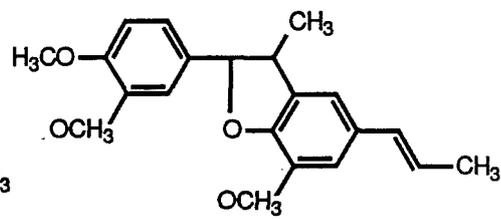
55



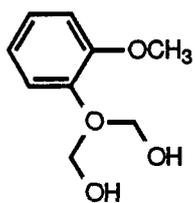
56



57

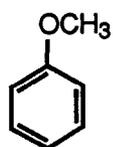


58

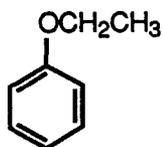


59

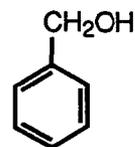
b) Structures tirées de la référence no.9:



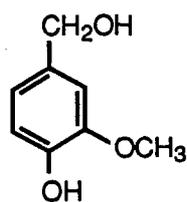
2



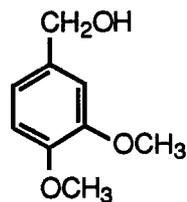
3



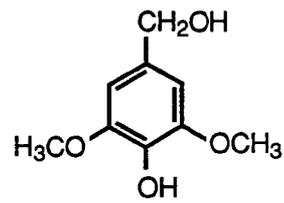
4



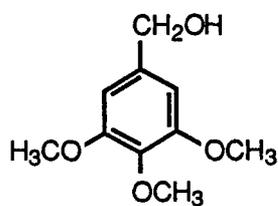
5



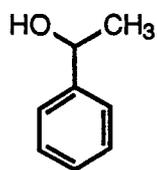
6



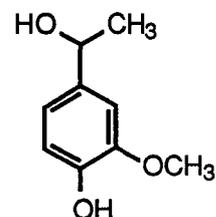
7



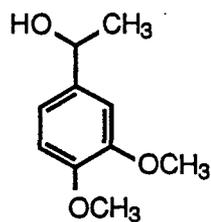
8



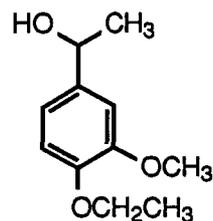
9



10

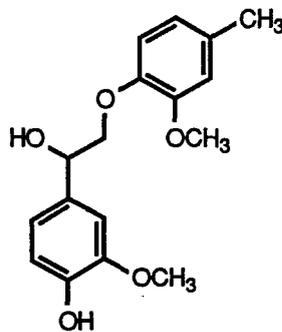


11

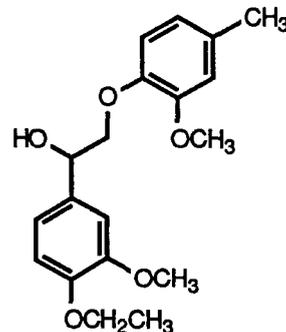


12

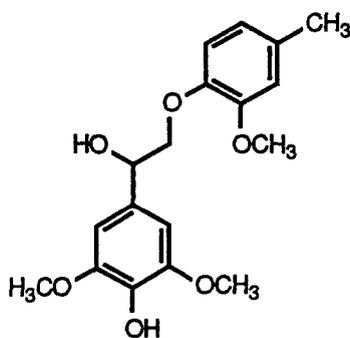
Structures tirées de la référence no.9: (suite)



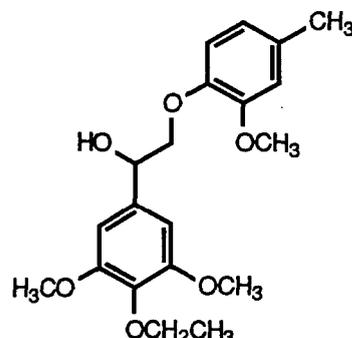
15



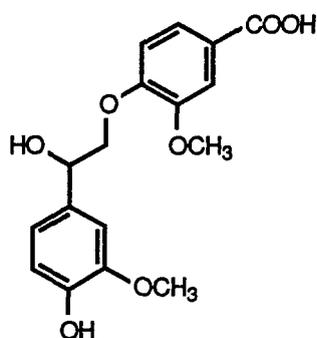
16



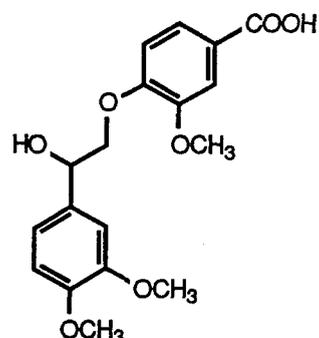
17



18

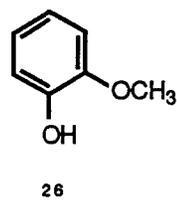
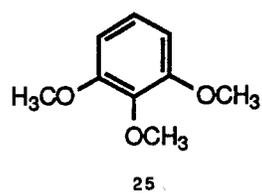
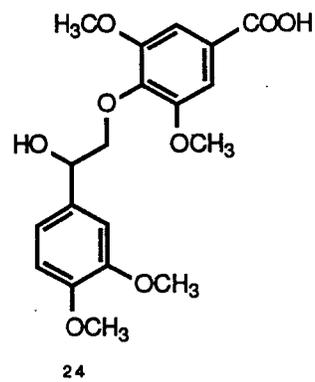
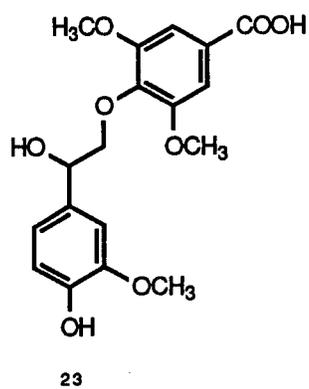
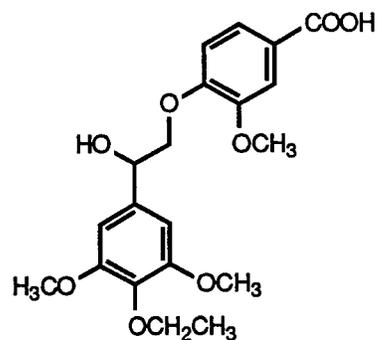
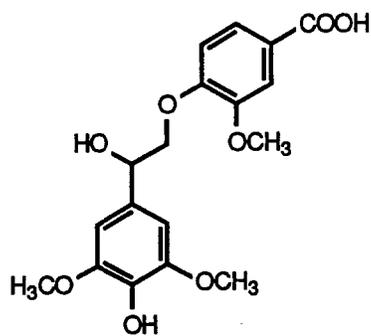


19

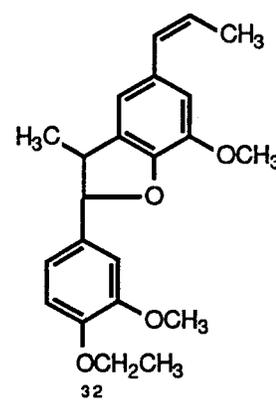
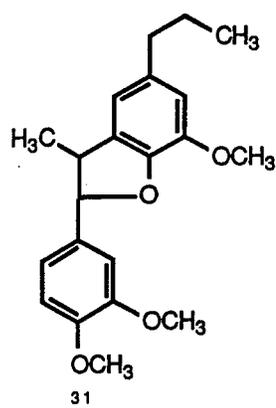
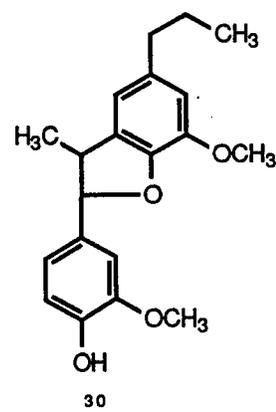
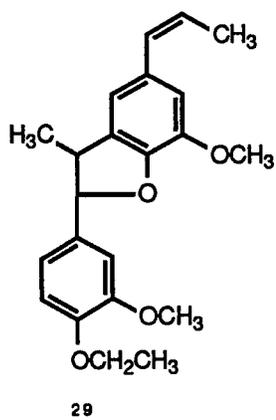
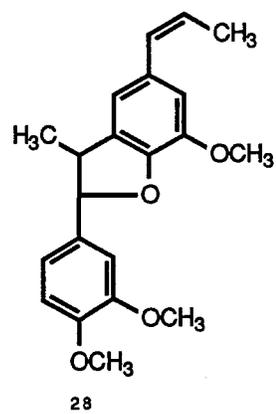
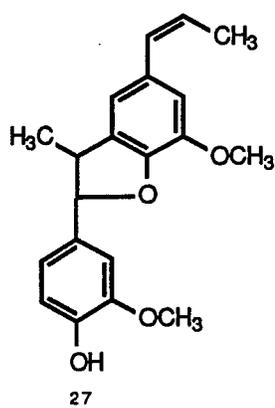


20

Structures tirées de la référence no.9: (suite)



Structures tirées de la référence no.9: (suite)



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