



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

U. F. R. ENSTIB

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits et Environnement

Département de Formation Doctorale Sciences du Bois

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

Spécialité : Sciences du bois et des fibres

par

Wenceslas Steeve MOUNGUENGUI

Caractérisation HPLC de marqueurs permettant de prévoir l'évolution de certaines propriétés macroscopiques du bois lors de différents processus de dégradation

Soutenue publiquement le 08 juillet 2008 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : M. Bernard De JESO, Professeur, Université Bordeaux 1
M. Joris VAN ACKER, Professeur, Université de Ghent

Président : M. Antonio PIZZI, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy-I

Examineurs : M. Stéphane DUMARCAY, Maître de Conférences, Université Henri Poincaré, Nancy-I

Examineurs : M. Philippe GERARDIN, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy-I

**A mes parents
A Céline Nimeskern**

*A ma famille au GABON
A ma chérie Céline
A mes ami(e)s
A mon groupe de travail de l'USTM*

Balle et Stela vous aurez été fières de moi

Remerciements

Un ancien étudiant de l'équipe m'avait, en son temps entretenu du rôle prépondérant de l'équipe dans laquelle j'évolue au sein du laboratoire. Le sujet de thèse en lui-même a certes son importance, mais comment ne pas se passionner pour un sujet quand les relations humaines sont excellentes. Comment ne pas apprécier à sa juste valeur un environnement scientifique de qualité, avec les conseils, les encouragements, les coups de main, ou tout simplement les multiples sourires des membres de l'équipe.

Je désire exprimer ma profonde gratitude accompagnée de l'expression de mon respect à Philippe GERARDIN, mon directeur de thèse. Ce travail n'aurait pu voir le jour sans sa confiance. Je lui suis reconnaissant pour son soutien constant, de la période d'apprentissage d'utilisation des appareils jusqu'à la phase finale de la rédaction de cette thèse. Il a mis à ma disposition les moyens nécessaires à cette étude. Je le suis également pour ses conseils, sa disponibilité et ses multiples corrections et critiques qui ont permis à ce travail de prendre forme.

Ma profonde gratitude va à Stéphane DUMARCAY. J'ai eu le privilège d'avoir été encadré de façon exemplaire par quelqu'un de dynamique, doué et courageux. Sans doute mes contributions scientifiques au niveau international et européen doivent beaucoup à son aide et à ses encouragements.

J'exprime ma vive reconnaissance à Mathieu PETRISSANS pour son soutien, sa disponibilité et notamment pour ses interprétations de certains résultats du traitement thermique qui m'ont souvent été d'un précieux secours.

Ma reconnaissance s'adresse aux personnes qui ont rendu la réalisation de cette thèse possible, et bien plus encore à ceux qui l'ont rendue agréable. Cette longue relation entre ma Thèse et moi a connu ses hauts et ses bas, mais j'y ai pris en grande majorité un plaisir énorme.

Je voudrais remercier chaleureusement chacun des membres du jury qui me font le grand honneur d'y participer.

Je remercie vivement le Professeur Joris VAN ACKER de l'université Ghent en Belgique et le Professeur Bernard De JESO de l'université de Bordeaux 1 malgré la longue distance pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, je leur suis très reconnaissant du temps qu'ils y ont consacré.

Remerciements

Je voudrais également remercier le Professeur Antonio PIZZI de l'université Henri Poincaré, Nancy-I, d'avoir accepté de présider ce jury. Je tiens à remercier Eric Gelhaye et son équipe, interactions arbres et microorganismes (IAM) dirigé par Jean Pierre Jacquot à l'origine de mes analyses enzymatiques.

Je tiens tout particulièrement à remercier mlle Nimeskern Céline, ma chérie sans qui je ne serais que la moitié de moi-même et qui n'a jamais douté de moi et m'a toujours soutenu durant les moments difficiles de cette thèse. Enfin, j'adresse mes profonds remerciements à mes grands parents MOUNGUENGUI Médard et BINDÉLÉ Louise sans qui je ne serais rien aujourd'hui, eux qui ont toujours été là lorsque j'étais dans le doute et le besoin. Je tiens également à remercier toute ma famille, qui a toujours été à l'écoute et m'a soutenu durant les périodes difficiles de ma thèse. Je voudrais remercier les enseignants du département de biologie de l'université des sciences et techniques de Massuku (USTM), à savoir Dr Brama Ibrahim et Dr Attéké Nkoulembélé pour m'avoir toujours encouragé depuis mon départ du Gabon voilà bientôt sept ans. Je souhaite exprimer ma reconnaissance et mon amitié au professeur Jean Demarkoy, au Dr Charbonnier Maryse et au Dr Nathalie le Borgne de Castel, pour leur aide et soutien moral tout au long de mon passage à l'université de Bourgogne et durant ma thèse. Je remercie tous ceux qui m'ont apporté leurs connaissances ou leur soutien au sein du laboratoire grâce auxquels ces années resteront pour moi plus qu'une aventure scientifique: Hakkou Mohamed, Kamal, Ludovic, Koumbi Mounanga Thierry, Lekounougou Serge, Mounir, Nguila Inari, Pwaty Bouda, Ondo Priva, Serenrosso Stéphanie, Wiam à qui je dois mes plus beaux fous rires et le partage d'intenses moments.

Je tiens à exprimer mes vives remerciements à tous ceux qui m'ont accordé leur amitié tout au long de ces années: Guyetsou Michelle, Mandy Lidie, Manomba Natacha, Mussavu verlainne et Tchalou Myriam. A vous tous qui distribuez généreusement vos virus dans mon pc, ou qui continuez inlassablement à venir me chercher quand il est l'heure d'aller manger.

Je tiens à remercier tous les stagiaires que j'ai rencontrés et/ou encadrés au cours de ces années de ma thèse, tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse.

Liste des abréviations

AAD: Aryl alcool déshydrogénase

AAO: Aryl alcool oxydase

ADP : Adénosine diphosphate

An : Antrodia sp

ATP : Adénosine triphosphate

ATR : Spectroscopie infrarouge à réflexion totale

AU: Unité d'absorbance

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

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

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CRITT : Centre de recherche et des industries du bois

DDAC: Didecyl dimethyl ammonium chloride

ELSD : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse et couplée à la spectroscopie de masse

GLOX: Glyoxal oxydase

h : Heure

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HIV-1 : Virus de l'immunodéficience humaine-1

HR: Humidité relative

IPBC: 3-iodo-2-propynyl-N-butyl carbamate

IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de fourier

KBr : Bromure de potassium

LCC : Complexe lignine - carbohydrate

M: mole

Mg: milligramme

MHz: millihertz

Min: minute

mL : millilitre

N: normal

Nm: nanomètre

PAL: Phenylalanine Ammoniac Lyase

Pc : Phanerochaete chrysosporium

PDA : détecteur à barrette de diode

ppm: partie par million

QR : quinone réductase

RMN-CP MAS : Résonance magnétique nucléaire du solide (cross-polarisation / magic angle spinning)

T: témoin

TFA : acide trifluoroacétique

VTT: Centre National de la Recherche Technique de FINLANDE

UV : ultraviolet

XPS: Spectroscopie de photoélectrons X

µg: microgramme

Sommaire

Sommaire

1. Introduction.....	1
2. Rappels bibliographiques.....	3
2.1. Rappels sur la structure et l'anatomie du bois.....	3
2.1.1. Structure du bois, de l'arbre aux constituants macromoléculaires de base.....	3
2.1.2. Anatomie du bois.....	5
2.2. Composition chimique du bois.....	7
2.2.1. La cellulose.....	8
2.2.2. La lignine.....	9
2.2.3. Les hémicelluloses.....	10
2.2.4. Les extractibles.....	13
2.2.4.1. <i>Cires et graisses</i>	13
2.2.4.2. <i>Composés terpéniques</i>	14
2.2.4.3. <i>Les composés phénoliques</i>	16
a) <i>Les phénols simples</i>	16
b) <i>Les Stilbènes</i>	17
c) <i>Les lignanes</i>	18
d) <i>Les flavonoïdes</i>	19
e) <i>Les tannins hydrolysables et condensés</i>	22
2.2.5. Les minéraux.....	25
2.3. Méthodes d'analyses utilisées pour les composés du bois.....	25
2.3.1. Fractionnement du matériel.....	25
2.3.1.1. <i>Minéraux</i>	25
2.3.1.2. <i>Extractibles</i>	25
2.3.1.3. <i>Lignine</i>	26
2.3.1.4. <i>Holocellulose</i>	26
a) <i>Hémicelluloses</i>	27
b) <i>Cellulose</i>	27
2.3.2. Analyses des modifications intervenant sur les polymères du bois.....	28
2.3.2.1. <i>La spectroscopie infrarouge</i>	28
2.3.2.2. <i>La résonance magnétique nucléaire</i>	29
2.3.2.3. <i>La spectroscopie de photoélectrons X</i>	30

2.3.3. Analyses des extractibles.....	31
2.3.3.1. <i>La résonance magnétique nucléaire.....</i>	31
2.3.3.2. <i>La chromatographie en phase gazeuse.....</i>	32
2.3.3.3. <i>La chromatographie liquide haute performance.....</i>	33
2.4. Dégradation fongique du bois et marqueurs potentiels.....	35
2.4.1. Agents de dégradation fongique.....	35
2.4.1.1. <i>Les champignons de coloration.....</i>	35
2.4.1.2. <i>Les champignons de pourriture molle.....</i>	36
2.4.1.3. <i>Les champignons de pourriture cubique brune.....</i>	36
2.4.1.4. <i>Les champignons de pourriture blanche.....</i>	36
2.4.2. Biodégradation de la lignine.....	37
2.4.3. Biodégradation des polysaccharides.....	38
2.4.4. Biodégradation des extractibles.....	40
2.4.5. Mise en évidence de la dégradation du bois par les champignons.....	41
2.5. Dégradation thermique du bois et marqueurs potentiels.....	44
2.5.1. Principes du traitement thermique.....	44
2.5.2. Avantages et inconvénients.....	46
2.5.3. Marqueurs potentiels du traitement thermique du bois	47
2.5.3.1. <i>Composition chimique du bois traité thermiquement.....</i>	47
2.5.3.2. <i>Composés extractibles formés lors du traitement thermique.....</i>	48
2.5.3.3. <i>Autres méthodes faisant appels à des techniques indirectes.....</i>	48
3. Matériels et méthodes.....	50
3.1. Matériels.....	50
3.1.1. Matériel végétal.....	50
3.1.2. Les champignons.....	50
3.1.3. Produits chimiques utilisés.....	50
3.2. Méthodes.....	51
3.2.1. Dégradation des éprouvettes par les champignons.....	51
3.2.1.1. <i>Préparation des échantillons de bois.....</i>	51
3.2.1.2. <i>Méthode d'imprégnation</i>	52
3.2.1.3. <i>Confrontation des éprouvettes aux champignons.....</i>	54
3.2.2. Analyse des extractibles.....	56
3.2.2.1. <i>Extraction</i>	56

3.2.2.2. <i>Analyses chromatographiques</i>	56
3.2.3. Analyse des sucres simples	58
3.2.3.1. <i>Traité thermiquement</i>	58
3.2.3.2. <i>Détermination de la composition en sucres simple</i>	59
3.2.4. Fractionnement et analyse des polymères constitutifs du bois	61
3.2.4.1. <i>Détermination du taux d'holocellulose</i>	61
3.2.4.2. <i>Détermination du taux de lignine de Klason</i>	61
3.2.4.3. <i>Traitement thermique des fractions d'holocellulose et de lignine</i>	62
3.2.4.4. <i>Analyses RMN ¹³C des fractions holocellulose et lignine</i>	62
3.2.5. Titrage de l'acidité des échantillons	63
4. Résultats et discussion	64
4.1. Utilisation des extractibles comme marqueurs de la dégradation fongique	64
4.1.1. Définition des conditions d'analyse : élution-séparation, séchage, séchage-échantillonnage	64
4.1.1.1. <i>Optimisation des conditions analytiques</i>	64
4.1.1.2. <i>Etude de l'influence de la température de séchage sur la distribution et la nature des extractibles</i>	67
4.1.2. Détermination des conditions d'inhibition de la dégradation fongique	71
4.1.3. Dégradation des extractibles du bois de hêtre par <i>Trametes versicolor</i>	75
4.1.3.1. <i>Dégradation des extractibles et évolution des pertes de masse</i>	75
4.1.3.2. <i>Chromatogrammes des extractibles du bois de hêtre dégradé par <i>T. versicolor</i></i>	77
4.1.4. Evolution des extractibles du bois de hêtre par les pourritures brunes	83
4.1.4.1. <i>Chromatogrammes des extractibles du bois de hêtre dégradé par <i>Coniophora puteana</i> et <i>Gloeophyllum trabeum</i></i>	86
4.1.4.2. <i>Evolution des quantités de quelques composés durant la dégradation du hêtre par <i>Coniophora puteana</i> et <i>Gloeophyllum trabeum</i></i>	90
4.1.5. Evolution des extractibles du bois de chêne soyeux lors de sa dégradation	94
4.1.5.1. <i>Chromatogramme des extraits dichlorométhane du bois de chêne soyeux</i>	95
4.1.5.2. <i>Evolution des taux d'extraits durant la dégradation du bois de chêne soyeux</i>	96

4.1.5.3. <i>Evolution des pertes de masse durant la colonisation du bois de chêne soyeux</i>	99
4.1.5.4. <i>Chromatogrammes des extractibles de chêne soyeux lors de sa dégradation</i>	101
4.1.6. Evolution des extractibles du bois de <i>Pin Sylvestre</i> durant sa dégradation par <i>Poria placenta</i>	107
4.1.6.1. <i>Production d'extractibles durant la dégradation du bois de Pin par P. placenta</i>	108
4.1.6.2. <i>Chromatogrammes des extractibles du bois de Pin dégradé par P. placenta</i>	110
4.1.6.3. <i>Evolution de quelques composés durant la dégradation du bois de Pin par P. placenta</i>	113
4.1.7. Conclusions	115
4.2. Comportement des polysaccharides du bois lors du traitement thermique	117
4.2.1. Introduction	117
4.2.2. Analyse HPLC des monosaccharides constitutifs des polysaccharides du bois	119
4.2.2.1. <i>Mise au point des conditions d'hydrolyses</i>	120
4.2.2.2. <i>Evolution des composants du bois de hêtre durant la pyrolyse douce</i>	121
4.2.2.3. <i>Mise en évidence des produits de dégradation par RMN</i>	130
4.2.2.4. <i>Evolution de l'acidité du bois durant la pyrolyse douce</i>	135
4.2.3. Conclusions	140
5. Conclusions et perspectives	142
Références Bibliographiques	146
Annexes	

Introduction générale

1. Introduction générale

Le bois est une ressource naturelle de toute première importance qui a toujours été utilisée par l'homme. Utilisé comme matériau, il peut servir dans la construction d'habitations ainsi que de différents ouvrages, mais aussi dans la fabrication de meubles ou d'objets aussi multiples que variés... Utilisé comme source d'énergie, il servira au chauffage ou à la cuisson des aliments, mais pourra également trouver des usages dans d'autres applications énergétiques (pyrolyse, gazéification...). Enfin, le bois est une source importante de matières premières car il est employé dans différentes industries : la cellulose dans l'industrie papetière et des polymères, les tannins dans le domaine du tannage des peaux et des colles, et de manière plus générale de nombreux extractibles conduisant à des utilisations dans des domaines très variés (cosmétique, agroalimentaire, médecine...).

Longtemps considéré comme un matériau incontournable, le bois a ensuite été considéré pendant une période relativement récente, comme un matériau « désuet », voyant son marché diminuer au profit de matériaux concurrents tels que le béton, l'aluminium ou le PVC. Depuis quelques années maintenant, on observe une inversion de cette tendance qui fait du bois un matériau d'avenir à haut potentiel écologique. En effet, la prise de conscience planétaire sur l'environnement et les émissions de gaz à effet de serre, a conduit les consommateurs et bon nombre de gouvernements à reconsidérer leur jugement sur le bois. Contrairement aux ressources fossiles comme le pétrole, le gaz ou le charbon, le bois est un matériau renouvelable capable de surcroît de stocker le CO₂, un des principaux gaz responsables du réchauffement climatique. Le rapport Bianco préconisant l'augmentation de la part du bois dans la construction, des mesures sur l'air visant à diminuer les rejets de CO₂, ou la Directive Biocide dont le but est de réduire l'impact sur l'environnement des produits de préservation, sont autant de signaux montrant l'importance de la prise de conscience collective et l'intérêt du bois dans les politiques économiques à venir.

Dans ce contexte, l'industrie du bois est toutefois restée très traditionnelle, et le domaine de la recherche autour du matériau plus ou moins important selon les secteurs d'activités. Un des rôles de la recherche sur le bois est actuellement, de promouvoir son utilisation dans les années à venir, en se basant sur une meilleure connaissance des propriétés de ce biomatériau, et par l'élaboration de nouveaux procédés facilitant sa mise en œuvre.

Introduction générale

L'étude de ce matériau est particulièrement difficile du fait de sa complexité, de son hétérogénéité et sa variabilité. Sa structure et ses propriétés varient considérablement non seulement entre deux essences, mais aussi au sein d'une même essence en raison des conditions très différentes auxquelles il peut être exposé lors de sa croissance (climat, situation dans le peuplement, station, agressions diverses). Un des inconvénients majeurs du bois lors de sa mise en œuvre, est sa sensibilité aux agents de dégradations biotiques et abiotiques. En effet le bois de par sa composition chimique (lignine, cellulose et hémicelluloses), constitue une source nutritive de premier choix pour différents insectes et microorganismes lignocellulolytiques. Par ailleurs, il est également sensible à différents agents physico-chimiques comme la chaleur, le rayonnement UV et l'humidité.

Le développement de méthodes permettant de contrôler la qualité et l'intégrité du matériau, constitue donc de ce fait un domaine d'investigation important pour promouvoir son utilisation, mais aussi permettre une meilleure compréhension des phénomènes intervenant lors de sa dégradation. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les thématiques de recherche abordées lors de ce travail de doctorat. Dans un premier temps, dans le but de développer une méthode rapide permettant de détecter l'activité fongique lors de la colonisation et de la dégradation du bois par les agents de pourriture, nous nous sommes intéressés à la recherche de marqueurs chimiques en nous basant sur des méthodes analytiques telles que la chromatographie liquide haute pression (CLHP ou HPLC). L'identification de telles molécules permet d'envisager des applications intéressantes dans la mise au point de méthodes permettant de tester l'efficacité de nouveaux produits de préservation. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique et tout particulièrement à la nature des unités osidiques présentes dans le bois avant et après traitement thermique dans le but de mieux cerner les réactions de dégradations survenant lors du traitement et proposer une méthode permettant de contrôler la qualité et prévoir les performances du matériau.

Rappels bibliographiques

2. Rappels bibliographiques

2.1. Rappels sur la structure et l'anatomie du bois

2.1.1. Structure du bois, de l'arbre aux constituants macromoléculaires de base

Le bois est le matériau constituant l'essentiel du tronc, des branches et des racines de l'arbre. C'est un matériau biodégradable principalement composé de carbone, d'hydrogène et d'oxygène (%C = 48,5% H = 6 %O = 45,5 pour le bois de hêtre, Nguila Inari et al., 2006). Ses propriétés dépendent non seulement de son anatomie, mais aussi de sa composition chimique au travers de la nature des trois bio-polymères qui le constituent (cellulose, lignine et hémicelluloses), ainsi que de la présence de substances extractibles en plus ou moins grandes quantités selon les essences considérées.

Les études sur le matériau bois nécessitent donc différents niveaux d'observation en fonction du type de recherche envisagée. On trouve ainsi des recherches menées à l'échelle macroscopique, microscopique ou moléculaire, celles-ci étant dans tous les cas fortement imbriquées et dépendantes les unes des autres. Une représentation de ces différents niveaux d'observations est schématisée dans la figure 1.

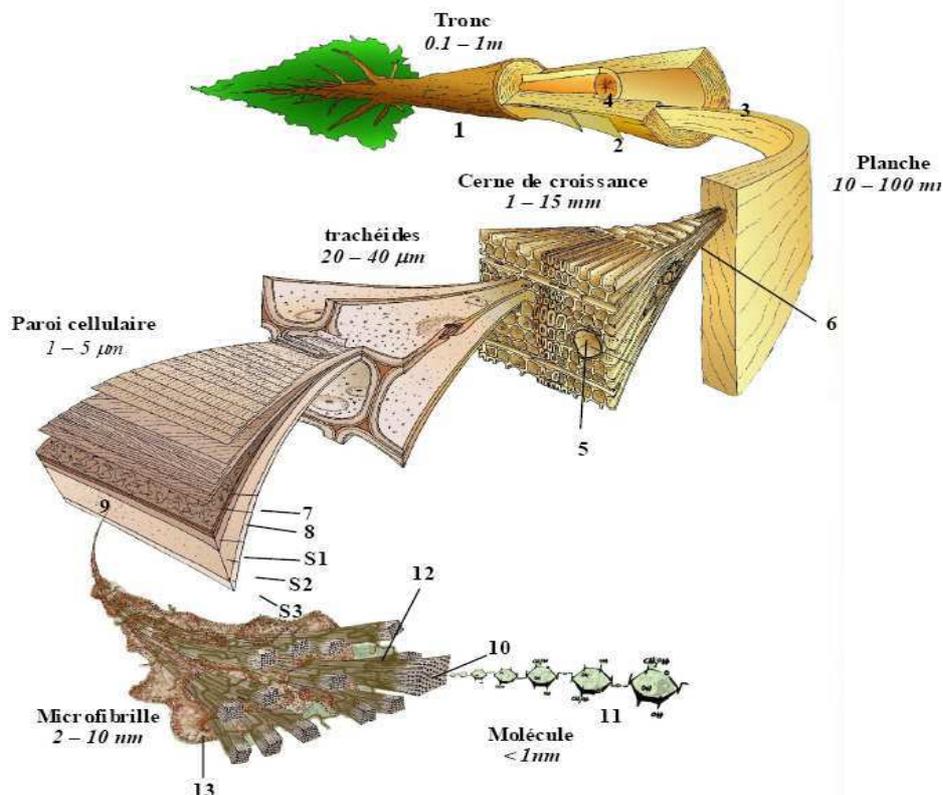


Figure 1 : Les différents niveaux d'observation du bois de résineux (Rousset 2004)

Rappels bibliographiques

Le tronc (1) de l'arbre est en majorité constitué de cellules mortes. Les couches successives qui se forment sous le cambium (2) constituent l'aubier (4) qui correspond au bois physiologiquement actif. Les trachéides (5) actives de l'aubier cessent d'alimenter l'arbre après quelques années. Ces dernières se bouchent et le tissu ligneux s'imprègne de différentes substances qui peuvent être toxiques pour les agents biologiques. La transformation progressive de l'aubier en duramen (3) est appelée duraminisation. Chez certaines essences (chêne, châtaignier, mélèze...) l'aubier est plus clair que le duramen, on dit alors qu'il est différencié. Il ne résiste quasiment jamais aux champignons lignivores ni aux insectes xylophages. Le duramen, au contraire, possède une durabilité naturelle qui varie selon les essences. La distribution et l'accumulation des réserves (amidon, graisses) se fait par et dans les rayons (6) qui jouent aussi un rôle de conduction de la sève. Au niveau pariétal, la structure reste relativement constante entre les différentes essences.

Lors de la genèse des cellules par division, une couche intercellulaire se forme soudant les cellules les unes des autres. Par la suite, les cellules sécrètent une paroi primaire (8) constituée en majorité de microfibrilles de cellulose enchevêtrées de part et d'autre de la couche intercellulaire. L'ensemble formé par les deux parois primaires de deux cellules adjacentes et la couche intercellulaire est appelé lamelle moyenne (7). Durant, la différenciation de la cellule, apparaît la paroi secondaire (9), mince, épaisse ou très épaisse, composée de trois couches successives S1, S2 et S3. Ces différentes couches sont constituées en majorité de microfibrilles (10) de cellulose (11) orientées quasi perpendiculairement à l'axe vertical dans les couches S1 et S3, alors qu'elles ont une orientation quasi parallèle à l'axe longitudinal dans la couche S2 la plus épaisse (figure 2).

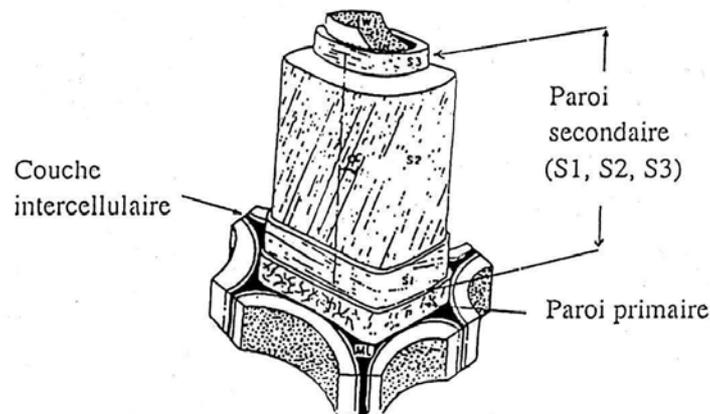


Figure 2 : Structure des parois cellulaires du bois (Jodin 1994)

Les hémicelluloses viennent se déposer autour de microfibrilles de cellulose, et s'associent avec elles par différents types d'interactions intermoléculaires (forces de Van der Waals, liaisons d'hydrogène...). A cet ensemble vient s'ajouter la lignine (**13**), qui se comporte comme une matrice « incrustante » pouvant ou non former des liaisons covalentes avec les polysaccharides (Fengel et Wegner 1984).

2.1.2 Anatomie du bois

Le bois est un matériau poreux, hygroscopique et anisotrope. Il présente des tissus hétérogènes, organisés selon trois directions (figure 3):

- la direction longitudinale, parallèle à l'axe du tronc,
- la direction tangentielle, tangente aux cernes d'accroissements annuels,
- la direction radiale passant par les rayons de la section.

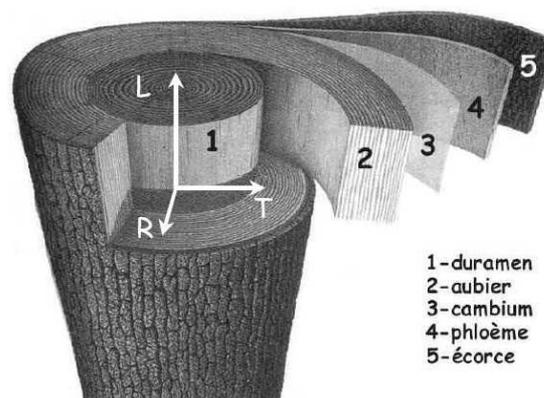


Figure 3 : Structure générale du tronc et les différentes directions (Romain Rémond 2004)

Selon l'origine (zone tempérée ou tropicale) et la nature de l'essence (feuillus ou résineux), la structure anatomique du bois peut être plus ou moins complexe. Très souvent, les critères anatomiques sont à la base de la classification et de l'identification des essences.

La structure anatomique du bois des conifères (gymnospermes) est relativement simple et uniforme (Figure 4). Les mêmes cellules, les trachéides (environ 90% des cellules), orientées verticalement assurent le double rôle de conduction de la sève et de support mécanique. Les trachéides portent sur leurs surfaces de nombreuses ponctuations aréolées, qui permettent le transport de la sève d'une trachéide à l'autre. Le reste des cellules est constitué de cellules de parenchyme (10%) qui peuvent se présenter de diverses manières: soit sous forme de rayons ligneux possédant de nombreuses ponctuations et assurant les rôles de

synthèse, de stockage et de transport de différents composés, soit sous forme de canaux résinifères avec des fonctions sécrétrices de substances résineuses (Fengel et Wegner 1984).

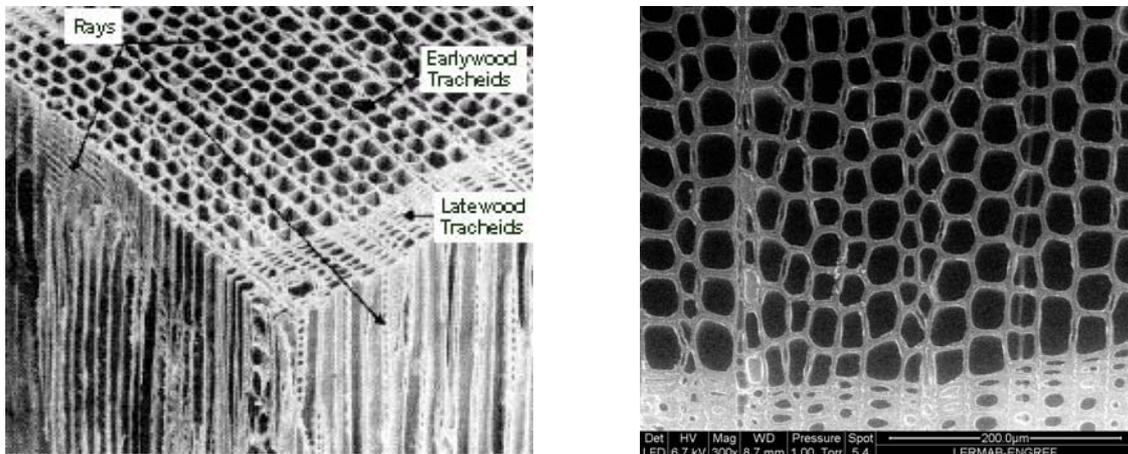


Figure 4 : Coupe transversale d'un échantillon de pin (*Pinus sylvestris*)

La structure anatomique du bois des feuillus (angiospermes), espèces plus évoluées, est beaucoup plus complexe que celle des résineux. Le nombre d'éléments constitutifs est plus important et leur agencement plus complexe (Figure 5).

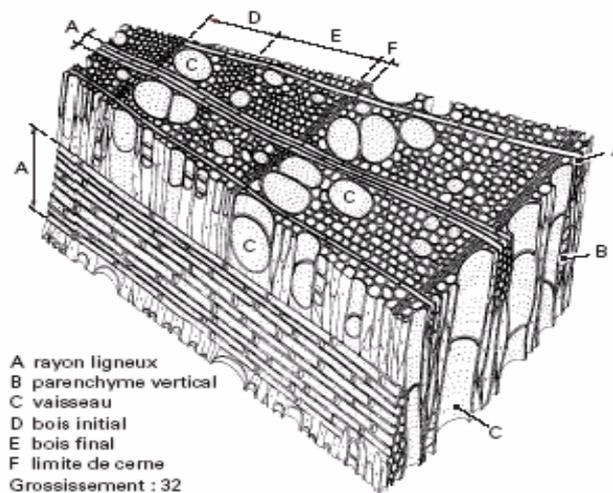


Figure 5 : Plan ligneux d'un feuillu

Le rôle de conduction de la sève est assuré par les vaisseaux qui sont perforés de ponctuations et communiquent entre eux bout à bout. Le rôle de soutien est assuré par les fibres qui sont des cellules vides et représentent environ 50 à 60% de la masse du bois. Les cellules de parenchyme quand à elles jouent un rôle de stockage et de transformation des

éléments nutritifs (Jodin 1994). A l'échelle de quelques dizaines de micromètre, la couche de matière lignocellulosique est assimilable à une structure du type "nid d'abeille".

La présence d'éléments différents comme les vaisseaux et les fibres, donne un choix plus important d'organisation et donc de complexité structurale chez les feuillus. Les diverses associations de ces constituants, conduisent à de multiples plans ligneux qui, en fonction des essences prises en compte, sont à l'origine de leur classification et leur identification. Les deux clichés rapportés dans la figure 6, présentant une coupe transversale d'un feuillu de zone tempérée à pores diffus (*Fagus sylvatica*) et d'un feuillu de zone tropicale (*Grevillea robusta*), montrent à quel point les caractéristiques anatomiques peuvent différer d'une essence à l'autre.

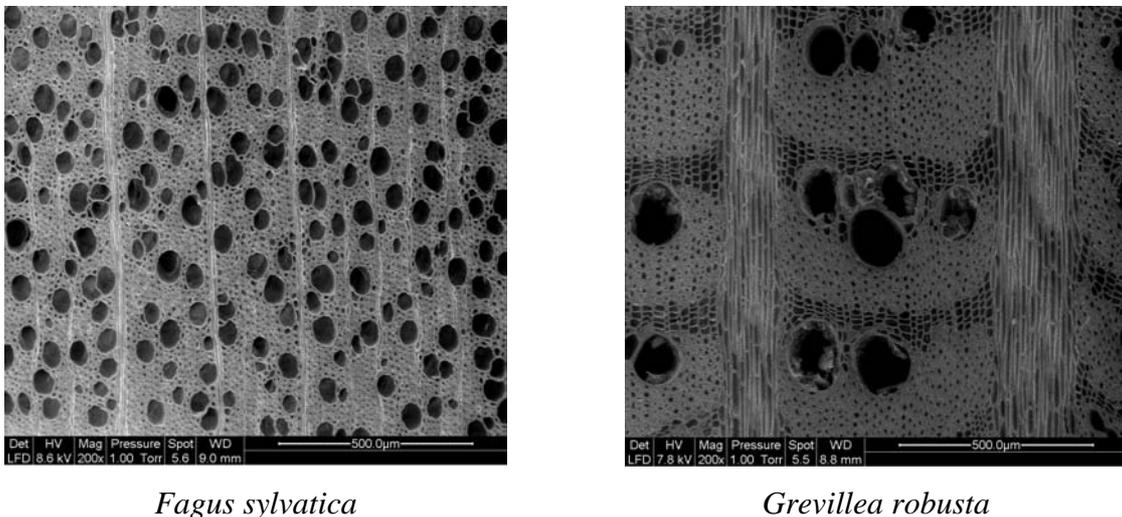


Figure 6 : Coupes transversales montrant les différences existantes entre deux essences

2.2. Composition chimique du bois

La paroi cellulaire du bois est formée en majorité de différentes macromolécules : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. A ces polymères, se rajoutent les extractibles et les substances minérales. Les pourcentages de ces différents constituants peuvent varier selon l'espèce, les conditions climatiques, l'âge de l'arbre et les sites de croissance. La nature et l'agencement des différents constituants du bois, sont à l'origine de ses différentes propriétés.

La séparation et la caractérisation des différents constituants du bois sont difficiles, du fait de leur étroite association au sein des parois cellulaires. Bien que relativement proche, la

composition chimique des bois de conifère et des bois de feuillus est légèrement différente (tableau 1).

Tableau 1 : Répartition moyenne des différents composés dans le bois normal des feuillus et des résineux de la zone tempérée (Sjöström 1993)

Constituent	Résineux	Feuillus
Cellulose	42 ± 2	45 ± 2
Hémicelluloses	27 ± 2	30 ± 5
Lignine	28 ± 3	20 ± 4
Extractibles	3 ± 2	5 ± 3

Dans les bois des zones tempérées, les constituants macromoléculaires représentent entre 95 et 99% du matériau alors que, chez les bois tropicaux, cette valeur est souvent plus faible (environ 90%) du fait des taux assez élevés d'extractibles (Fengel et Wegner 1984).

2.2.1. La cellulose

La cellulose étant le principal constituant de la bio-masse lignocellulosique, un très grand nombre d'études et d'ouvrages lui a été consacré (Kennedy 1990 ; Heinze 2005). C'est un homopolymère linéaire, constitué par un enchaînement d'unités de glucose reliées entre elles par une liaison glycosidique du type β -1,4 (Figure 7). Le motif répétitif de la chaîne est le dimère cellobiose.

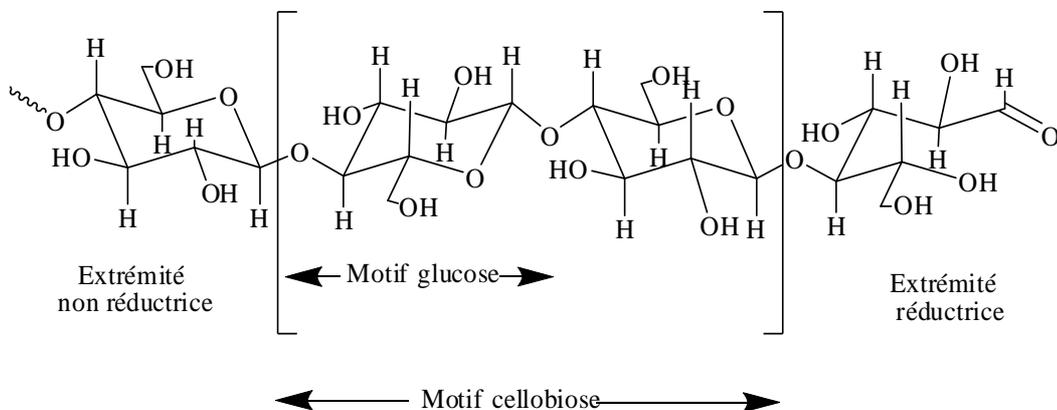


Figure 7 : La structure de la cellulose

La cellulose présente une extrémité réductrice et une extrémité non réductrice. Elle est caractérisée par un degré de polymérisation moyen compris entre 7000 et 15000 (Fengel et Wegner 1984).

Dans son état naturel, la cellulose est en partie amorphe et en partie cristalline. Grâce à sa constitution chimique, elle peut établir des liaisons de faible énergie telles que des liaisons hydrogène. Elle est associée aux hémicelluloses et à la lignine dans les parois cellulaires. L'ensemble constitué de la cellulose et des hémicelluloses, est appelé holocellulose. La cellulose, est considérée comme plus stable thermiquement que les hémicelluloses. Elle joue un rôle primordial dans le comportement mécanique des parois cellulaires du bois.

2.2.2. La lignine

La lignine est présente dans des proportions plus ou moins importantes dans toutes les plantes vasculaires (Ptéridophytes, Angiospermes et Gymnospermes). Elle assure rigidité aux parois cellulaires végétales et diminue leur perméabilité lors du transport des matières nutritives et des métabolites. Elle représente également une barrière chimique aux attaques extérieures. C'est un polymère tridimensionnel synthétisé au niveau de la paroi cellulaire, résultant de la polymérisation oxydative de trois unités monomériques (figure 8).

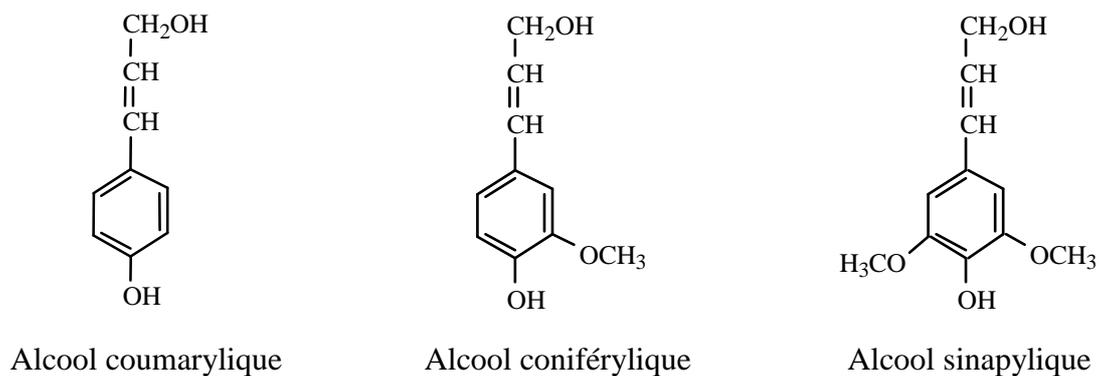


Figure 8 : Monomères précurseurs des lignines

La lignine étant différente selon que l'on parle de celle des feuillus ou des résineux (Fengel et Wegner 1984 ; Sjöström 1993 ; Jodin 1994), il est plus juste de parler des lignines plutôt que de la lignine. La lignine des résineux comprend principalement des unités guaiacyles (dérivent de l'alcool coniférylique), alors que celle des feuillus comprend à la fois

des unités guaiacyles et syringyles (dérivant respectivement des alcools coniférylique et sinapylique).

L'étude de la structure des lignines, est difficile du fait de leurs relations avec les autres constituants de la paroi cellulaire. Les lignines ne peuvent être séparées des hémicelluloses et de la cellulose, qu'après des traitements enzymatiques ou chimiques, qui altèrent en partie son intégrité structurale (Sjöström 1993 ; Fengel et Wegner 1984). Les liaisons qui existent entre les lignines et les polysaccharides au niveau des parois cellulaires peuvent être diverses telles que des liaisons éther, ester ou glycosidique. Le complexe ainsi formé entre la lignine et les polysaccharides, porte le nom de complexe lignine-carbohydrate (LCC) (Sjöström 1993; Jodin 1994). La distribution dans les parois cellulaires, ainsi que la teneur à différents endroits du bois de la lignine ne sont pas homogènes. La lignine constitue le polymère le plus abondant sur terre après la cellulose.

2.2.3 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont définies comme étant des hétéropolysaccharides présents dans les parois cellulaires des végétaux. Ces macromolécules présentent une grande diversité de structure. Les chaînes des hémicelluloses présentent un degré de polymérisation plus faible que celui de la cellulose: 100 à 200 unités osidiques pour les xylanes des feuillus par exemple. Contrairement à la cellulose, ce sont des polymères totalement amorphes et ramifiés (Fengel et Wegner 1984). Les hémicelluloses sont composés de différents sucres incluant des hexoses tels que le glucose, le galactose et le mannose, des pentoses tels que le xylose et l'arabinose et des acides uroniques (figure 9).

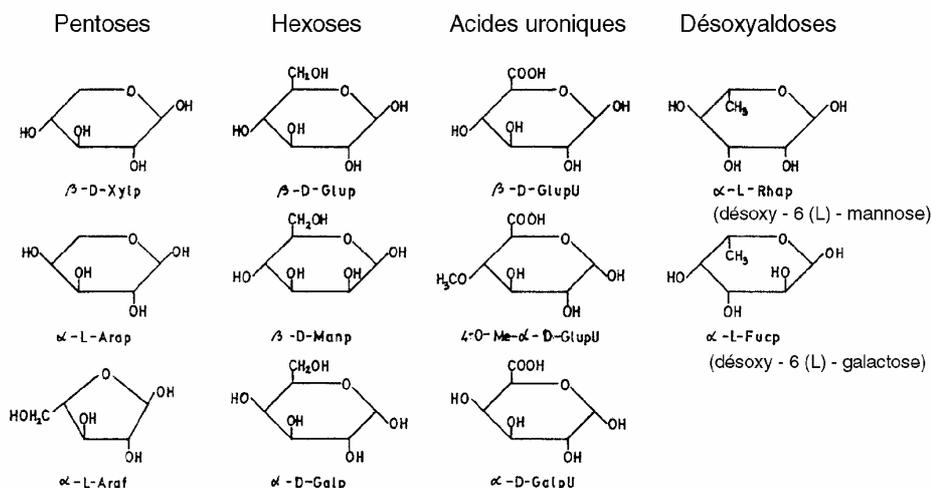


Figure 9 : Différents monosaccharides constituant les hémicelluloses (Jodin 1994)

Rappels bibliographiques

Les hémicelluloses constituent une matrice amorphe venant enrober la cellulose au niveau des couches cellulaires. Tout comme la lignine, elles sont intimement associées à la cellulose au niveau des parois.

La chaîne principale des hémicelluloses, peut être constituée d'une succession de xylose comme chez les xylanes, ou de différents sucres comme le glucose et le mannose chez les glucomannanes. Sur ces chaînes principales, viennent se greffer des chaînes latérales constituées de différents sucres comme le galactose, l'arabinose et des acides uroniques. Les résineux et les feuillus peuvent être différenciés par leurs types d'hémicelluloses, mais aussi par les proportions relatives des oses qui les constituent.

Les hémicelluloses présentes dans les bois des feuillus de zones tempérées, sont principalement constituées de glucuronoxylanes (15 à 30%) et de glucomannanes dans des proportions moins importantes (2 à 5%) (Fengel et Wegner 1984, Jodin 1994).

- La chaîne principale des glucuronoxylanes est constituée d'unités xylose partiellement acétylées liées par des liaisons β -(1,4), sur lesquelles viennent se greffer des résidus d'acide 4-O-méthylétherglucuronique (4-O-Me-GlucU) liés par des liaisons α -(1,2) (figure 9).

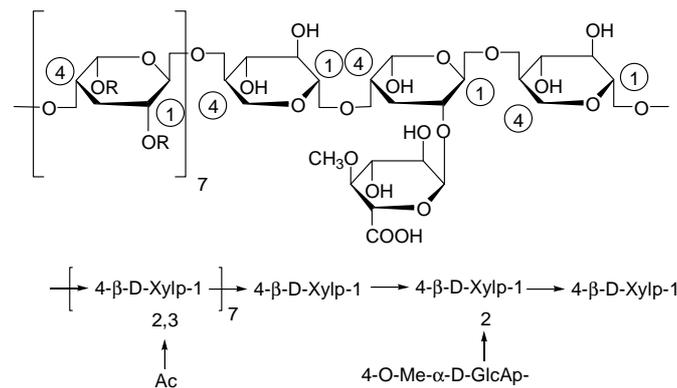


Figure 10 : Structure partielle des glucuronoxylanes des feuillus

- Les glucomannanes sont formés de D-glucose liés à du D-mannose par une liaison β -(1,4), et ne sont pas acétylés (figure 11).

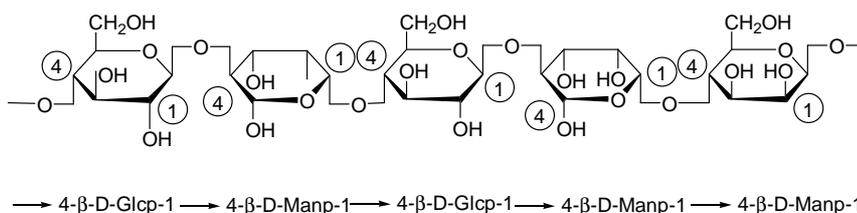


Figure 11 : Structure des glucomannanes des feuillus

Rappels bibliographiques

Les hémicelluloses des bois de résineux, sont principalement constituées de galactoglucomannanes (20 à 25%) et d'arabinoglucuronoxylanes (5 à 10%).

- Les galactoglucomannanes sont partiellement acétylés. La chaîne principale est constituée de mannose et de glucose liés par des liaisons β -(1,4) auxquels sont liés du galactose par des liaisons α -(1,6) (Figure 12).

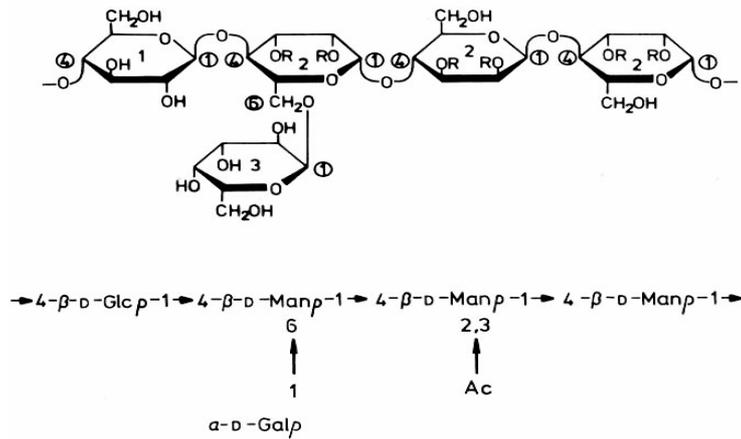


Figure 12 : Structure des galactoglucomannanes des résineux

- Contrairement aux xylanes des feuillus, ceux des arabinoglucuronoxylanes de résineux ne comportent pas de groupements acétyle (figure 13). La chaîne principale est formée de résidus D-xylose liés par des liaisons β -(1,4), auxquels viennent se fixer des résidus de L-arabinose par des liaisons α -(1,6) et d'acide 4-O-méthylétherglucuronique liés par des liaisons α -(1,2) (Fengel et Wegner 1984 ; Sjostrom 1993).

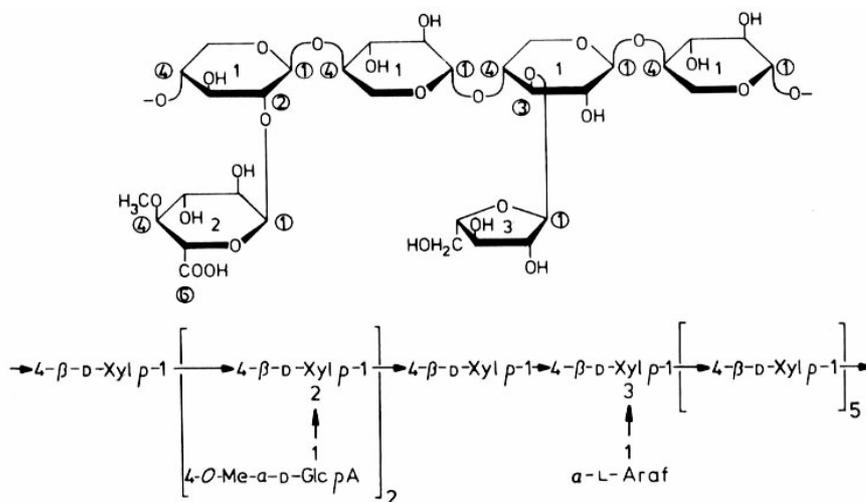


Figure 13 : Structure partielle des arabinoglucuronoxylanes de résineux

2.2.4 Les extractibles

Les extractibles sont des composés de faible masse moléculaire solubles dans l'eau et/ou les solvants organiques. Ils sont localisés dans les parties poreuses du bois et participent au bon fonctionnement de l'arbre. Leur quantité et leur nature varient en fonction de l'essence, de la partie échantillonnée, de la saison et du lieu de croissance de l'arbre (Doussot et al., 2002 ; Prida et Puech 2006). Les extractibles sont à l'origine de nombreuses propriétés du bois telles que sa durabilité, son odeur ou sa couleur (Jodin 1994 ; Fengel et Wegner 1984). Les taux d'extractibles dans les bois de feuillus provenant des zones tempérées, sont souvent inférieurs à ceux présents dans les bois de résineux (Fengel et Wegner 1984). Les bois tropicaux quant à eux, présentent des taux d'extraits pouvant être beaucoup plus élevés comme dans le teck (*Tectona grandis*), où ils représentent environ 13% de la masse sèche (Bhat et al., 2005 ; Thulasidas et Bhat 2007).

Certains extractibles peuvent être lipophiles, alors que d'autres sont hydrophiles. En fonction de leur nature chimique, on peut les classer en trois catégories:

- les graisses et cires,
- les composés terpéniques comprenant les terpènes simples et les terpénoïdes,
- les composés phénoliques comprenant les phénols simples, les flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes et les tannins.

2.2.4.1. Cires et graisses

Les cires sont des esters d'acides gras et d'alcools gras. Les graisses sont constituées de glycérides qui sont eux même des esters de différents acides gras et de glycérol (figure 14).

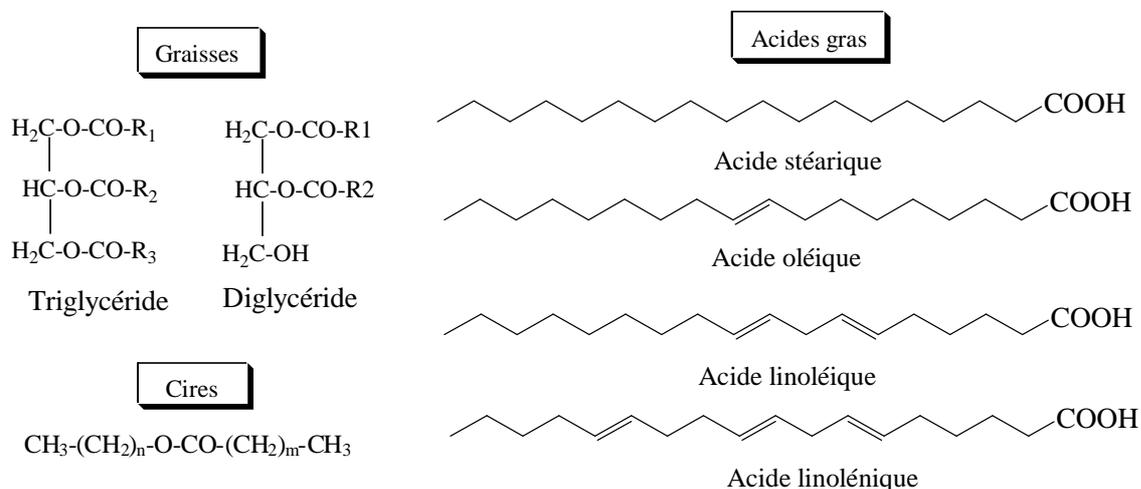


Figure 14 : Graisses et cires isolées de différents bois

On peut rencontrer des mono, des di ou des triglycérides (Fengel et Wegener 1989 ; Jodin 1994). Tous ces composés sont lipophiles et peuvent être extraits avec des solvants tels que l'éther de pétrole, l'acétone ou l'hexane. De nombreux composés lipophiles comme les acides linoléique, linoléique et oléique, et des triglycérides comme la trioléine ont été identifiés dans le bois de Pin sylvestre (Claassen et al., 2000). Ces composés ont une abondance qui varie en fonction de la nature du bois, de la localisation dans l'arbre et de la partie échantillonnée (Jodin 1994 ; Martínez-Iñigo et al., 1999). Comme pour de nombreuses plantes, l'odeur du bois est due à la présence de composés volatils. Ainsi, l'arôme des vins vieillies en fûts de chêne fraîchement mis en service, est due à la présence de nombreux composés volatils dont le (*E*) non-2-enal, l'oct-3-en-1-one, le (*E*) oct-2-enal et le décanal provenant de l'oxydation d'acides gras insaturés comme l'acide linoléique, précurseur du (*E*)-2-nonenal (Chatonnet et Dubourdiou 1998). Les graisses et cires, bien que n'étant pas toujours en forte quantité dans le bois, affectent néanmoins considérablement le procédé de fabrication de la pâte à papier (del Río et al., 2000; Coelho et al., 2007).

2.2.4.2. Composés terpéniques

Les terpènes et terpénoïdes sont présents chez toutes les plantes, et représentent de loin le groupe le plus vaste avec plus de 22000 composés identifiés (Raven et al., 2000). Tous les terpènes constitués uniquement de carbone et d'hydrogène, ont pour précurseur commun le 2-méthylbutadiène, connu également sous le nom d'isoprène (C₅H₈). Les unités C₅ des terpènes résultent d'une succession de réactions enzymatiques, avec pour origine l'acide mévalonique (MVA) (figure 15).

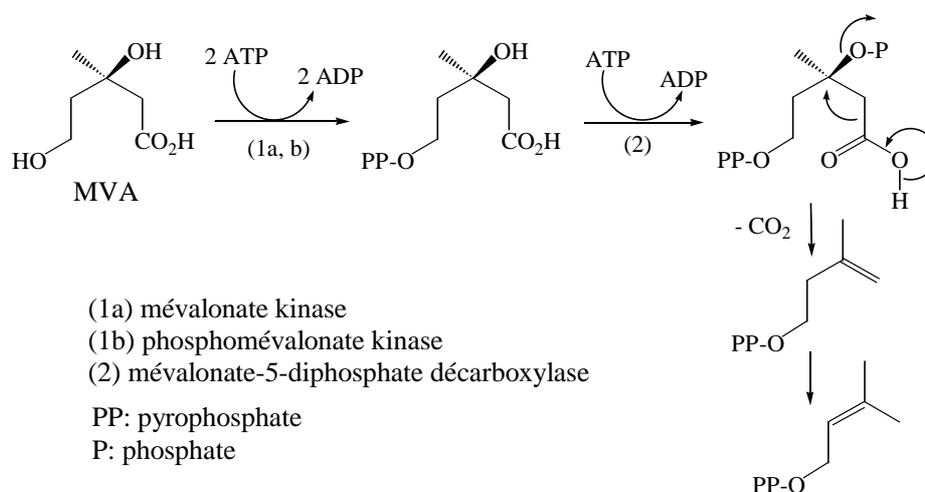


Figure 15 : Biosynthèse de l'unité terpénique en C₅

Rappels bibliographiques

Les terpènes peuvent être subdivisés en différents groupes en fonction du nombre d'unités isoprène qui les constituent. Ainsi, on peut rencontrer des mono, sesqui, di, ses ou triterpènes, constitués respectivement de deux, trois, quatre, cinq ou six unités isoprène. On rencontre également des polyterpènes correspondant à des polymères d'isoprène. Les terpénoïdes, contrairement aux terpènes, possèdent des groupements fonctionnels oxygénés comme des groupements alcool, éther ou acide carboxylique. Les résineux renferment de nombreux monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et acides terpéniques (Kleinhentz et al., 1999 ; Claassen et al., 2000; Arrabal et al., 2002) (figure 16). Contrairement aux résineux, les feuillus renferment uniquement des triterpènes (Raven et al., 2000 ; Fernandez et al., 2002 ; Krasutsky 2006) (figure 16).

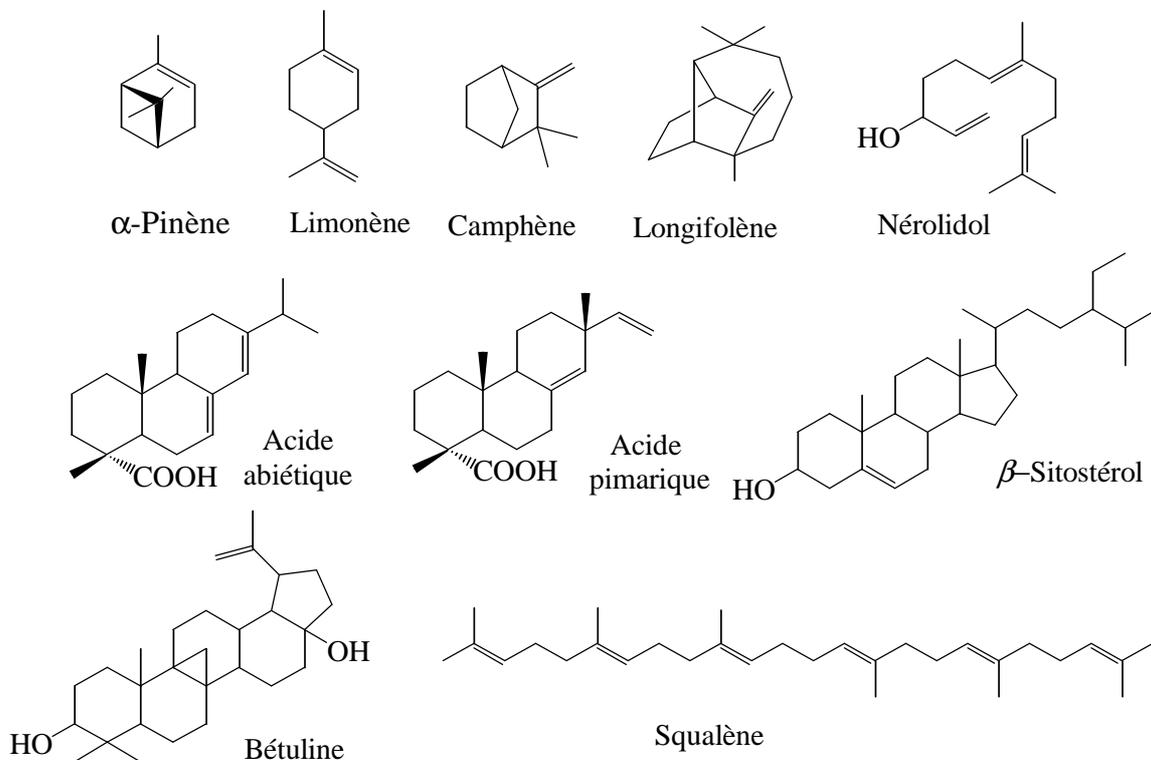


Figure 16 : Terpènes et terpénoïdes isolés de bois de résineux et de feuillus

Bon nombre de terpènes et d'acides terpéniques ont été identifiés dans les effluents de papeteries. Ces derniers, sont à l'origine de différents problèmes et défauts rencontrés lors de la fabrication du papier. Ils sont également à l'origine de problèmes de toxicité pour les milieux dans lesquels ils sont rejetés (Merilainen et al., 2006). Les essences du genre *Pinus* et *Abies*, possèdent de nombreux canaux résinifères, qui secrètent une résine pouvant contenir différents composés terpéniques. La résine obtenue à partir du pin maritime est

principalement constituée de monoterpènes et d'acides terpéniques (Kleinhentz et al., 1999 ; Arrabal et al., 2002). Après distillation, cette dernière conduit à l'essence de térébenthine et à la colophane, qui trouvent de nombreuses applications dans différents domaines. L'essence de térébenthine peut être utilisée comme décapant, et possède des propriétés antiseptiques, alors que la colophane est utilisée en cosmétique ou dans des mélanges adhésifs. Certains composés terpéniques du *Prunus africana* comme l'acide oléanolique, l'acide ursolique, le β -sitostérol, et la β -sitosténone inhibent l'activité de la glucosyl-transférase impliquée dans le processus d'inflammation durant le cancer de la prostate (Catalano et al., 1984 ; Breza et al., 1998 ; Stewart et al., 2003). De nombreux triterpènes, isolés de diverses plantes, possèdent des propriétés très variées telles les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, analgésiques, anticancerueuses, et antivirales (Liu 2005). Malheureusement, ces composés n'ont pas que des effets bénéfiques pour l'homme. En effet, bon nombre de composés terpéniques peuvent être toxiques pour l'homme. C'est ainsi qu'en travaillant sur *Tetraclinis articulata*, Barrero a isolé différents diterpénoïdes qui pourraient modifier le fonctionnement des leucocytes humains à des concentrations de 10 μ M (Barrero et al., 2003). D'autres extraits, comme les huiles essentielles de *Melaleuca alternifolia*, sont à l'origine d'irritations, d'allergies et d'une importante toxicité (Hammer et al., 2006).

2.2.4.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, englobent un grand nombre de composés possédant tous un groupe hydroxyle attaché à un cycle aromatique. Les composés phénoliques font partie des composés les plus étudiés parmi les métabolites secondaires, mais beaucoup d'entre eux ont des propriétés encore mal connues (Raven et al., 2000). Ces composés peuvent être classés en différentes familles, se différenciant par la complexité de leur squelette de base.

a) Les phénols simples

Les composés phénoliques simples présentent généralement un squelette de type C₆-C₃, correspondant au motif phenyl propane présent dans les différents précurseurs de la lignine ou de type C₆-C₁, correspondant à la forme oxydée du motif précédent. La figure 17 rapporte les principaux composés de ce type, isolés à partir de différents bois de feuillus ou de résineux.

L'un des composés les plus connus est l'acide salicylique (acide 2-hydroxybenzoïque) isolé du saule, dont la forme acétylée (acide acétylsalicylique) est à la base de l'aspirine (Raven et al., 2000 ; Macheix et al., 2005). Dans certains cas, ces composés phénoliques sont présents

dans le bois sous forme combinée avec d'autres molécules, telles que des sucres comme dans le cas de la coniférine. De nombreuses poussières provenant des bois de feuillus, possèdent des propriétés cancérigènes liées à la présence de quantités plus ou moins importantes d'acide gallique et de ses dérivés (Mammela et al., 2001). Les propriétés toxiques de ces composés, sont dues à la présence des groupements hydroxyles successifs sur le même cycle aromatique (Kamaya et al., 2005).

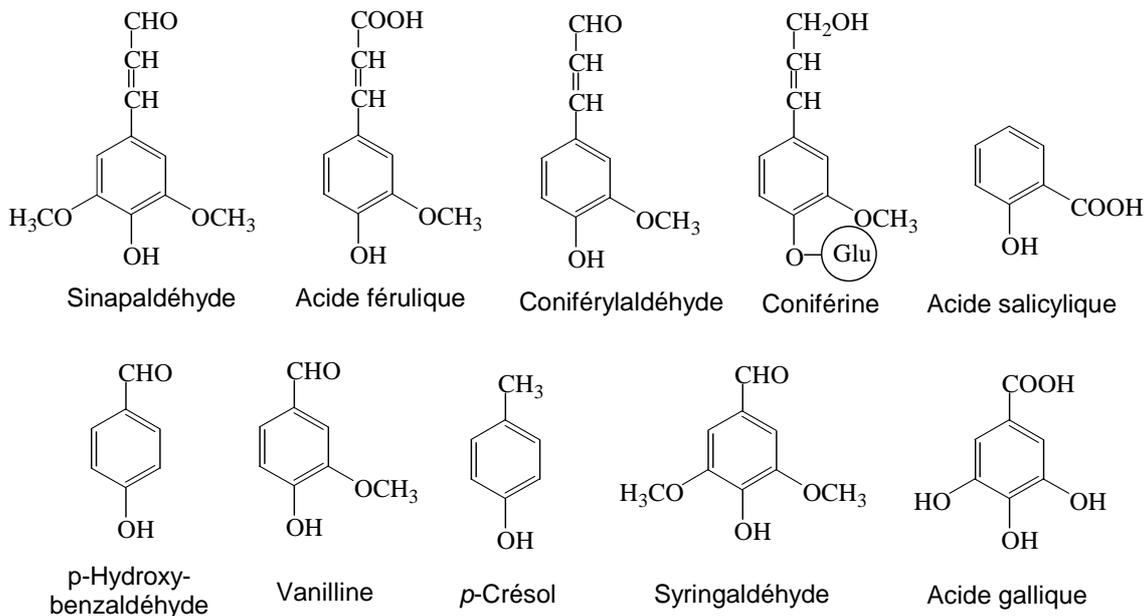


Figure 17 : Composés phénoliques simples isolés de bois feuillus et de résineux

b) Les Stilbènes

Les stilbènes sont des dérivés de l'acide hydroxycinnamique présents aussi bien chez les résineux que chez les feuillus (figure 18). L'abondance de stilbènes varie selon la partie de l'arbre prise en compte. Leur toxicité varie selon leur structure, mais également en fonction du type de souches bactériennes ou fongiques étudiées (Venalainen et al., 2004 ; Lee et al., 2005). Certains stilbènes, comme la pinosylvine et ses formes mono ou diméthylées, isolés à partir de *Picea glauca*, *Pinus banksianat* ou de *Pinus resinosa* inhibent fortement la croissance de pourritures blanches comme *Trametes versicolor*, et *Phanerochaete chrysosporium*, alors que leurs effets sur des pourritures brunes comme *Neolentinus lepideus*, *Gloeophyllum trabeum*, et *Postia placenta* seraient moins marqués (Célimène et al., 1999).

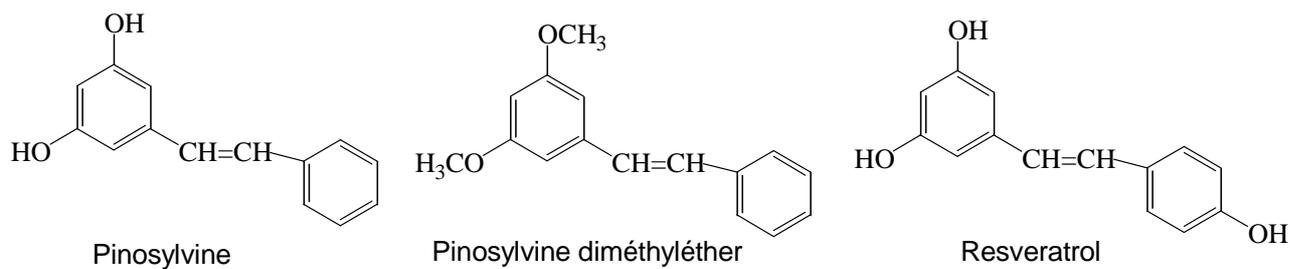


Figure 18 : Stilbènes isolés de bois feuillus et de résineux

La pinosylvine présente une forte activité antibactérienne sur *Saccharomyces cerevisiae* (Lee et al., 2005). Les Stilbènes sont également très utilisés en pharmacologie. Le résvératrol par exemple, possède des propriétés anticancéreuses et cardioprotectrices (Han et Li 2004 ; Wang et al., 2006 ; Hooper et Cassidy 2006).

c) Les lignanes

Les lignanes sont formés à partir d'unités phénylpropanes, liées entre elles par différentes liaisons résultants de couplages oxydatifs (figure 19).

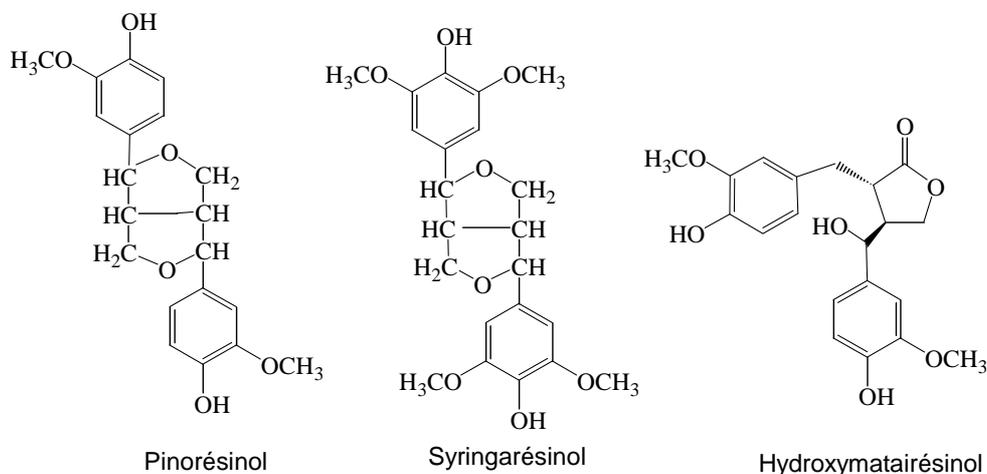


Figure 19 : Lignanes isolés de bois feuillus et de résineux

Ils correspondent à des produits de polymérisation incomplète de la lignine, et peuvent exister sous forme de di, tri, tétra ou penta-lignanes. Ces molécules peuvent être présentes en grande quantité au niveau des nœuds de certains résineux. Ainsi, dans le cas de *Picea abies* on a trouvé jusqu'à 10% de lignanes au niveau des nœuds, constitués à plus de 75% d'hydroxymatairésinol (Holmbom et al., 2003 ; Willför et al., 2004). Le bois de cette même

essence, comprend pour sa part entre 4 et 6 % de lignanes alors que les racines en comprennent 2 à 3%. C'est une famille de composés très étudiée dans le domaine pharmaceutique et agroalimentaire à cause de leurs effets phytoestrogènes (Murkies 1998 ; Hooper et Cassidy 2006). Comme la plupart des composés phénoliques du bois, les lignanes sont dotés de propriétés antioxydantes (Lee et al., 2004). D'autres lignanes sont dotés de propriétés antifongiques (Kawamura et al., 2004).

d) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont parmi les composés les plus étudiés des métabolites secondaires et représentent, le plus grand groupe de composés phénoliques présents chez les végétaux (Raven et al., 2000). Les flavonoïdes de structure générale C₆-C₃-C₆, se divisent en plusieurs familles présentant chacune un squelette de base différent. A l'intérieur de chaque famille, on observe des variations de structure portant principalement sur le degré d'hydroxylation, de méthylation et de glycosylation de chaque cycle. Les variations de structure sont à l'origine des propriétés physico-chimiques, et des propriétés biologiques, attribuées à ces composés (Ohmura et al., 2000; Macheix et al., 2005 ; Hooper et Cassidy 2006). Les principales familles des flavonoïdes sont les flavanes, les flavanones, les flavones, les isoflavones, les chalcones, et les aurones (figure 20).

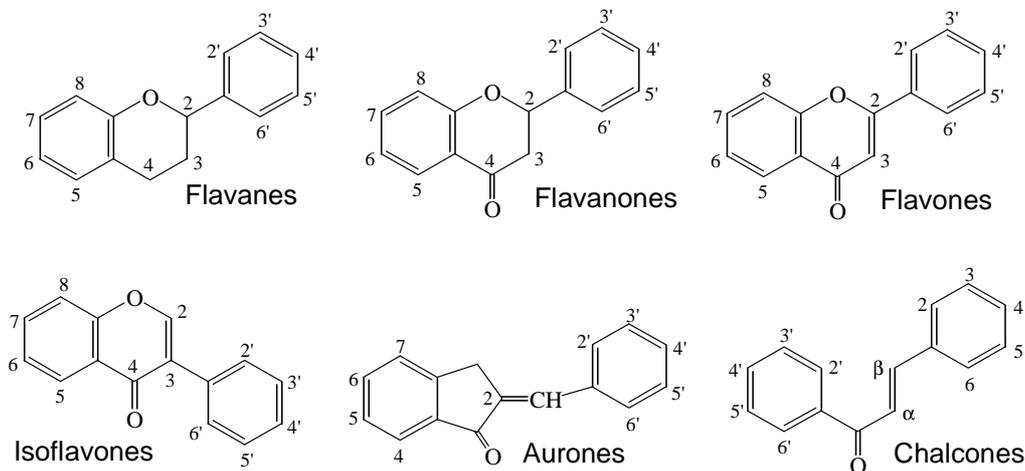


Figure 20. Différentes familles de flavonoïdes

Dans de nombreux cas, il est admis que les flavonoïdes peuvent agir en synergie, en créant un environnement inhibiteur à l'invasion microbienne. La catéchine et ses dérivés possèdent des propriétés antibactériennes clairement démontrées (Veluri et al., 2004), alors que leurs propriétés fongicides semblent plus controversées (Bhat et al., 1998 ; Cristobal et al., 2004). Les combinaisons de flavonoïdes telles que la quercétine et la morine, la quercétine et la

quercitrine ou la rutine et la quercétine, permettent d'accroître l'activité antibactérienne sur *Salmonella enteritidis* et *Bacillus cereus* comparées à chaque flavonoïde utilisé seul (Arima et al., 2002) (figure 21).

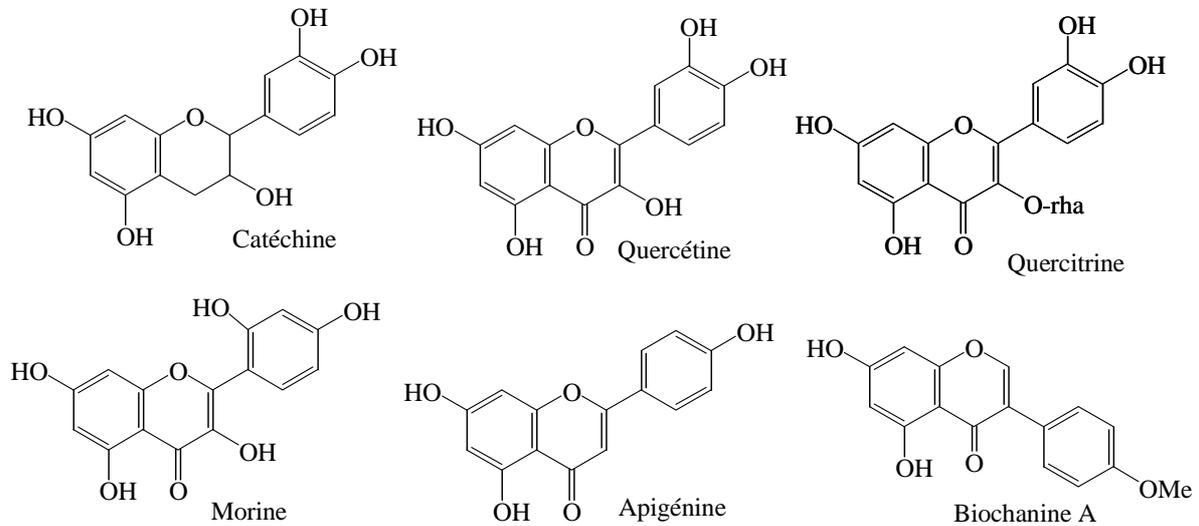


Figure 21 : Composés phénoliques antibactériens et anti-appétants

Il a également été montré que la biochanine A (isoflavone), diminuait considérablement le pourcentage de reproduction des termites du genre *Coptotermes formosanus* Skiraki, alors que l'apigénine (flavone) était très toxique pour ces dernières (Boué et Raina 2003). D'autres études ont montré que la présence du groupe carbonyle sur l'hétérocycle, et celle de groupes hydroxyle en position 5 et 7, conditionnait fortement l'activité anti-appétante de certains flavonoïdes (Ohmura et al., 2000).

Les composés les plus impliqués dans la coloration des plantes sont les flavonoïdes. Ainsi, la couleur caractéristique de certains bois, comme *Pterocarpus santalin*, *Pterocarpus indicus*, ou *Pterocarpus soyauxii* est due à certains flavonoïdes. La couleur rouge et jaune de ces bois résulte de la présence de molécules appartenant à la famille des santalines (Kinjo et al., 1995 ; Surowiec et al., 2004) (figure 22). Ces molécules sont très utilisées dans le domaine de l'industrie textile où elles servent de colorants. La couleur rouge est due aux santalines A et B, tandis que la couleur jaune est due aux santalines Y et AC (Kinjo et al., 1995 ; Dweck 2002).

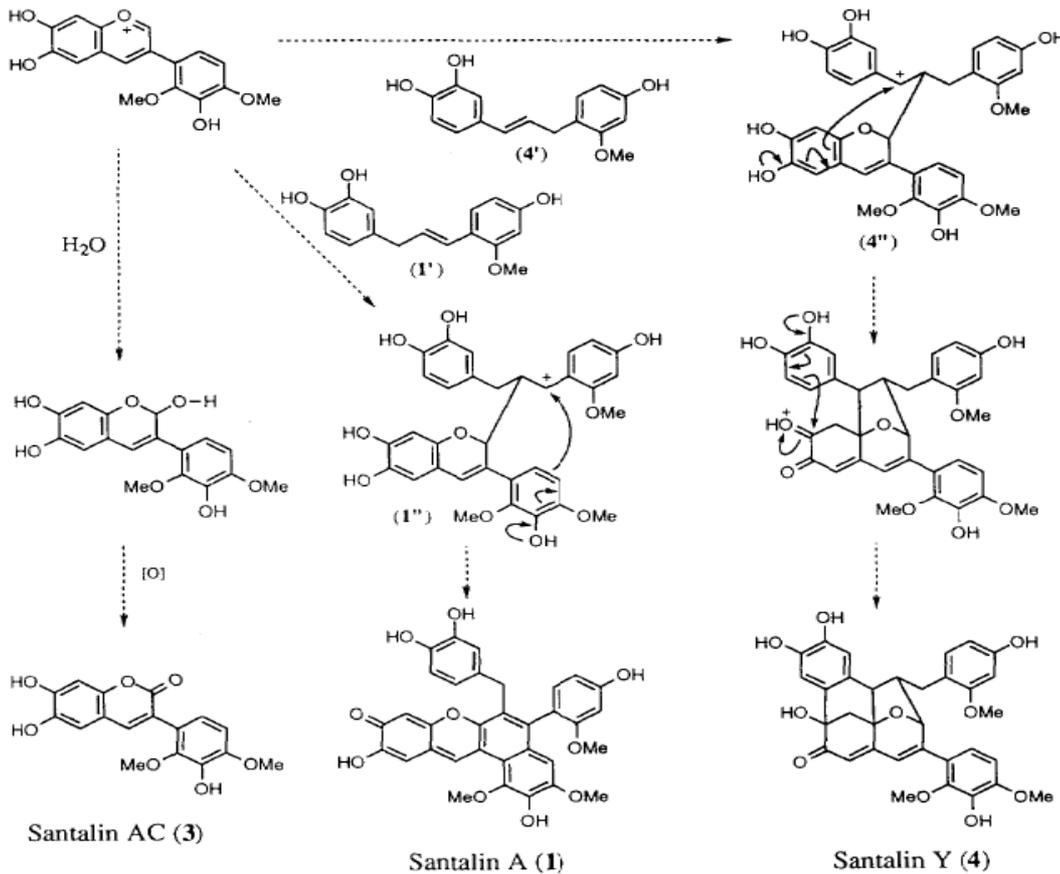


Figure 22 : Flavonoïdes à l'origine la coloration du bois du genre *Pterocarpus* (Kinjo et al., 1995)

D'autres composés comme la catéchine, sont impliqués dans des phénomènes de changement de couleur du bois de hêtre lors du séchage (Ananías et al., 2001 ; Koch et al., 2003).

La santé humaine est l'un des domaines dans lequel les flavonoïdes sont le plus utilisés. Etant incapable de produire la totalité des antioxydants dont il a besoin, le corps humain a recouru à un apport extérieur d'antioxydants, principalement par le biais de l'alimentation. Ces antioxydants, dont de nombreux flavonoïdes, sont présents dans les végétaux (fruits, légumes, tubercules...) que nous consommons (Rice-Evans 1997; Nève 2002). Les flavonoïdes sont également très utilisés en cosmétique, et participent à la lutte contre le vieillissement cutané en tant que composés antioxydants. Ils limitent l'accumulation des formes actives de l'oxygène très réactives, et protègent les protéines structurales de la peau (collagène et élastine) (Macheix et al., 2005). Dans le domaine pharmacologique, l'utilisation combinée de la morine avec des drogues anti-tumorales permet de minimiser les effets néfastes des radicaux libres, lors des traitements en chimiothérapie (Kok et al., 2000). Les proanthocyanidines (biflavonoïdes) possèdent des effets anti-inflammatoires, anti-allergiques

et anti-ulcéreux (Santos-Buelga et Scalbert 2000; Hooper et Cassidy 2006). Ces derniers sont également contenus dans le vin, lui conférant des effets cardio-protecteurs.

e) les tannins hydrolysables et condensés

Le terme tannin a longtemps été utilisé pour caractériser des extraits végétaux riches en composés phénoliques, capables de transformer les peaux animales en cuir. Ces composés ont donc été caractérisés plus par leur action tannante vis-à-vis des protéines, que par leur structure chimique (Ossipova et al., 2001; Ossipov et al., 2001; Macheix et al., 2005). En fonction de leur structure chimique, les tannins peuvent être divisés en deux groupes : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Jodin 1994; Hernes et Hedges 2004).

- Les tannins hydrolysables, sont des esters d'acide gallique et de ses dimères (l'acide ellagique et l'aide digallique), et de sucres principalement le glucose (figure 23). Ils sont abondants dans certaines essences comme le chêne, le châtaignier ou le quebracho. Ils peuvent être dégradés par hydrolyse enzymatique (tannase), ou chimique (acide ou basique) en libérant un sucres et une partie phénolique qui peut être de l'acide gallique (gallotannins comme chez le chêne), ou de l'acide ellagique (ellagitannins comme chez le châtaignier) (Scalbert et al., 1989 ; Clifford et Scalbert 2000).

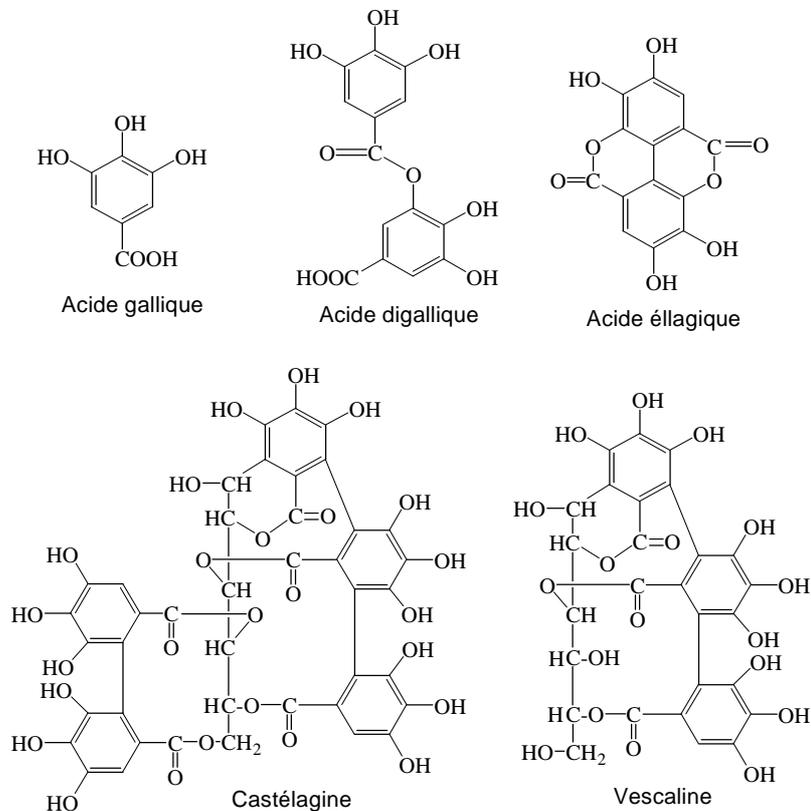


Figure 23 : Structure de l'acide gallique et de ses dimères et de différents tannins hydrolysables

Les tannins condensés sont des polymères d'unités flavane-3-ols, comme la catéchine liées entre elles par des liaisons C₄-C₈ ou C₄-C₆ (figure 24). Ces tannins, contrairement aux précédents, sont assez résistants à l'hydrolyse.

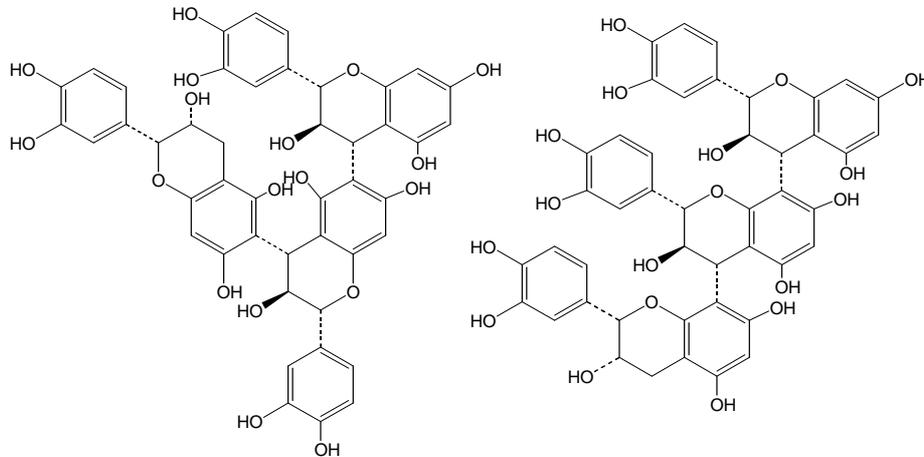


Figure 24 : Structure de différents tannins condensés

La toxicité des tannins vis à vis des microorganismes est un fait établi, trouvant des applications dans de nombreux domaines tels que la pathologie végétale, les sciences du bois ou la pharmacologie.

A l'échelle cellulaire, les tannins perturbent le fonctionnement enzymatique des microorganismes en dénaturant leurs protéines (Schofield et al., 2001). A la fonction dénaturante des protéines, peut s'ajouter une action de complexation de certains ions métalliques comme Al³⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ ou Mg²⁺ (Mila et al., 1996 ; Mc Donald et al., 1996). Les tannins sont également très importants en œnologie. Le bois de chêne, utilisé dans la fabrication des fûts impliqué dans la conservation des vins, possède de grandes quantités de tannins comme les ellagitannins (castélagine, grandinine, roburine A-E) solubles dans le vin (Cadahia et al., 2001 ; Glabasia et Hofmann 2006). Lors du vieillissement du vin, les tannins se dégradent en différents composés qui vont se ré-associer et modifier la coloration et le goût du vin.

Les tannins condensés tout comme les flavonoïdes, ont la même origine bio synthétique basée sur le métabolisme des phénylpropanoïdes (figure 25). Ce métabolisme est un métabolisme secondaire, spécifique du règne végétal. Il conduit, à partir de la phénylalanine, à la synthèse d'une multitude de composés dont la nature varie en fonction des espèces végétales. L'ensemble des composés présentant une structure C₆-C₃ dérive de l'acide *trans*-cinnamique, le premier phénylpropane formé à partir de la Phénylalanine grâce à l'action de la Phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL). Ces composés secondaires sont

impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la pigmentation, la protection contre les attaques des microorganismes, ou encore la signalisation (Raven et al., 2000 ; Macheix et al., 2005).

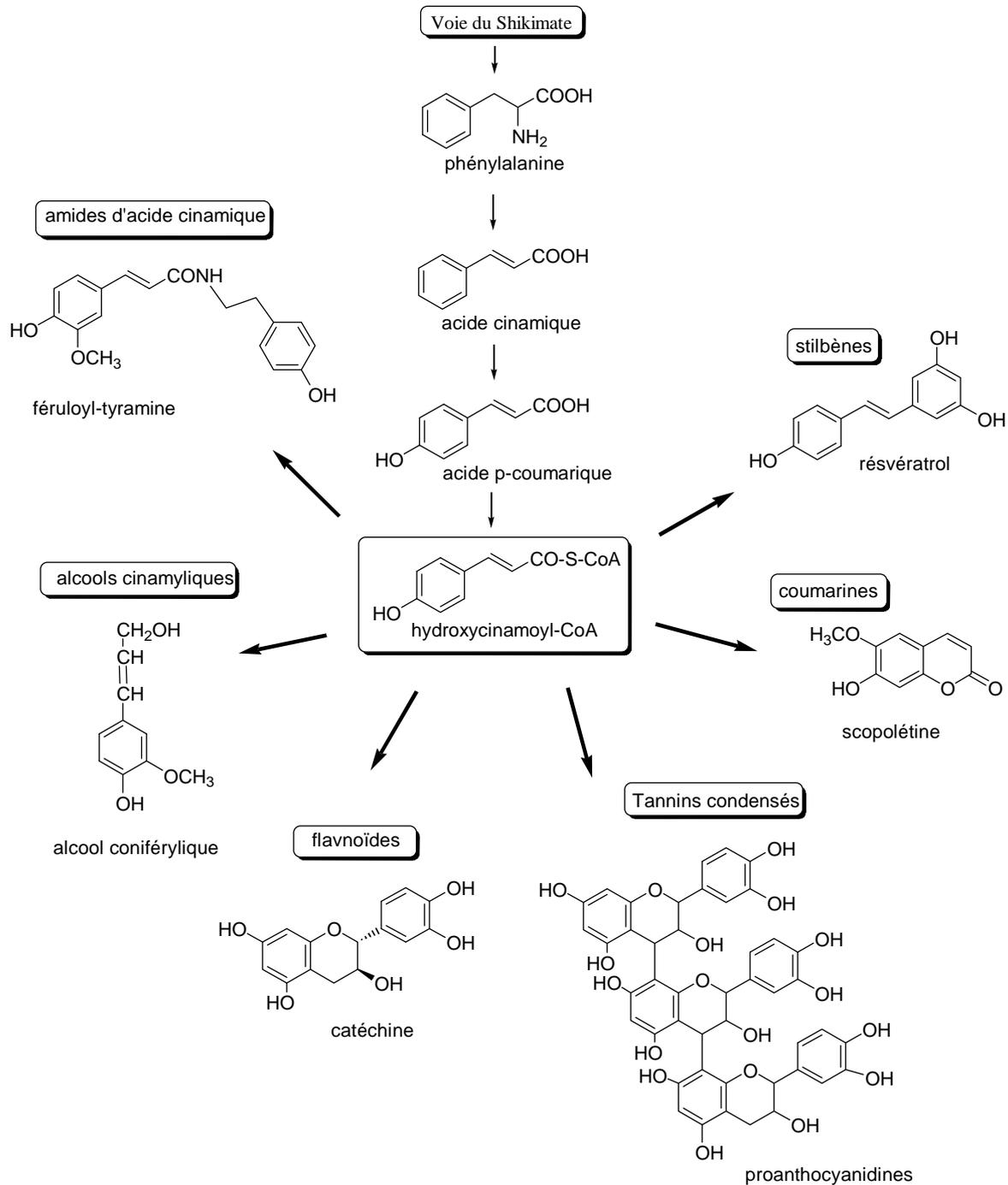


Figure 25 : Métabolisme des phénylpropanoïdes (Hoffmann 2003)

2.2.5. Les minéraux

Les substances minérales, bien que leurs pourcentages soient très faibles, participent de manière importante au développement de l'arbre. C'est le cas des minéraux tels le potassium, le calcium et le magnésium. Les bois des zones tropicales présentent des taux en substances minérales plus importants que ceux des zones tempérées, souvent associés à des taux de silice anormalement élevés. C'est ainsi que le bois de *Baillonella toxisperma* (Moabi) présente des taux en silice très élevés 0,2-0,5%, responsables des problèmes rencontrés lors du sciage de ce dernier (Gérard et al., 1998). Les minéraux, sont entièrement contenus dans les cendres sous formes oxydés après combustion de la matière organique à haute température.

2.3. Méthodes d'analyses utilisées pour les composés du bois

Du fait de la complexité de la composition chimique du bois (cf 2.2), l'analyse des constituants lignocellulosiques, requiert souvent de séparer les différentes familles de constituants avant toute tentative de caractérisation précise.

2.3.1. Fractionnement du matériel

Ce fractionnement sera fonction de sa nature, aubier, feuilles, racines, etc ... et des analyses envisagées. Il commence en général par une étape de broyage suivie d'une étape d'isolement des différents composants :

2.3.1.1. Minéraux

Les minéraux sont obtenus par incinération du bois à haute température (600°C-850°C) sans requérir d'autre opération particulière.

2.3.1.2. Extractibles

L'obtention des extractibles à partir de la sciure se fait par l'utilisation de solvants, sous forme de mélange ou non. Le choix des solvants dépend fortement des structures chimiques des molécules à extraire (Macheix et al., 2005, Jodin 1994). Ainsi, des solvants tels que l'éther de pétrole, l'hexane ou le cyclohexane peuvent extraire des graisses, des acides gras, des stérols et des cires. Les alcools ou des mélanges azéotropiques constitués d'alcools et d'autres solvants organiques (éthanol-toluène) peuvent extraire les composés phénoliques. L'eau et certains mélanges aqueux peuvent extraire les hydrates de carbones, les alcaloïdes, les protéines et des minéraux.

2.3.1.3. *Lignine*

L'isolement de la lignine se réalise en général, après élimination des extractibles, par une étape de dégradation des polysaccharides du bois, permettant d'obtenir un résidu solide de lignine après filtration et donc élimination de tous les composés indésirables contenus dans la phase liquide. Parmi un nombre important de procédures et de variantes de ces dernières, les méthodes les plus fréquemment rencontrées sont appelées lignine à l'acide sulfurique (Klason), lignine à l'acide trifluoroacétique et la lignine à l'acide chlorhydrique (Willstätter). Elles consistent toutes en une hydrolyse en milieu acide et avec chauffage à température élevée, des liaisons glycosidiques des polysaccharides afin de récupérer le résidu de lignine plus résistant dans ces conditions de pH (Fengel et Wegener 1984). Ce type de méthode peut être appliqué également en milieu organique avec, par exemple une lignine au dioxane s'obtenant par mélange de la sciure dans du dioxane en présence d'HCl dilué.

La lignine CEL (cellulolytic enzyme lignin) est, quant à elle, obtenue à partir d'hydrolyse enzymatique des polysaccharides (Hu et al., 2006) dans des conditions plus douces que celles utilisées par les méthodes chimiques avec des températures de traitement aux alentours de 50°C. Les rendements sont plus élevés avec une lignine plus proche de la structure native, le seul inconvénient résidant dans une durée de traitement pouvant dépasser 48 heures.

Une approche remarquable est utilisée Björkman (milled wood lignine MWL) (Fengel et Wegener 1984) permettant d'obtenir une lignine soluble dans des conditions respectueuses de la structure macromoléculaire. Dans ce cas, la lignine est extraite à partir de sciure finement broyée par un mélange eau/dioxane (4/96) sous atmosphère inerte pendant 24 heures avec un rendement moyen.

2.3.1.4. *Holocellulose*

De manière similaire à l'isolement de la lignine par dégradation et suppression des autres composants du bois, les méthodes d'isolement de l'holocellulose sont basées sur l'élimination de la lignine et portent donc le nom de méthode de délignification. Parmi de très nombreuses références, on peut citer quelques grandes méthodes à l'origine de nombreuses variantes :

Le procédé Kraft est la principale méthode utilisée dans cette catégorie par l'industrie papetière. Durant ce procédé, la cuisson standard utilise une solution de soude et de sulfure de sodium à 170°C pendant 2 à 5 heures. La lignine est ainsi solubilisée en fragments de différentes tailles (Fengel et Wegener 1984).

Les procédures généralement utilisées pour l'isolement de l'holocellulose, font appel à différents réactifs. Ainsi la sciure peut être traitée alternativement avec le chlore et le 2-aminoethanol jusqu'à l'obtention d'un résidu blanc (holocellulose). Mais la plus utilisée, est la délignification de l'échantillon grâce à une solution acide de chlorite de sodium (Pettersen 1984 ; Rowell et al., 2005). Les températures et les temps de réactions varient selon les auteurs. Le résidu d'holocellulose obtenu, est rincé à l'eau et séché afin de déterminer sa masse.

a) *hémicelluloses*

Les hémicelluloses peuvent s'obtenir à partir de la fraction d'holocellulose déjà isolée, principalement par des extractions successives de l'holocellulose avec des solutions alcalines de NaOH, KOH, H₃BO₃, Na₂B₄O₇ et NH₃ de concentrations différentes et croissantes, qui permettront d'isoler différents types d'hémicelluloses. La précipitation sélective avec Ba(OH)₂ est une autre méthode de séparation très utilisée, basée sur le taux de mannanes présent dans la composition des différents fragments et l'insolubilité du complexe formé entre le barium et les fonctions hydroxyle en configuration *cis* du squelette mannose (Fengel et Wegener 1984). Mais du fait de l'impossibilité de trouver une méthode véritablement universelle, les isollements d'hémicelluloses se font par combinaisons des conditions afin d'avoir les résultats les plus précis possibles.

b) *cellulose*

Les méthodes précédemment décrites permettent un enrichissement du résidu en cellulose et constitue une des possibilités pour obtenir de la cellulose.

L'isolement de la cellulose a fait l'objet d'un grand nombre d'études et consiste plus exactement en un enrichissement en cellulose. Les méthodes d'enrichissement peuvent être divisées en deux grandes catégories suivant la nature des solvants utilisés. L'extraction peut se faire en milieu fortement basique ou en milieu acide.

L'isolation de la cellulose peut se faire selon les méthodes alcalines, à partir de sciure ou d'holocellulose. Si on a besoin de conserver les différents constituants de l'échantillon intacts, on peut utiliser deux méthodes.

L'holocellulose obtenu est extrait avec différentes concentrations d'hydroxyde de potassium et d'hydroxyde de sodium jusqu'à purification de la cellulose. La cellulose ainsi isolée après plusieurs répétitions d'extractions à un rendement faible. Des rendements élevés de cellulose, sont obtenus en utilisant la sciure de bois au contact d'une solution de chlore et de dioxyde d'azote dans le diméthyl sulfoxyde. Dans la littérature, de nombreuses modifications de ces

méthodes sont misent en place afin d'augmenter les rendements et d'obtenir la cellulose la plus pure possible (Fengel et Wegener 1984).

La seconde méthode d'extraction utilise plusieurs lavages dont un avec de l'eau oxygénée.

Si on ne veut pas récupérer les hémicelluloses et la lignine, il existe une méthode beaucoup plus rapide qui consiste à immerger l'échantillon dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à deux moles par litre à 70°C pendant 5 heures.

Des méthodes d'hydrolyses acides de sciure ou d'holocellulose peuvent également permettre d'isoler la cellulose. Elles peuvent également se faire en complément du fractionnement de la sciure ou l'holocellulose, au niveau des dernières étapes d'isolation des hémicelluloses. La méthode d'Adams avec pour réactifs l'eau, l'acide acétique glacial et le chlorite de sodium conduit à la destruction de la lignine. D'autres méthodes sont fréquemment utilisées, avec l'acide sulfurique (72%) et l'acide trifluoroacétique comme agents d'hydrolyses. Les quantités et concentrations des acides peuvent varier en fonctions des auteurs (Pettersen 1984 ; Karr et al., 1991 ; Rowell et al., 2005).

2.3.2 Analyses des modifications intervenant sur les polymères du bois

2.3.2.1. La spectroscopie infrarouge

Cette technique permet de caractériser les changements globaux de nature des fonctions chimiques présentes à la surface ou dans le matériau comme l'illustrent de manière non exhaustive les exemples ci-dessous :

- Pandey et Pitman (Ferraz et al., 2000 ; Pandey et Pitman 2003, 2004) ont montré des changements d'intensités de bandes caractéristiques de la lignine et des polysaccharides durant la dégradation des bois de hêtre et pin par *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Coniophora puteana*. Ainsi, chez les bois dégradés par *C. puteana*, une diminution des hauteurs des bandes représentant les polysaccharides (1738, 1375, 1320, 1158, 1060, 898 cm^{-1}) s'oppose à une augmentation des hauteurs des bandes liées à la lignine 1596, 1505, 1230 et 1122 cm^{-1} dans le hêtre et 1596, 1511, 1425, 1268, et 1220 cm^{-1} chez le pin. Les bois dégradés par *Trametes versicolor* bien qu'ayant des pertes de masse élevées, présentent une diminution des bandes correspondant aux polysaccharides et à la lignine plutôt simultanée (Pandey et Pitman 2003). Cette méthode, peut ainsi permettre l'identification de certaines familles de champignons (pourriture blanche et brune), en fonction des caractéristiques des spectres du bois après dégradation.

La spectroscopie infrarouge à réflexion totale (ATR) est quant à elle plus rapide et plus simple que l'IRTF par transmission du fait de la simplicité de préparation de l'échantillon, ne nécessitent pas la préparation de pastilles de KBR. Cette technique peut être utilisée sur des poudres de bois ou directement sur des blocs.

De nombreuses études utilisant la spectroscopie IR ont montré que *Trametes versicolor* est non sélectif et dégradent aussi bien la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (Pandey et Pitman 2003). L'utilisation de l'ATR sur du bois de hêtre dégradé par *Trametes versicolor* permet de mettre en évidence une dégradation préférentielle de la lignine et des hémicelluloses, comparativement à la cellulose (Mohebbi 2005).

- la présence d'une forte bande à $1690-1730\text{ cm}^{-1}$ comparé au control durant le greffage des isocyanates sur du bois, montre la présence de la fonction carbonyle (C = O) (Williams et Hale 1999 ; Nguila et al., 2006). En étudiant la réactivité du bois traité thermiquement avec des anhydrides d'acides et des isocyanates, Nguila et al (2006) ont observés l'apparition de bandes d'absorption se situant à 1730 cm^{-1} ; 1222 et 750 cm^{-1} . Ses bandes sont caractéristiques respectivement des liaisons C=O, C-N et N-H.

-Pour des traitements thermiques réalisés sous atmosphère inerte entre 180°C et 260°C , on observe une dégradation générale des hémicelluloses, au travers de la diminution de la bande C=O des groupes d'acetyl (1750 cm^{-1}) et une libération de l'acide acétique (Pétrissans et al., 2003 ; Weiland et Guyonnet 2003; Hakkou et al., 2005). Un phénomène de séchage est mis en évidence par la diminution de la bande à 1640 cm^{-1} (disparition d'eau). Une augmentation de la bande à 1160 cm^{-1} est probablement due à de nouvelles liaisons C-O-C. Le squelette aromatique de la lignine est également affecté, au travers de la diminution des bandes autour de 1600 cm^{-1} .

2.3.2.2. La résonance magnétique nucléaire

La RMN est une technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques. Elle donne accès à diverses informations concernant la nature des atomes d'hydrogène, le squelette carboné, et la fonctionnalisation des polymères constitutifs du bois. De par la nature polymérique du bois la méthode utilisée généralement est la RMN-CP MAS encore appelée RMN du solide.

Ce type d'analyse permet de mettre en évidence que les composés les plus facilement dégradés par les champignons de pourriture brunes sont les hémicelluloses et la cellulose amorphe. La lignine subit quant à elle de légères modifications due principalement à la diminution des groupements méthoxy et au clivage des liaisons C α -C β et β -O-4 (figure 26).

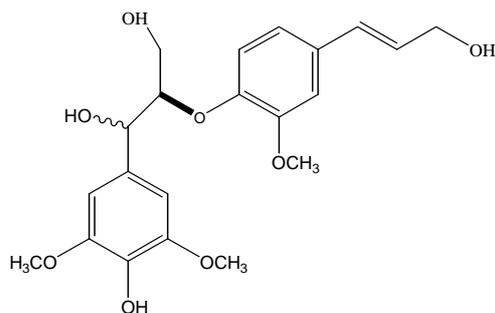


Figure 26: Quelques liaisons au sein des lignines

En utilisant la RMN du carbone ¹³, Martinez et al. déterminé la différence de composition chimique en unités syringyl et guaiacyl des lignines de *Gevuina avellana*, *Eucryphia cordifolia* et *Nothofagus dombeyii* (Martinez A et al., 1999). De plus il a été montré qu'une lignine riche groupement syringyl constitue un facteur structural facilitant la délignification par des pourriture blanches. Cette technique permet de suivre l'évolution de la composition chimique du bois durant la dégradation. Ainsi, la dégradation du bois d'épicéa par *Gloeophyllum trabeum* montre une importante diminution des signaux attribués aux polysaccharides (56 ppm à 110 ppm) et de faibles modifications des signaux dus la lignine (135 à 160 ppm) (Filley et al., 2002).

La déacetylation des hémicelluloses durant le traitement thermique, est déterminée par la diminution des intensités des signaux à 23 ppm (signal du méthyl des groupe acetyl) et 175 ppm (groupe carboxylique) (Tjeerdsma et al., 1998). L'apparition de nouveaux signaux entre 125 et 135 ppm après traitement thermique indique la formation de nouvelles liaisons aromatiques attribuées à des réactions de condensation et thermo réticulation des lignines. Dans le même temps, on observe une augmentation de la cristallinité de la cellulose (Sivonen et al., 2002 ; Wikberg et Maunu 2004 ; Hakkou et al., 2005).

La RMN du solide peut également être très utile pour caractériser des bois suite à différentes modifications chimiques. L'acide polyacrylique greffé au niveau de la fraction de lignine plutôt qu'au niveau de la fraction d'holocellulose est mise en évidence par l'augmentation des signaux à 175 ppm (groupe carboxylique) et 37 ppm (chaînes carbonées aliphatiques) (Marchetti 1998). Les fonctions carbamates consécutives aux gréffages sur le bois de *Picea abies* d'isocyanates sont détectables à 154 ppm par RMN du carbone ¹³ (Edou-Engonga et al., 1999).

2.3.2.3. La spectroscopie de photoélectrons X

Une autre méthode permettant de caractériser les changements intervenant sur la composition chimique de la surface du bois est la spectroscopie de photoélectrons X (XPS). Cette

méthode, est une méthode d'analyse de surface allant jusqu'à 20 nm maximum de profondeur. Donnant des informations sur la composition chimique du matériau analysé.

L'XPS a été utilisée pour caractériser les surfaces de bois traités mécaniquement au microtome ou poncés. Le ratio atomique O/C observé est plus bas pour les échantillons poncés, du fait d'une diminution de la quantité de cellulose due au ponçage (Sinn et al., 2001).

Des analyses réalisées sur du hêtre traité thermique ou non mettent en évidence une diminution du rapport O/C suite au traitement thermique et une bonne reproductivité de la technique, moyennant de prendre garde à rafraîchir la surface de l'échantillon avant analyse pour éviter les problèmes de contamination des surfaces dues aux dépôts de composés organiques volatiles. Cette méthode peut ainsi être utilisée seule ou en complément avec d'autres méthodes spectroscopiques pour l'analyse du bois (Nguila Inari et al., 2006).

2.3.3. Analyses des extractibles

2.3.3.1. La résonance magnétique nucléaire

L'utilisation de la RMN pour l'identification des extractibles peut se faire en utilisant soit la RMN du carbone¹³, soit la RMN du proton qui sont des techniques complémentaires.

L'isolation et la purification préalable des molécules, a permis d'identifier de nombreux composés. Ainsi, des acides triterpéniques permettent de lutter contre le cancer de la prostate, ont été isolés du *Prunus africana* (Fourneau et al., 1996). L'utilisation combinée de méthodes analytiques et de techniques RMN (H^1 et C^{13}), a permis d'identifier de nombreux extraits phénoliques du bois et des feuilles de *Grevillea Robusta* impliqués dans la lutte contre le HIV-1 (Ahmed et al., 2000 ; Mburu 2007). Des composés tels que des glycosides de chalcones ou de stilbenes glycosides ont pu être isolés et identifiés par RMN à partir de l'écorce de *Guillotinade tessmanii*, plante très utilisée en médecine traditionnelle en Afrique centrale (Fuendjiep et al., 2002).

Afin d'éviter, ou tout au moins de réduire les étapes fastidieuses de purification pour l'analyse d'un mélange complexe, une méthode d'identification des constituants de mélanges naturels, basée sur l'analyse de spectres RMN du carbone¹³ a été mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse (Bradesi *et al.*, 1996 a et b). Cette méthode d'analyse, couplée ou non à une méthode GC/MS, permet de caractériser la composition de nombreuses huiles essentielles (Mariotti et al., 1997 ; Filippini et al., 2000 ; Baldovini et al., 2001). Elle a également permis d'analyser la variabilité chimique de diverses

plantes comme *Thymus herba-barona*, *Thymus carnosus*, *T. caespititius* et *T. camphoratus* (Salgueiro et al., 1995 et 1997 ; Corticchiato et al., 1998).

2.3.3.2. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse permet d'opérer, la séparation de composés volatils ou rendus volatils de mélanges très complexes, et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit. Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification sans l'apport du couplage entre la GC et une technique d'identification spectroscopique: en général la spectrométrie de masse (GC/MS) (De Hoffmann 1999 ; Constantin 1996).

L'utilisation de la GC, a permis selon les travaux de Fernandes de séparer les composés présents dans *Populus tremuloides*. Dans ce travail, les auteurs ont isolé plus de 70 composés dont des stérols, des di et triglycérides et des flavonoïdes. De plus, 44 de ces composés ont pu être identifiés (Fernandez et al., 2001).

Pour des composés peu volatils renfermant des groupements hydroxyle, il est nécessaire d'avoir recours à une méthode de dérivation. Ces méthodes ont pour but de contourner les problèmes dus aux interactions de type liaisons d'hydrogène des groupements hydroxyle avec la colonne, en dérivant les composés sous forme d'acétate, d'éther méthylé ou silylé grâce à différents réactifs. En utilisant comme réactif de dérivation le mélange N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide/triméthylchlorosilane (BSTFA/TMSCl), Zule a déterminé la nature et la concentration des composés présents dans des extraits de hêtre obtenus à l'acétone et à l'hexane (Zule et Moze 2003). Willför et al. en analysant les extraits silylés de nœuds du bois de *Picea abies*, ont identifié de grandes quantités de lignanes (Willför et al., 2003, 2004). Cependant, l'utilisation de méthodes de dérivation dans des conditions acides et avec chauffage, peuvent donner lieu à la formation de produits secondaires et ainsi compliquer l'analyse.

En utilisant la GC couplée à la spectroscopie de masse, Lavoie et Stevanovic ont pu identifier et quantifier différents composés lipophiles et bioactifs des feuilles du bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*), comme de nombreux triterpènes et acides gras. Les abondances de ces différents composés ont été étudiés en fonction des différentes périodes de l'année (Lavoie et Stevanovic 2005).

La composition chimique du bois de *Ceratonia siliqua* a été déterminée par GC-MS. L'analyse des fractions méthanolique et aqueuse, a permis d'identifier de l'acide gallique, de la catéchine et différents dérivés de cette dernière, et des monosaccharides (Mualla Balaban 2004).

2.3.3.3. Chromatographie liquide haute performance

Il s'agit d'une méthode de séparation des constituants d'un mélange. Le principe de base de la séparation est le passage d'un liquide à haute pression (phase mobile) contenant l'échantillon au travers d'une colonne (phase stationnaire). La polarité de la colonne ainsi que le type de solvants ont un impact sur la séparation des molécules dû à l'environnement chimique de l'ensemble. L'éluant utilisé peut être une combinaison miscible et variée de solvants (eau, alcools, acétonitrile, dichlorométhane, acide acétique...). Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit gradient ou élution graduée en opposition au mode isocratique, pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse. En sortie de colonne, chaque constituants est révélé par un détecteur. L'instrumentation de l'HPLC se compose de plusieurs éléments: une pompe, un injecteur, une colonne et un détecteur. Pour ce qui est des détecteurs, il en existe notamment deux très utilisés le détecteur à barrette de diode (PDA) et la spectrométrie de masse (SM). Durant ses dernières années, l'utilisation du détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD pour Evaporative Light Scattering Detector) a permis l'analyse de composés non volatiles absorbant ou pas en UV. Le flux de solvant est nébulisé et les gouttelettes formées dans le nébuliseur sont entraînées par le flux de gaz. Les gouttelettes sont alors évaporées pour enlever la phase mobile. Les composés non volatiles présent dans la vapeur de solvant, sont portés par le flux de gaz dans la région de détection. Dans cette zone, un faisceau de lumière croise la vapeur de particules, et la lumière diffusée par les particules est mesurée. L'utilisation de l'HPLC (figure 27) a énormément contribué aux connaissances actuelles dans le domaine de la chimie des extractibles.



Figure 27: Image de l'HPLC utilisée durant notre étude

L'utilisation de HPLC a permis l'identification et la quantification de composés susceptibles de présenter des effets cancérigènes comme l'acide gallique, la quercitine, l'acide ellagique, et la catéchine dans le bois de chêne, de hêtre et de frêne, ont été effectuées par Mammela dans le but de trouver des marqueurs chimiques (Mammela et al., 2001 a et b ; 2002). De la même manière, Bergeron a prouvé l'identité et la réelle provenance de *Echinacea purpurea* et *E. angustifolia*, deux plantes médicinales, en identifiant différents marqueurs phytochimiques propres à chacune de ces espèces (Bergeron et al., 2000).

La combinaison entre L'HPLC et la RMN a permis à Arramon d'identifier la présence de saponines (triterpène lié à un sucre) dans le bois de cœur de chêne rouvre et pédonculé (Arramon et al., 2002). Après une première séparation sur gel de silice par chromatographie classique, l' HPLC a permis d'isoler ces constituants et la RMN de les identifier.

Koch a identifié les composés susceptibles d'être à l'origine du changement de couleur du bois de hêtre en utilisant un détecteur à barrette de diode (Koch et al., 2003). Ces composés, dont la catéchine et la 2,6-diméthoxybenzoquinone, ont par la suite été localisés dans les cellules du parenchyme et dans le lumen des vaisseaux. Pensado quant à lui, a quantifié et identifié des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polluants très toxiques pour l'environnement en utilisant une détection UV couplée à la fluorescence (Pensado et al., 2000). Appliquée au matériau bois, il a confirmé l'efficacité de sa méthode d'analyse en identifiant différents HAP.

En utilisant le détecteur évaporatif à diffusion de lumière, Claarsen et al ont identifier les composés apolaires contenus dans le bouleau (*Betula sp*) et le pin (*Pinus sylvestris*). La séparation, réalisée sur une colonne de type C₁₈ a permis d'identifier et de quantifier différents acides gras, triglycérides, stérols et autres acides résiniques (Claassen et al., 2000). L'absence de chromophore chez les saponines, empêche leur bonne détection dans l'ultraviolet. Et possèdent une détection non spécifique à 200–210 nm. L'utilisation du détecteur évaporatif à diffusion de lumière pour la détection des saponines à été développée et validée. Ainsi, en utilisant ce détecteur Chai et al ont déterminé sept saponines chez une plante médicinale (*Flos Lonicerae*) en utilisant une colonne C18 (Chai et al., 2005).

L'utilisation de différentes colonnes : échangeuses d'ions, greffée NH₂, greffée C₈ ou C₁₈ conduit à des interactions plus ou moins importantes permettant une meilleure résolution et séparation des pics des composés à analyser. L'analyse des sucres tels que le fructose, le glucose, le sucrose et le lactose ainsi que différents extractibles bioactifs, a été réalisée sur des

colonnes de type NH₂ ou échangeuse d'ions (Von Eggelkrau - Gottanka et al., 2002). Kaar a utilisé une colonne échangeuse d'ions pour quantifier les différents monosaccharides de divers bois et montrer que le bois d' *Abies concolor* contient plus de mannose et moins de xylose que le bois de *Populus tremuloides* (Kaar et al., 1991).

De nombreux couplages sont mis en place afin de mieux séparer les composés. Le couplage HPLC-SM permet d'accéder à la caractérisation de la fraction non volatile des produits naturels, qui peut comprendre les tritérpénoïdes, les flavonoïdes etc. L'HPLC permet un premier fractionnement, les constituants sont séparés par classe de composés avant l'introduction et l'identification par SM en limitant les coélutions. Ainsi, Laitinen et al. ont utilisé ce couplage et celui HPLC-PDA, pour l'identification de composés phénoliques et de tritérpénoïdes de clones de *Betula pendula* (Laitinen et al., 2004).

2.4. Dégradation fongique du bois et marqueurs potentiels

2.4.1. Agents de dégradation fongique

Durant la dégradation du bois, les champignons vont utiliser différents systèmes, enzymatiques ou non, pour assimiler et minéraliser ses principaux constituants. Ainsi des peroxydases, des laccases, des hémicellulases, des cellulases, et autres enzymes sont impliquées dans la biodégradation de la matière lignocellulosique. En fonction du type de champignon impliqué dans la dégradation, tous les constituants chimiques du bois ne sont pas dégradés de manière équivalente. Ainsi, certains champignons appartenant essentiellement aux agents de pourriture blanche, seront capables de dégrader tous les constituants du bois. D'autres, comme les agents de pourriture brune ou de pourriture molle, s'attaqueront aux polysaccharides et dans une moindre mesure à la lignine. Enfin, les champignons de coloration, s'attaquent essentiellement à des composés tels que l'amidon présents dans le bois. Les conditions de développement des champignons varient beaucoup en fonction de leurs types et tous ne nécessitent pas les mêmes conditions de température, d'humidité et de pH pour se développer.

2.4.1.1. Les champignons de coloration

Leurs principaux représentants appartiennent aux genres *Aspergillus sp*, *Ophiostoma sp*, *Aureobasidium pullulans* et *Trichoderma virid*. Les préjudices causés au bois, sont en général d'ordre esthétique et non mécanique. Ces champignons sont très courants sur les bois à forte

humidité comme ceux récemment abattus. Ils sont aussi capables de se développer sur le bois mis en œuvre insuffisamment séché.

2.4.1.2. *Les champignons de pourriture molle*

Ces champignons lignivores appartiennent à la classe des Ascomycètes (*Chaetomium globosum*, *Ustilina deusta*) et des Deutéromycètes (*Alternaria alternata*, *Thielavia terrestris*). Ils sont capables de dégrader les polysaccharides, dont préférentiellement la cellulose, et parfois partiellement la lignine (Martinez A et al., 2005). Ils s'attaquent aussi bien aux bois de résineux que de feuillus dans des conditions importantes d'humidité. La dégradation du bois par ces champignons, est plus lente que celles des pourritures brunes et blanches (Kleist et Schmitt 2001).

2.4.1.3. *Les champignons de pourriture cubique brune*

Ils appartiennent exclusivement à la classe des Basidiomycètes (*Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Poria placenta*, *Antrodia sp*). Le bois dégradé devient cassant, et présente des fissurations délimitant des zones cubiques selon les trois sens d'orientation du plan ligneux, rappelant l'aspect du bois calciné. Leur mode d'attaque est caractérisé par une importante dégradation des polysaccharides qui sont métabolisés, alors que la lignine subit des altérations partielles conduisant à un résidu amorphe et friable. Au niveau cellulaire, la dégradation du bois par ses champignons aboutit à la dégradation presque totale de la couche S2 des parois cellulaires (Green et Highley 1997 ; Lee et al., 2004 ; Anke et al., 2006). La phase ultime de dégradation, aboutit à la perte complète des propriétés mécaniques du bois.

2.4.1.4. *Les champignons de pourriture blanche*

Ils appartiennent principalement à la classe des Basidiomycètes (*Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*), mais certains peuvent être de la classe des Ascomycètes (*Xylaria hypoxylon*). Les agents de pourriture blanche attaquent aussi bien la lignine que les polysaccharides, conférant au bois un aspect fibreux (Martinez A et al., 2005 ; Anke et al., 2006). Certains de ces champignons sont capables de dégrader simultanément la lignine et les polysaccharides, tandis que d'autres ont une préférence pour dégrader la lignine et les hémicelluloses avant de s'attaquer à la cellulose (Martinez A et al., 2005). Au niveau cellulaire, ils dégradent la couche S2, mais aussi les couches S1 et S3. Le bois totalement dégradé par la pourriture blanche, perd toutes ces propriétés mécaniques. Ces champignons, comme *Trametes versicolor*, s'attaquent surtout aux bois de feuillus. Les enzymes de ces derniers, pourraient présenter une plus grande affinité pour les unités syringyle présentes chez

les feuillus, alors que la lignine des résineux, exclusivement composée d'unités guaiacyles seraient moins sensibles (del Rio et al., 2001, 2002).

2.4.2. Biodégradation de la lignine

La dégradation et/ou modification de la lignine par les champignons, est l'une des clés de la dégradation de la matière lignocellulosique. Différentes enzymes oxydatives extracellulaires sont impliquées dans la dépolymérisation de la lignine. On distingue des peroxydases, comme la Lignine peroxydase ou la Manganèse peroxydase (LiP, MnP), et des oxydases (Laccases) (Martinez et al., 2005 ; Kersten et Cullen, 2007). De nombreuses autres enzymes extracellulaires, telles que certaines déshydrogénases (aryl-alcool déshydrogénase, AAD), et oxydases (aryl-alcool oxydase AAO et le glyoxal oxydase GLOX), sont impliquées dans la dégradation de la lignine générant de l'eau oxygénée (H_2O_2) (figure 28). Cette dernière est nécessaire au bon fonctionnement de ces peroxydases, et à la génération de radicaux hydroxyle ($OH\cdot$) (Kersten 1990 ; Guillén et al., 1992 ; Gutiérrez et al., 1994 ; Guillén et al., 1997). Les peroxydases et des oxydases produites par les pourritures, oxydent la lignine en générant des radicaux aromatiques hautement réactifs et non spécifiques (Kirk et Cullen 1998). De plus de nombreuses réactions non-enzymatiques, incluant la décomposition de la liaison C_4 -aryléther ou $C\alpha$ - $C\beta$, la déméthoxylation du cycle aromatique, participent à cette dégradation en produisant des substrats à d'autres enzymes du système (Martinez A et al., 2005). Les quinones formées durant cette dégradation, contribuent à l'activation de l'oxygène dans différentes réactions redox impliquant des quinones réductases (QR), des laccases ou des peroxydases (Guillén et al., 1997). Les radicaux hydroxyles, puissants oxydants vont réagir avec la lignine dans les étapes initiales de la dégradation du bois par les champignons (Ritschkoff 1996 ; Evans et al., 1994).

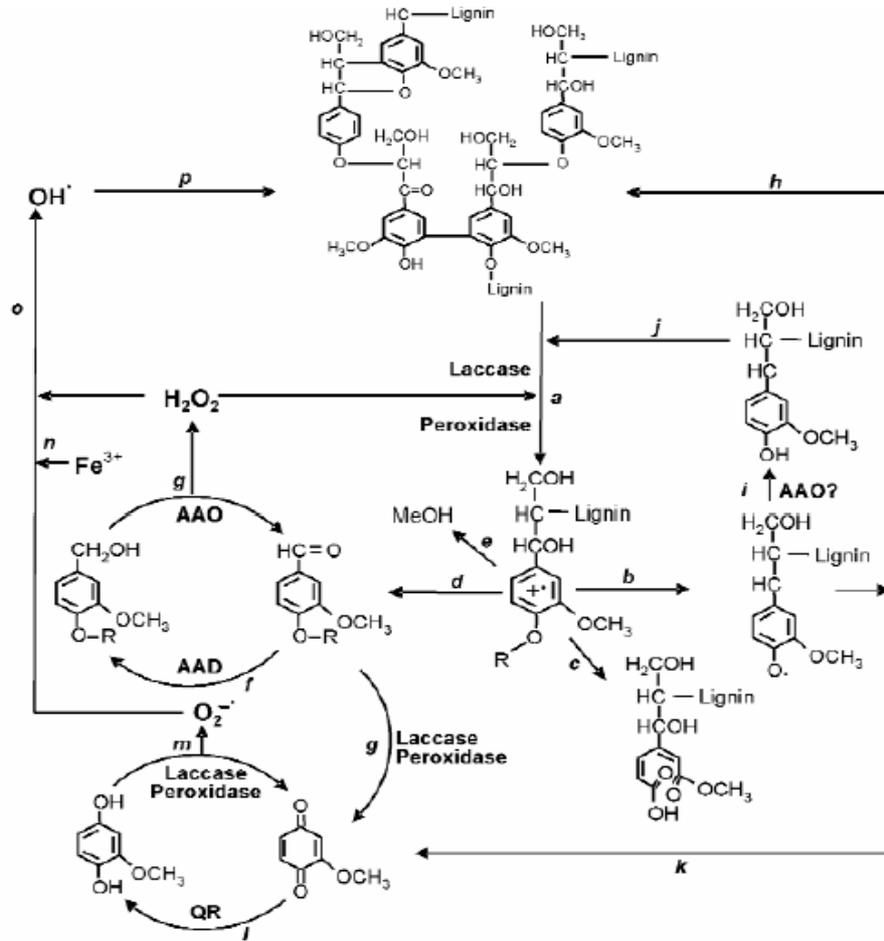


Figure 28 : Systèmes enzymatiques de dégradation de la lignine par les champignons de pourriture (Martinez A et al., 2005)

La production abondante de radicaux est à l'origine de la dégradation de la lignine. Durant les étapes finales de la dégradation, les produits simples de dégradation de la lignine vont être assimilés dans les hyphes fongiques, puis incorporés dans le système métabolique. Comparés aux champignons de pourriture blanche, les champignons de pourritures brunes ont une capacité de dépolymérisation de la lignine moindre à l'exception de ceux possédant des enzymes lignolitiques (D'Souza *et al.*, 1996 ; Lee et al 2004).

2.4.3. Biodégradation des polysaccharides

L'hydrolyse complète des polysaccharides requière l'action combinée de multiples enzymes spécifiques de différents substrats.

Pour ce qui est de l'hydrolyse de la cellulose en glucose, les pourritures blanches utilisent trois types d'enzymes : les cellobiohydrolases, les endoglucanases et les β -glucosidases (Kirk

et Cullen 1998 ; Aro et al., 2004). Les endoglucanases, coupent les chaînes de cellulose par l'intérieur au niveau des liaisons β -1,4-glucosidiques. L'action des endoglucanases, produisent de nouvelles chaînes de cellulose plus courtes qui vont être clivées par les cellobiohydrolases en unités de cellobiose. Les β -glucosidases vont pour ce qui les concerne, hydrolyser la cellobiose en deux molécules de glucose, qui sont aisément métabolisées par le champignon comme source énergétique. Ces enzymes agissent en synergie afin d'être plus efficaces, et de réduire totalement la cellulose en glucose.

Les hémicelluloses présentant une structure plus complexe par rapport à la cellulose, les enzymes impliquées dans leurs dégradation sont très variées (Tenkanen et al., 1995 ; Aro et al., 2004). L'hydrolyse des hémicelluloses se fait par le concept d'endo et exo enzymes, libérant des sucres simples et certains acides. En fonction du type d'hémicelluloses présentes dans le bois, le champignon sécrètera des types particuliers d'enzymes. Ainsi, la décomposition des xylanes implique des endo-1,4- β -D-xylanases, des acétyl estérases, des α -glucuronidases, des β -xylosidases et des α -arabinosidases (figure 29A). L'hydrolyse complète des glucomannanes implique des endomannanes, des α -galactosidases, des acétyl glucomannanes estérases et des β -mannosidases (figure 29B).

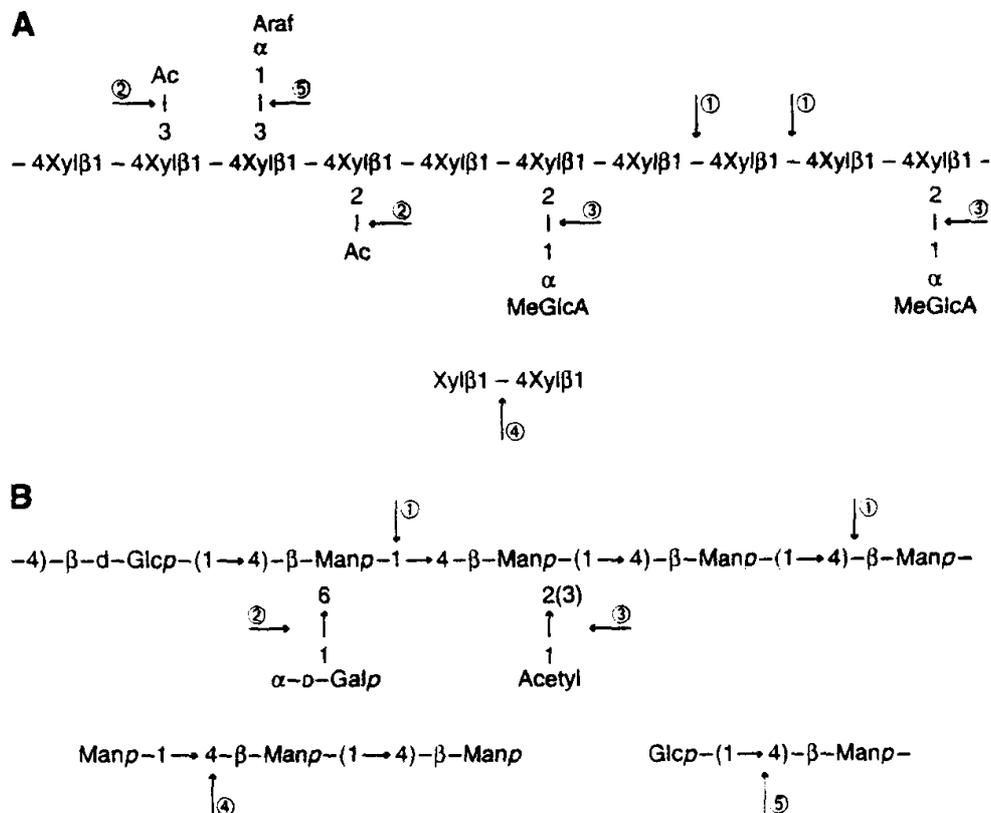


Figure 29 : Systèmes enzymatiques de dégradation des hémicelluloses par les pourritures brunes (Kirk et Cullen 1998)

Les champignons de pourriture brune utilisent en plus des enzymes hydrolytiques, des mécanismes alternatifs impliquant des intermédiaires radicalaires. En effet, de nombreux travaux montrent la génération de radicaux hydroxyles via des réactions de Fenton (Ritschkoff 1966 ; Rabinovich et al., 2004). Ces réactions sont impliquées dans la dégradation des polysaccharides, la déméthylation, et dépolymérisation de la lignine par les pourritures brunes.

2.4.4. Biodégradation des extractibles

La dégradation des extractibles est un phénomène qui se déroule généralement dans les premières phases de la dégradation du bois, (perte de masse < 5%). Les composés majoritaires des parois cellulaires du bois tels que la lignine, la cellulose et les hémicelluloses durant cette période sont peu modifiés (Messner et al., 1998).

Certains champignons de coloration (*Ophiostoma piliferum*, *Pestalotiopsis crassiuscula*, *Ophiostoma ainoae* et *Ceratocystis allantospora*), sont connus pour dégrader les triglycérides, les diglycérides, les stérols, les acides résiniques et les acides gras contenus dans le bois de pin (Martínez-Iñigo et al., 1999 ; Dorado et al., 2000). Ces champignons sont capables d'utiliser les extractibles contenus dans les cellules parenchymateuses du bois comme sources de carbone.

D'autres champignons, comme *Trametes versicolor*, *Bjerkandera sp*, *Funalia trogii*, ont été utilisés pour l'élimination des extraits lipophiles de bois de pin et d'eucalyptus utilisés dans l'industrie papetière (Martínez-Iñigo et al., 1999 ; Dorado et al., 2001). En fonction de la souche utilisée, une réduction significative pouvant atteindre 50–70 % de la teneur initiale en extractibles, a pu être mise en évidence. Les champignons de pourriture blanche sont capables de métaboliser différents types d'extractibles, aussi bien hydrophiles que lipophiles.

Du fait de leur aptitude à dégrader la lignine liée à de fortes activités enzymatiques de type peroxydase, les pourritures blanches ont fait l'objet de nombreuses études, à des fins d'applications industrielles ou dans le domaine de l'environnement. Nombreux de ces champignons sont utilisés pour la dégradation des composés difficilement dégradables, comme les composés phénoliques et des dérivés halogénés toxiques (Bhat et al., 1998 ; Hundt et al., 1999 ; Leontievsky et al., 2000).

Les processus de dégradation des composés phénoliques, dont les tannins condensés ou les flavonoïdes ont été très étudiés (Archambault et al., 1996 ; Touré et al., 1997 ; Bhat et al., 1998 ; Lacki et Duvnjak 1998 ; Arunachalam et al., 2003). La figure 30 rapporte les

principaux produits de dégradation issus des flavonoïdes. La catéchine est initialement dégradée en phloroglucinol et en acide protocatechuique par clivage de l'hétérocycle. Ces deux molécules, vont ensuite subir différentes conversions enzymatiques afin d'être assimilées par l'intermédiaire du cycle de l'acide citrique. Du début de la dégradation à l'assimilation totale de ces composés, le champignon émet et met en jeu diverses enzymes extra et intracellulaires qui agissent en synergie.

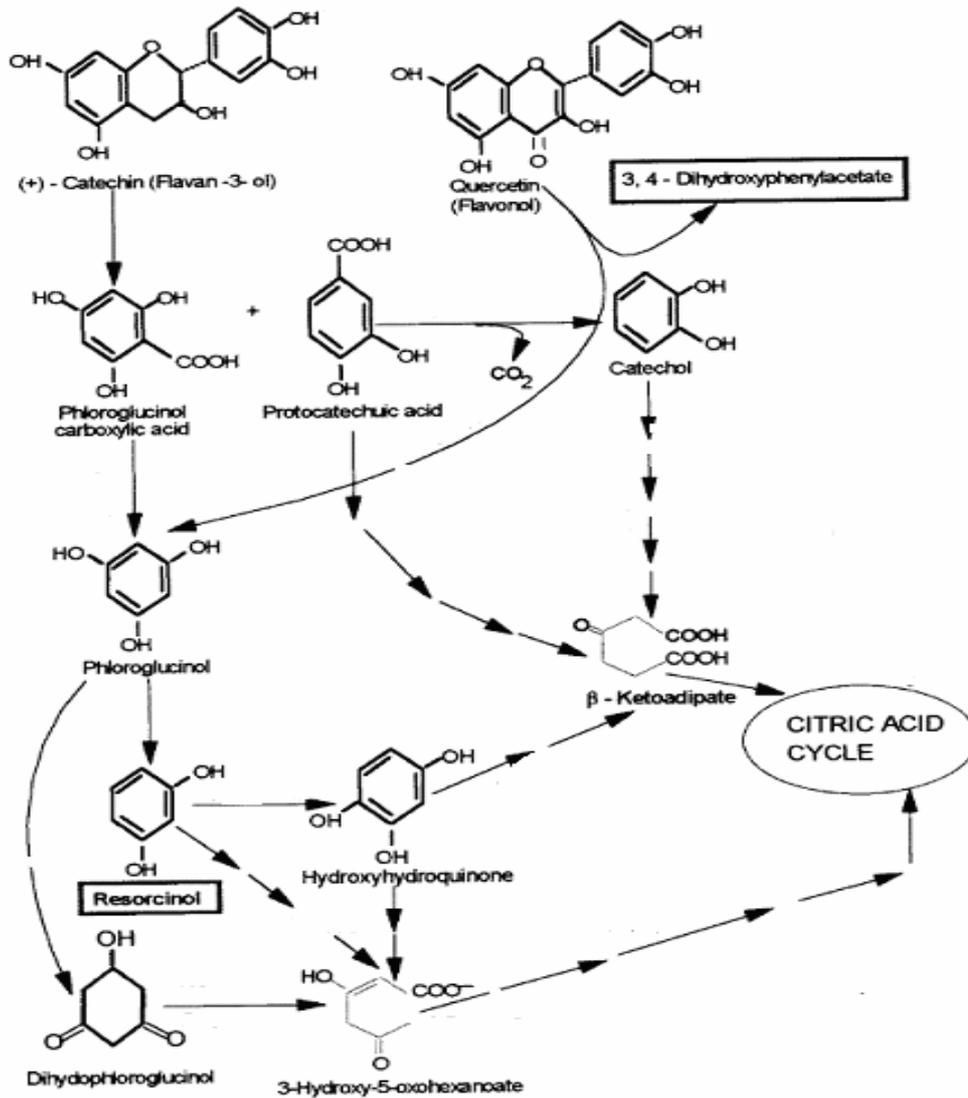


Figure 30 : Mécanismes de dégradation de la catéchine et quercétine par les microorganismes (Bhat et al., 1998)

2.4.5. Mise en évidence de la dégradation du bois par les champignons

La dégradation du bois par les champignons est généralement mise en évidence par les pertes de masse occasionnées au matériau après une période plus ou moins longue d'incubation en

présence de ces derniers. Différentes normes destinées à évaluer soit l'efficacité de produits de préservation, soit à évaluer la durabilité naturelle du bois, mettent directement en œuvre cette méthodologie (NF EN 113, NF EN 350-1...). L'inconvénient majeur de ces méthodes, réside dans la période d'incubation relativement longue nécessaire pour obtenir des pertes de masse significatives. Différentes variantes de ces méthodes ont été proposées en remplaçant l'estimation de la perte de masse, par pesée par des estimations basées sur la diminution des propriétés mécaniques du bois (Curling et al., 2002). Une autre méthode d'évaluation de la dégradation du bois par les champignons, concerne la quantification de la biomasse fongique se développant à la surface du bois. Cette biomasse fongique, est une mesure de l'activité du champignon en fonction du temps (Gessner et Schmitt 1996 ; Richardson et Logendra 1997 ; Dawson-Andoh 2002 ; Mille Lindblom et al., 2004).

A coté de ces méthodes classiques, on peut également trouver d'autres méthodes basées sur l'utilisation de traceurs. La production de traceurs volatiles ou non par les champignons poussant sur le bois, est également une voie très étudié dans l'identification de marqueurs fongiques (Larsen et al., 1995 ; Verscheure et al., 2002).

Ces traceurs encore appelés marqueurs, sont généralement des composés chimiques caractéristiques, permettant de mettre en évidence indirectement une activité donné. Ce type d'approches très utilisées dans des domaines très variés tels ceux des fraudes, la médecine et agroalimentaire peut également s'appliquer dans le cas de la préservation du bois. Actuellement, trois grandes catégories de marqueurs potentiels sont rapportées dans le domaine de la dégradation du bois par les champignons de pourritures.

- La première catégorie de marqueurs, concerne l'identification et la quantification de composés directement issus du développement, et du métabolisme des champignons tels que l'ergostérol ou la chitine. L'ergostérol est un des constituants essentiels des parois cellulaires fongiques, dont la quantité peut atteindre jusqu'à 4% de la masse sèche fongique (Richardson et Logendra 1997 ; Dawson-Andoh 2002 ; Mille-Lindblom et al., 2004). Ce stérol membranaire est spécifique du champignon, et n'existe pas dans les tissus du bois. Sa quantité peut être influencée par différents facteurs internes et externes, comme la nature du champignon, sa physiologie, son âge, ses conditions de croissance, la composition du substrats, le pH et la température (Dawson-Andoh 2002). L'ergostérol est extrait du mycélium et analysé par HPLC. Un second marqueur caractéristique du développement du champignon concerne la chitine. La chitine est un polymère constitué d'unités *N*-acetylglucosamine contenu dans toutes les cellules fongiques. La chitine est de ce fait rapportée comme un

marqueur de la production totale de la biomasse fongique (Nilsson et Bjurman 1998), pouvant également être corrélé à la dégradation du bois (Lindahl et Finlay 2006). Un suivi de ces deux bio-marqueurs, peut donc permettre de mieux apprécier le développement d'un champignon durant la dégradation du bois.

- La seconde catégorie de marqueurs, concerne l'analyse et l'identification de dérivés provenant de la dégradation du bois. De nombreux composés ont ainsi pu être identifiés par analyses chromatographiques. Selon le type de bois et de champignons impliqués, les marqueurs identifiés peuvent être très variables (Higushi T 2004 ; Martínez A et al., 2005). La complexité de la composition chimique du bois et des mécanismes mis en jeu (enzymes, chélateurs et autres intermédiaires), rend l'identification des voies de dégradation difficile. Néanmoins, grâce à l'utilisation de molécules radioactives et de composés modèles de la lignine, certains auteurs ont proposé des mécanismes de dégradation de la lignine par les enzymes de champignon comme *Trametes versicolor* (Higushi T 2004). Ainsi, la dégradation d'une lignine de type syringyle par les enzymes de *Trametes versicolor*, conduit à des composés tels que la 2,6-diméthoxy parahydroquinone, la 2,6-diméthoxy parabenzoquinone, le syringaldehyde et l'acide syringique (Kawai et al., 2004 ; Higushi T 2004). Ces enzymes catalysent l'oxydation des groupes hydroxyle benzylique de la lignine, en groupes carbonyles ou cétones à certaines étapes de la dégradation. Ces mêmes enzymes de *Trametes versicolor*, catalysent également l'oxydation d'extractibles comme l'acide sinapique conduisant à l'acide déhydrodisinapique dilactone, et à la 2,6-diméthoxy parabenzoquinone (Lacki et Duvnjak 1998).

Les champignons de pourriture brune, bien que n'étant pas réputés pour dégrader la lignine, conduisent également à la génération de composés phénoliques. Les travaux de Filley (2002), ont permis d'identifier des marqueurs de la dégradation du bois par différents agents de pourritures brunes (*Postia placenta* et *Gloeophyllum trabeum*). Ces travaux ont mis en évidence des composés tels que le 3,4-diméthoxyacetophenone et l'acide vanillique (Filley et al. 2002). Les produits majoritaires de dégradation générés par les champignons de pourriture brune, résultent de réactions de déméthylation et d'hydroxylation de la lignine, ainsi que de réactions d'oxydation d'extractibles présents dans le bois. L'acide vanillique est également rencontré durant l'oxydation de la lignine par un nombre nombreux agents microbiens (Enoki et al., 1988).

De nombreux auteurs ont montré que l'acide 4-hydroxycinnamique, l'acide ferrulique, l'hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, la 2,6-diméthoxy parahydroquinone ou la 2,6-diméthoxy

parabenzoinone pouvaient stimuler des réactions de dégradation enzymatique causées par les champignons (Sethuraman et al., 1998 ; Tsujiyama et al., 2003 ; Marques de Souza et al., 2004).

- La dernière catégorie, regroupe les médiateurs impliqués dans les systèmes d'oxydation des enzymes fongiques. Ces médiateurs pourraient ainsi jouer le rôle de marqueur spécifique d'une activité enzymatique de dégradation donnée. Ainsi, l'alcool veratrylique produit par certains champignons est impliqué dans de nombreuses réactions du processus de dégradation de la lignine (Sutherland et al., 1996 ; Laura et al., 1997; Christian et al., 2005). Il joue en effet un rôle clé dans le fonctionnement des enzymes (inducteur endogène et médiateur). De plus, il peut être facilement caractérisé par HPLC du fait de sa structure aromatique.

2.5. Dégradation thermique du bois et marqueurs potentiels

Un autre domaine dans lequel la mise en évidence de marqueurs chimiques peut revêtir un intérêt certain, concerne le domaine du traitement thermique du bois en pleine expansion depuis quelques années. En effet, le traitement thermique est une méthode permettant d'augmenter la durabilité d'essences peu durables, basée sur une dégradation contrôlée de la matière lignocellulosique. Un des points cruciaux de cette méthode, concerne la maîtrise du procédé de traitement qui peut selon les cas, conduire à des produits d'aspects relativement similaires mais présentant des propriétés plus ou moins intéressantes. La mise au point de méthodes de contrôle de la qualité basée sur la mise en évidence de marqueurs chimiques, ainsi que la compréhension des mécanismes moléculaires, impliqués dans les réactions de transformation du bois, présente donc un intérêt particulièrement important.

2.5.1. Principes du traitement thermique

A cause des pressions environnementales apparues en France ces dernières années et dans les principaux états Européens, le développement de pratiques de préservation du bois plus respectueuses de l'environnement, n'impliquant pas l'utilisation de biocides limitant ainsi les risques de rejet de produits toxiques dans l'environnement, suscite un intérêt de plus en plus croissant. Dans ce contexte, le traitement thermique est une des alternatives possibles aux méthodes de préservation classiques, et connaît un développement important depuis une dizaine d'années (Patzelt et al., 2002 ; Militz 2002).

Lorsque le bois est traité à des températures comprises entre 180 et 240°C, ses constituants subissent des modifications chimiques plus ou moins importantes, lui conférant de nouvelles propriétés, dont une amélioration de sa durabilité face aux champignons (Thermowood. 2003 ; Hakkou et al., 2006 ; Mburu et al., 2008). Différents types de traitements thermiques ont été mis en place ces dernières années dans différents pays européens:

➤ *Le procédé NOW*

Ce procédé, connu également sous le nom de réтификаction, implique une pyrolyse ménagée du bois réalisée sous atmosphère inerte (azote), qui permet de dégrader les polymères constitutifs du bois. La température est augmentée de manière progressive, sous atmosphère inerte jusqu'à une température maximale de 250°C. La température de cuisson est variable. Elle dépend de la quantité de produit à traiter. Les gaz produits lors de cette pyrolyse douce sont récupérés à l'aide d'un condenseur à eau. Les incondensables, constitués principalement de dioxyde de carbone et d'azote, peuvent être recyclés dans le four pour rendre l'atmosphère inerte.

➤ *Le procédé PLATO*

Développé aux Pays-Bas, ce procédé se décompose en trois étapes :

- Hydrothermolyse : le bois est chauffé entre 160° et 190° C en milieu aqueux à pression de vapeur saturante. Cette étape dure entre 4 et 5 heures. Les polyoses sont fortement modifiés suite à différentes réactions d'hydrolyse, conduisant à la formation d'oses simples, d'aldéhyde et de quelques acides organiques. La cellulose demeure intacte, ce qui est crucial pour assurer la qualité des propriétés mécaniques.
- Séchage : le bois est séché de manière conventionnelle entre 3 et 5 jours.
- Durcissement : le bois est chauffé à une température de 150-190°C en conditions sèches. Les aldéhydes formés, réagissent avec les molécules de lignine pour constituer des composés non-polaires et donc hydrofuges. La température finale de durcissement, permet d'obtenir des bois définis comme stables dimensionnellement uniquement, ou stables dimensionnellement et durables.

Grâce à ce procédé, il apparaît une augmentation significative de la durabilité de certains bois dits non-durables, ce qui permet des utilisations en classe 3. L'intérêt de ce procédé est d'utiliser des niveaux bas de température, ce qui réduit ainsi le coût énergétique.

➤ *Le procédé ThermoWood*

Développé en Finlande par le VTT, il se décompose également en plusieurs étapes :

- Séchage classique sous vapeur d'eau à 100°C, puis augmentation de la température jusqu'à 130°C pour obtenir une humidité du bois proche de zéro.
- Augmentation de la température du four jusqu'à des températures comprises entre 185 et 230°C, l'atmosphère du four étant saturée en vapeur d'eau et en gaz de pyrolyse.
 - Stabilisation du bois par abaissement progressif de la température par aspersion d'eau.

➤ *Le procédé oléothermique OHT*

Le bois est chauffé dans une huile végétale à des températures comprises entre 180 et 200°C. Il est nécessaire de maintenir la température choisie pendant 2 à 4 heures, pour permettre un traitement à cœur du matériau. Après traitement, une phase de séchage à l'air permet le durcissement de l'huile végétale à la surface du bois. L'huile permet d'avoir une répartition rapide et équilibrée de la chaleur, autour du bois et de limiter l'oxygène dans l'autoclave.

➤ *Le procédé PRODEO*

Ce procédé relativement récent développé en Suisse, est basé sur une nouvelle méthode de chauffe du bois par conduction (Ropp 2007).

2.5.2. Avantages et inconvénients

Suite au traitement thermique, certaines des propriétés du bois sont considérablement modifiées. Ces modifications peuvent pour certaines constituer des avantages pour le bois traité, mais peuvent pour d'autres constituer des inconvénients. Le bois devient plus stable dimensionnellement, moins hygroscopique et présente une résistance accrue aux micro-organismes (Boonstra et al., 1998 ; Kamdem et al., 2002 ; Yildiz 2002 ; Weiland et Guyonnet 2003 ; Gosselink et al., 2004 ; Hakkou et al., 2005 et 2006 ; Boonstra et al., 2007a). Parallèlement à ces modifications bénéfiques pour le matériau, certaines autres propriétés du bois sont détériorées lors du traitement : le bois traité devient ainsi plus friable et cassant, et possède des propriétés mécaniques moins intéressantes comparativement au bois non traité, sa couleur devient brunâtre et le bois peut présenter une odeur plus ou moins désagréable (Santos 2000 ; Kamdem et al., 2002 ; Mouras et al., 2002 ; Unsal et Ayrimis 2005 ; Yildiz et al., 2006 ; Boonstra et al., 2007b ; Mburu et al., 2008 ; Korkut 2008 ; Korkut et al., 2008). Dans tous les cas, l'optimisation du procédé de traitement thermique consistera à trouver les meilleures conditions pour améliorer la stabilité dimensionnelle, et la durabilité du matériau sans diminuer de façon trop importante ces propriétés mécaniques.

2.5.3. Marqueurs potentiels du traitement thermique du bois

2.5.3.1. *Composition chimique du bois traité thermiquement*

Une première catégorie de marqueurs possibles, concerne l'analyse des produits de dégradation du bois suite au traitement thermique.

Lors du traitement, les différents constituants sont plus ou moins dégradés, en fonction des conditions opératoires mises en place lors du traitement. Bien que les plages de dégradation annoncées par différents auteurs ne soient pas toujours exactement les mêmes, il est généralement admis que les hémicelluloses sont, des trois principaux constituants du bois les plus sensibles. Selon la littérature, la température de début de dégradation des hémicelluloses est comprise entre 200 et 260°C, en fonction du type de ces derniers (Weiland et al., 2001 ; Alén et al., 2002), celle de la cellulose entre 250 et 300°C (Bourgeois et al., 1989 ; Zawadzki et Wisniewski 2002), alors que la température de dégradation de la lignine serait supérieure à 350°C. Il est toutefois important de noter que des changements structuraux de la lignine sans perte de masse, ont été rapportés pour des températures comprises entre 250 et 320°C (Gardner et al., 1985).

Les xylanes sont connus pour être le type d'hémicelluloses le plus sensible (Alén et al., 2002). Leur dégradation, tout comme celles des autres types d'hémicelluloses, conduit principalement à la formation de différents composés volatiles, parmi lesquels ont pu être identifiés du furfural, du méthanol, de l'acide formique, de l'acide acétique, et divers autres acides organiques. La formation d'acide acétique et d'acide formique, peuvent jouer le rôle de catalyseurs acides, et contribuer à l'augmentation de la vitesse de dégradation des polysaccharides et de la lignine (Weiland et al., 2001 ; Sundqvist et al., 2006). La nature des réactions chimiques impliquées dans les réactions de dégradation, peuvent différer en fonction du type de traitement concerné (voie humide ou voie sèche).

Concernant la cellulose, une augmentation du taux de cristallinité global est généralement observé (Bourgeois et al., 1989 ; Kim et al., 2001 ; Maunu 2002 ; Yildiz et al., 2007). Cette augmentation peut trouver différentes explications: les zones amorphes plus réactives, sont préférentiellement dégradées, conduisent après réarrangement de leur structure supramoléculaire, à un taux de cristallinité plus élevé. La pyrolyse de la cellulose est généralement caractérisée par des réactions de déshydratation et des dépolymérisation. Les premières réactions de déshydratations se produisent entre 250 et 280 °C, aboutissant à la formation de résidu solide et de produits volatils (Roberts 1970).

La lignine pour sa part, est rapportée pour subir différentes réactions de thermo-réticulation et de condensation (**Weiland et al., 2001** ; Tjeerdsma et al., 1998 ; Sivonen et al., 2002 ; Hakkou et al., 2005 ; Maunu 2002). Ces réactions se produisent à basse température, comme cela a été démontré chez le pin et le hêtre par **Weiland (2001)**. La dégradation effective de la lignine avec perte de masse n'intervient que pour des températures supérieures à celles utilisées lors du traitement thermique. Ces réactions de thermo-réticulation seraient à l'origine de l'augmentation de la stabilité dimensionnelle du bois.

2.5.3.2. *Composés extractibles formés lors du traitement thermique*

Durant le traitement thermique des bois de chêne et châtaignier, on observe une augmentation des concentrations de certains composés extractibles déjà présents initialement dans le bois, comme les acides ellagique, gallique et vanillique, et la formation de substances spécifiques au traitement thermique tels que composés furaniques. Ces derniers, comme le 2-furfural et le 3-furfural, proviennent de la dégradation des pentoses alors que le 5-hydroxyméthyl-2-furfural provient de la dégradation des hexoses (Desobry et Barthelemy 2006). De nombreux autres composés ont également été identifiés comme des phénols volatiles, comme le 2,6-diméthoxyphénol et le 2,6-diméthoxy-4-allyl-phénol (Caldeira et al., 2005). Sous l'effet de la chaleur, une décarboxylation et une rupture des liaisons aryl-ether de la lignine, entraînent la formation d'aldéhydes cinnamiques comme le coniferaldéhyde ou le sinapaldéhyde. A des températures plus élevées, une rupture des doubles liaisons C=C de ces aldéhydes, peut entraîner la formation des aldéhydes benzoïques correspondants: la vanilline, à partir du coniferaldéhyde, et le syringaldéhyde, à partir du sinapaldéhyde (Desobry et Barthelemy 2006).

2.5.3.3. *Autres méthodes faisant appels à des techniques indirectes*

La couleur du bois est une autre caractéristique du traitement thermique. Le bois traité thermiquement présente une coloration brunâtre très marquée, résultant de la formation de produits de dégradation colorés. Différentes études ont été effectuées pour corrélérer la couleur du bois à sa composition chimique (Brischke et al. 2007). Les résultats obtenus en utilisant des poudres de bois de manière à homogénéiser la couleur et le système de mesure CIE $L^*a^*b^*$, montrent qu'il est possible d'obtenir une bonne corrélation entre la couleur de l'échantillon et la sévérité du traitement thermique effectué.

D'autres articles préconisent l'utilisation de techniques proche infrarouge, faisant appel à des analyses chimiométriques, pour mettre au point des méthodes de contrôle du traitement ou de la couleur (Kotilainen et al., 2000 ; Wu et al., 2005).

Enfin, une dernière méthode consiste à étudier la répartition de la taille des particules de sciure obtenue à partir d'échantillons de bois traités thermiquement ou non, et broyés dans des conditions bien définies. La répartition de la taille des particules est corrélée à la sévérité du traitement (Rapp et al., 2006).

Matériels et méthodes

3. Matériels et Méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. Matériel végétal

Tout au long de cette étude, nous avons travaillé avec deux bois de feuillus *Fagus sylvatica* et *Grevillea robusta*, et un bois de résineux *Pinus sylvestris*.

Les baguettes d'aubier de pin (*Pinus sylvestris*) et de duramen de hêtre (*Fagus sylvatica*) utilisées proviennent de billons d'arbres lorrains qui nous ont été fournis par Monsieur MOSNIER travaillant à l'ENGREF de Nancy (Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts). Les planches de duramen du chêne soyeux (*Grevillea robusta*) ont été fournies par le Docteur Francis MBURU du département des sciences du bois de l'université Moi au Kenya. Ces échantillons ont été récoltés sur des arbres de 24 ans. Ces trois essences ont été choisies pour notre étude, à cause de leurs faibles durabilités vis à vis des agents de dégradation, principalement des champignons. De plus, le pin et le hêtre sont généralement utilisés dans l'évaluation de l'efficacité de préservation de certains produits.

3.1.2. Les champignons

Différents champignons ont été utilisés : des pourritures blanches *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium*, et des pourritures brunes *Poria placenta*, *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana* et *Antrodia sp.* Toutes ces souches, ont été fournies sur boîtes de Pétri par le CIRAD (Montpellier ; France). Les souches sont régulièrement repiquées sur milieu malt-agar dans des boîtes de Pétri et maintenues à 4°C au réfrigérateur.

3.1.3. Produits chimiques utilisés

Le méthanol de qualité HPLC a été acheté chez Carlo Erba Réactifs-SDS (Val de Reuil, France). L'eau utilisée pour la préparation des éluents a été distillée, puis deionisée avec un système millipore d'eau ultra pure (Milli-Q plus, Saint Quentin-en Yvelines, France). L'acétone, l'éthanol à 95% et le dichlorométhane proviennent de la société LPCR (Schiltigheim). L'acétone est distillée sur KMnO_4 avant utilisation. L'acide trifluoroacétique (TFA) d'une pureté supérieure à 99% et la poudre d'agar pour biochimie ont été achetés chez

Acros Organics (Halluin, France), l'extraits de malt chez Sigma Aldrich SARL (Saint Quentin Fallavier, France). La catéchine de pureté 98%, l'acide sulfurique à 95% et l'hydroxyde de baryum ont été achetés chez Fluka. L'acide protocatechique, l'acide vanilique, la vanilline, l'acide syringique, le coniferaldehyde, l'acide synapique, la 2,6-diméthoxybenzoquinone, le 3,5 diméthoxybenzaldehyde nous ont été fourni par le CRITT. Bois (Epinal ; France). Les différents sucres utilisés comme standards (glucose, galactose, mannose, arabinose, xylose, et rhamnose) proviennent de Sigma Aldrich ou Lancaster.

3.2. Méthodes

3.2.1. Dégradation des éprouvettes par les champignons

3.2.1.1. Préparation des échantillons de bois

Les éprouvettes de hêtre, de pin et du chêne soyeux ont toutes été préparées de la même manière. Leurs dimensions sont de 25 x 15 x 5 mm selon les directions longitudinale, radiale et tangentielle respectivement. Elles sont par la suite poncées, numérotées et mises à sécher à 55°C durant 48 heures afin de prévenir une possible dégradation des extractibles, avant d'être pesées (m_0).

Deux fongicides (figure 31) fournis par la société Dyrup (Albi ; France) ont été utilisés dans cette étude afin de limiter ou d'inhiber la dégradation du bois par les champignons.

❖ Biocides utilisés :

Le propiconazole (1-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl]-1,2,4-triazole) est un fongicide de la famille des triazoles. Il agit préventivement et curativement sur une vaste gamme de champignons et bactéries (Petrie 1995 ; Mueller et al., 2004). Il provoque l'inhibition d'enzymes impliquées dans la synthèse des stérols comme l'ergostérol, entraînant une perturbation du fonctionnement et de la formation des membranes cellulaires des champignons.

L'IPBC (3-iodo-2-propynyl-N-butyl carbamate), est comme de nombreux carbamates, très utilisé en combinaison avec d'autres produits dans des formulations de préservation. En combinant l'IPBC au DDAC (didecyl dimethyl ammonium chloride) Xiao a ralenti voir inhibé, la germination des spores de *Ophiostoma picea* (Xiao et Kreber 1999). L'IPBC utilisé à grande échelle peut être très toxique pour les organismes aquatiques (Juergensen et al., 1999).

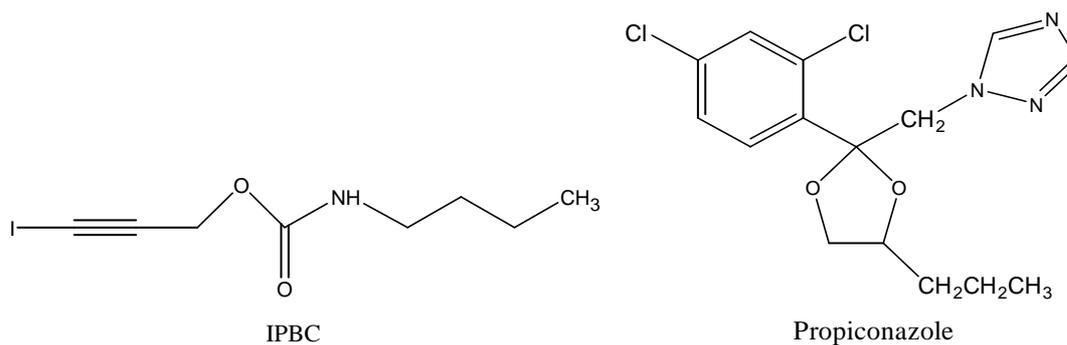


Figure 31 : Biocides utilisés durant cette étude

❖ Détermination des concentrations minimales inhibitrice (C M I) et non inhibitrice

Des solutions de 100 mL de propiconazole et d'IPBC ont été préparées à différentes concentrations ($3 \cdot 10^{-2}$, 10^{-2} , $3 \cdot 10^{-3}$, 10^{-3} , $3 \cdot 10^{-4}$ et 10^{-4} M) dans de l'éthanol 95%. Dans un premier temps, ces gammes de concentrations ont été testées afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices permettant d'inhiber la dégradation des échantillons de bois pour une essence donnée et un champignon donné. La concentration minimale inhibitrice (C M I) est validée lorsque les pertes de masses des échantillons au bout de 3 mois de dégradation sont inférieures à 3%. A des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice, la croissance du champignon peut être légèrement ralentie.

3.2.1.2. Méthode d'imprégnation

Les éprouvettes réparties par essence sont placées dans un béciers de 500 mL et recouvertes de grilles sur lesquelles sont placées des billes de verre pour les empêcher de flotter lors de l'imprégnation des différentes solutions de fongicides. Le bécier est ensuite placé dans une cloche à vide, munie d'un robinet double voie (figure 32). L'air contenu à l'intérieur des éprouvettes est alors éliminé grâce à une pompe à palette et un vide de 5 mbar maintenu à l'intérieur de la cloche pendant 20 minutes. Les solutions à différentes concentrations de propiconazole et d'IPBC sont préparées à raison de 350 mL par concentration. Avant l'imprégnation, ces solutions sont passées au bac à ultrasons durant 5 min. La connexion avec la pompe est fermée après un vide de 20 minutes et la solution de traitement est alors introduite par aspiration jusqu'à ce que les éprouvettes soient totalement recouvertes. Les éprouvettes témoins quant à elle sont imprégnées avec de l'éthanol à 95%.

Le tableau 2 décrit les différentes imprégnations réalisées en fonction des essences et des concentrations de solutions de préservation utilisées. Après retour à la pression atmosphérique, l'ensemble est laissé au repos pendant deux heures, les éprouvettes sont ensuite égouttées, laissées à l'air libre durant 24 heures.

Tableau 2 Nombre d'échantillons utilisés en fonctions des concentrations des fongicides durant 30 jours et 3 mois de dégradation

	Concentration	<i>Fagus sylvatica</i>		<i>Pinus sylvestris</i>		<i>Grevillea robusta</i>	
		30jours	3 mois	30jours	3 mois	30jours	3 mois
propiconazole	10^{-2} M	144	24	48	8	144	24
	10^{-4} M	144	24	48	8	144	24
IPBC	10^{-2} M	144	24	48	8	144	24
	3.10^{-4} M	144	24	48	8	144	24
Témoin	éthanol à 95%	144	24	48	8	144	24
Total		720	120	240	40	720	120

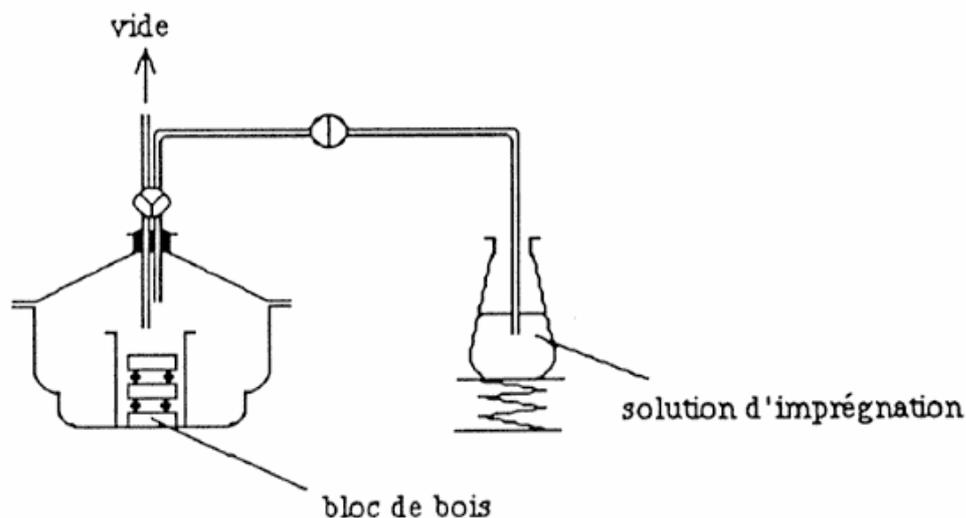


Figure 32 : Cloche à vide

3.2.1.3. Confrontation des éprouvettes aux champignons

40g de malt et 30g d'agar sont dissous dans un litre d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé par chauffage de la solution au alentour de 50°C. Le pH du mélange est ajusté à 4,8 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (0,5N). Le mélange est ensuite stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 25 minutes. Après refroidissement, le mélange stérilisé encore tiède (environ 40°C) est coulé à raison de 20 mL environ dans les boîtes de Pétri de 8,5 cm de diamètre sous une hotte à flux laminaire à proximité d'une flamme. Les boites sont ensuite laissées une heure sous la hotte de façon à laisser le milieu se solidifier.

Dans des conditions stériles (hotte à flux laminaire et à proximité d'une flamme), les boîtes de Pétri sont inoculées par un morceau de mycélium introduit au centre du milieu gélosé. Les boites de Pétri sont placées dans une enceinte climatique de marque Binder KBF 115 réglée à 22°C et 70% H R et laissé pendant une semaine de façon à permettre la colonisation de toute la surface de la boite par le mycélium.

Les différentes éprouvettes sont stérilisées par groupes de même essence après exposition durant 15 minutes par côté aux UV. Les éprouvettes stérilisées sont alors mises au contact du champignon sous conditions stériles, et les boites de Petri sont fermées avec du parafilm. Les éprouvettes de hêtre sont exposées à *Trametes versicolor*, *Gloeophyllum trabeum* et *Coniophora puteana* ; les éprouvettes de pin à *Poria placenta* et celles d'chêne soyeux à *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Antrodia sp.*. Après avoir placé les éprouvettes sur le milieu de culture, ces dernières sont laissées à incuber pendant des durées variables dans une enceinte climatique à 22°C et 70% H R (figure 33). Chaque essais est réalisé en double à raison de quatre éprouvettes par boite de Pétri. Deux séries d'essais ont été réalisées : une première série dans laquelle, les éprouvettes sont retirées tous les cinq jours pendant un mois et une deuxième série ou les éprouvettes sont laissées incuber pendant trois mois.

A la fin de la période d'incubation, les éprouvettes sont retirées des boites de Petri, débarrassées du mycélium et pesées (m_1). Les éprouvettes sont ensuite séchées à 55°C durant 48 heures puis pesées (m_2). Les pertes de masses et l'humidité des échantillons sont ensuite déterminées par les formules ci-dessous.

$$\text{Perte de masse (\%)} = [(m_0 - m_2) / m_0] \times 100$$

où m_0 est la masse initiale des échantillons séchés à 55°C et m_2 la masse des échantillons séchés à 55°C après exposition au champignons.

$$\text{Humidité (\%)} = [(m_1 - m_2) / m_2] \times 100$$

où m_1 la masse des échantillons non séchés et débarrassés du mycélium et m_2 la masse des échantillons séchés à 55°C après exposition au champignons.



Figure 33 : Enceinte climatique

Dans le cas des essais réalisés pendant trois mois et par analogie avec la norme EN 113, les différents résultats peuvent être considérés comme valides si les éprouvettes témoins présentent des pertes de masses supérieures à 20 % après confrontation aux champignons. Les éprouvettes traitées sont considérées comme résistantes à la dégradation des champignons basidiomycètes, si les pertes de masses moyennes de chaque groupe d'éprouvettes (pour une essence donnée, un champignon donné et un traitement donné) sont inférieures à 3% et si une éprouvette d'essai au maximum a subi une perte de masse supérieure à 3% mais inférieure à 5%.

3.2.2. Analyse des extractibles

3.2.2.1. Extraction

L'utilisation du soxhlet permet l'extraction de composés solubles contenus dans une matrice solide. Le solvant porté à ébullition solubilise les composés extractibles de la matrice placée dans une cartouche de cellulose. Selon le type de bois et les extraits désirés, on utilise différents solvants. Pour notre étude les sciures de pin et de hêtre seront extraites à l'acétone, tandis que celle du chêne soyeux sera extraite avec du dichlorométhane, car ce solvant permet d'obtenir une grande quantité d'extraits contenant des composés largement majoritaire. Avant d'être extraites, les éprouvettes de bois dégradées ou non par les champignons, et préalablement séchées à 55°C sont broyées à l'aide d'un vibro-broyeur à disques de façon à favoriser l'extraction des composés solubles. Trois grammes (m_e) de sciure sont alors placés dans une cartouche de cellulose pour extraction durant 6 heures.

Après extraction, le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. Les extractibles contenus dans le ballon, sont alors séchés au dessiccateur en présence de P_2O_5 jusqu'à ce que la masse du ballon (m_t) ne varie plus (environ 24 heures). Le pourcentage d'extractibles dans la sciure est déterminé par la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'extractibles (\%)} = [(m_t - m_b) / m_e] \times 100$$

ou m_t est la masse du ballon contenant les extractibles, m_b la masse du ballon vide et m_e la masse de sciure utilisée pour l'extraction.

3.2.2.2. Analyses chromatographiques

Le système HPLC utilisé au cours de cette étude est un système Waters (Waters SAS, Saint Quentin-en Yvelines, France) constitué:

- de quatre réservoirs de solvants de 1 litre chacun équipés d'un système de dégazage à l'hélium,
- d'une pompe 600 Waters munie d'un système de programmation (Contrôleur 600 Waters), permettant de travailler en mode isocratique ou en mode gradient avec plusieurs solvants différents,
- d'un four permettant de thermostatier la colonne,

- d'un système d'injection manuel avec une boucle de 20 μ L, Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative,
- d'un détecteur UV- visible à barrette de diode (Waters 2996),
- d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELSD Waters 2420),
- de différentes colonnes : Supelco Discovery C18 pour l'analyse des extractibles de faible polarité et une Supelco LC-NH₂ pour l'analyse des sucres.

Pour les analyses HPLC des extractibles, toutes les injections sont effectuées avec une seringue de 25 μ L de capacité. La séparation des composés est réalisée sur une colonne Supelco Discovery C18, de dimensions 250 x 4,6 mm i.d thermostatée à 30°C. La détection est effectuée en utilisant le détecteur UV à barrettes de diodes utilisant une gamme de détection comprise entre 210 nm et 400 nm. Les solvants utilisés pour l'élution sont l'eau et le méthanol contenant chacun 0,05% de TFA. L'élution est effectuée en mode gradient avec un débit de 1 mL.min⁻¹. Le gradient des deux solvants est donné dans les tableaux ci dessous :

Tableau 3. Composition de la phase mobile pour l'analyse des extraits de hêtre et de Pin

Temps (minutes)	Eau/TFA (0,05%)	Méthanol /TFA (0,05%)
0	100	0
5	95	5
45	70	30
60	30	70
65	0	100
70	100	0
75	100	0
80	100	0

Tableau 4. Composition de la phase mobile pour l'analyse des extraits chêne soyeux

Temps (minutes)	Eau/TFA (0,05%)	Méthanol /TFA (0,05%)
0	0	100
10	10	90
15	100	0
18	100	0
30	2	98
40	0	100
41	0	100

Lors de l'étude qualitative des extractibles, on doit tenir compte des conditions d'analyses données et que chaque substance est caractérisée par son temps de rétention. C'est pourquoi, l'injection d'un mélange de composés témoins permet l'identification des certains des constituants du mélange à analysé, par comparaison des temps de rétention et des spectres UV. Les extraits sont directement injectés après avoir été mis en solution dans du méthanol, filtrés sur un filtre Millipore Millex-HA de 0,45µm. La concentration du naphtol dans l'extrait de pin est de 10 µg/mL, alors qu'elle est de 70 µg/mL dans les extraits du chêne soyeux et du hêtre. Les concentrations injectées pour chaque type d'extrait sont les suivantes: 2 mg/mL pour le hêtre et le chêne soyeux et, 4 mg/mL pour le pin. Chaque échantillon est injecté 3 fois pour s'assurer de la reproductibilité de l'analyse.

Dans le cas des extraits du hêtre, une analyse quantitative de la catéchine à été réalisée.

La courbe de calibration de la catéchine est réalisée avec des solutions de catéchine dans du méthanol à des concentrations 10, 25, 50, 100 µg/mL.

3.2.3. Analyse des sucres simples

3.2.3.1 Traité thermiquement

Les échantillons de hêtre et de pin utilisés pour cette étude ont des dimensions 40 mm x 20 mm x 20 mm respectivement dans les directions longitudinale, radiale et tangentielle. La masse initiale (m_6) de chaque échantillon est déterminée après séchage à l'étuve pendant 24 heures à 103°C avec une balance de précision (10^{-4} g). Le traitement thermique est réalisé

sous balayage d'azote à des températures de 240°C et 250°C. Les échantillons sont pesés après traitement thermique (m_7) afin de déterminer le pourcentage de perte de masse généré par le traitement thermique (ML%), à partir de la relation ci dessous :

$$ML (\%) = [(m_6 - m_7) / m_6] \times 100$$

où m_6 est la masse initiale anhydre et m_7 la masse anhydre après traitement thermique.

Le traitement est effectué dans un four dont la précision en température est de plus ou moins 1°C (figure34).

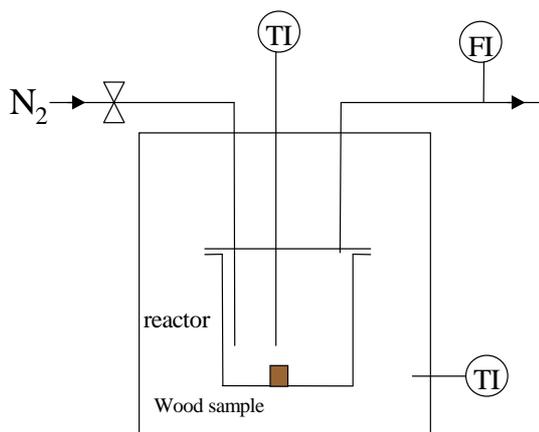


Figure 34 : Traitement thermique

Le bois est placé dans un réacteur muni d'une entrée et d'une sortie d'azote et d'un doigt de gant dans lequel est introduit un thermocouple permettant de relever la température, au niveau du bois, à l'intérieur du réacteur. Le volume du réacteur est de 450 mL et la vitesse de montée en température est constante et fixée à 20°C. mn⁻¹. Les temps de cuisson retenus pour notre étude varient de 0,5 à 30 heures.

3.2.3.2 Détermination de la composition en sucres simple

Différentes éprouvettes de bois traitées thermiquement à différentes températures, et taux de dégradation différents ont été utilisées pour déterminer la composition en sucres simples du bois. Les éprouvettes ont tout d'abord été broyées, puis les sciures obtenues placées dans des cartouches de cellulose et extraites au soxhlet durant 6 heures avec respectivement 200 mL d'un mélange toluène/éthanol (2:1, v/v), puis 200 mL d'éthanol à 95%. Après extractions, les sciures sont placées à l'étuve à 103°C durant 24 heures avant d'être hydrolysées en milieu acide selon la méthode proposée par Karr (Karr w et al., 1991) légèrement modifiée. 350 milligrammes de sciure sont placés dans un ballon, en s'assurant

que les particules de bois ne s'accrochent aux parois du ballon. 3 mL d'acide sulfurique à 72% sont ajoutés au ballon contenant la sciure et le tout maintenu sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté à température ambiante pour une pré-hydrolyse pendant 1 heure. Après cette étape de pré-hydrolyse, l'acide est dilué par ajout de 84 mL d'eau distillée. Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux à l'aide d'un bain d'huile préchauffé à 120°C pendant 4 heures. A la fin de l'hydrolyse, le ballon est retiré du bain d'huile et le mélange laissé refroidir jusqu'à une température d'environ 60°C. Le contenu du ballon encore chaud, est filtré sur Büchner permettant la séparation de la lignine insoluble de l'hydrolysate d'holocellulose. Le ballon et la lignine retenue sur le papier sont rincés avec 100 mL d'eau distillée. La lignine est par la suite séchée à l'étuve à 103°C pendant 48 heures (m_5). Le filtrat d'holocellulose est transféré dans une fiole jaugée de 250 mL et complété jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. Le pourcentage de lignine est calculé d'une manière similaire à celle décrite précédemment, et donné par la formule ci dessous:

$$\text{Taux de lignine (\%)} = (m_5 / 350) \times 100$$

Le pourcentage d'holocellulose à été déterminé de façon indirecte et calculé avec la formule :

$$\text{Taux d'holocellulose (\%)} = 100 - \text{Taux de lignine}$$

Pour les analyses des monosaccharides, 20 mL de l'hydrolysate d'holocellulose sont récupérés et neutralisés avec une solution saturée d'hydroxyde de barium, jusqu'à pH = 5 dans un ballon de 50 mL. La solution est par la suite récupérée et centrifugée durant 15 minutes à 4000 tours.min⁻¹. Le surnageant contenant les sucres est récupéré dans un ballon de 50 mL, puis l'eau est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. Les sucres accrochés aux parois du ballon sont récupérés avec 4 mL d'eau ultra pure et filtrés sur un filtre Millipore Millex- HA de 0,45 µm avant analyses. L'appareillage HPLC utilisé est composé d'un contrôleur 600 Waters, d'une pompe 600 Waters et d'un détecteur ELS Waters 2420. La colonne utilisée est une Supelco LC-NH₂ de dimensions 250 x 4,6 mm i.d thermostatée à 30°C. La phase mobile est un mélange composé d'acétonitrile, d'eau ultra pure et de méthanol aux proportions respectives de 78, 20 et 2 %. L'élution est effectuée en mode isocratique avec un débit de 1,5 mL.min⁻¹ et, les injections sont effectuées avec une seringue ayant une capacité de 25 µL. Chaque échantillon est injecté 3 fois pour s'assurer de la reproductibilité de l'analyse. Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière est réglé selon les paramètres de détection suivants : gain 1, température d'évaporation 60°C et la pression du nébuliseur est

de 50 psi. L'identification des différents sucres du mélange est obtenue en utilisant les temps de rétentions des différents standards de sucres. Les analyses quantitatives sont réalisés pour les différents monosaccharides.

Les courbes de calibration des différents monosaccharides sont réalisées avec des solutions des différents standards de sucres dans de l'eau ultra pure à des concentrations 10, 12,5, 25, 50, 75 et 100 µg/mL.

3.2.4. Fractionnement et analyse des polymères constitutifs du bois

Dans cette parti d'étude, les fractions d'holocellulose et de lignine sont exclusivement obtenues à partir du bois de hêtre. Les taux d'holocellulose et de lignine ont été déterminés en utilisant les procédures décrites par Marchetti (1998).

3.2.4.1. Détermination du taux d'holocellulose

La fraction d'holocellulose est isolée en enlevant la lignine en utilisant la méthode au chlorite de sodium acide. 500 mg de sciure de bois de hêtre débarrassées de ses extraits et séchées à 103°C sont placées dans un erlenmeyer de 100 mL contenant 30 mL d'eau distillée. L'ensemble est chauffé à 75°C, puis 0,1 mL d'acide acétique glacial et 2 mL de chlorite de sodium ajoutés chaque heure durant 7 heures. Au bout de ce temps de réaction, le mélange est filtré sur Büchner et le résidu blanc d'holocellulose resté sur le filtre est lavé avec 100 mL d'eau distillée. L'holocellulose est ensuite extraite au soxhlet durant 2 heures avec de l'éthanol à 95%, puis séché à 103°C pendant 48 heures et sa masse (m_3) déterminée. Une partie de cette fraction d'holocellulose sera traitée thermiquement, puis analysée par RMN du solide. Le taux d'holocellulose est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Taux d' holocellulose (\%)} = (m_3/500) \times 100$$

3.2.4.2. Détermination du taux de lignine de Klason

La fraction de lignine est obtenue en éliminant les polysaccharides par hydrolyse acide. 500 mg de sciure de bois de hêtre préalablement débarrassée de ses extraits et séchée à 103°C sont placées dans un ballon de 250 mL. 10 mL d'acide sulfurique à 72% sont rajoutés à la sciure et le mélange est maintenu durant 4 heures à température ambiante sous agitation

mécanique. Après les 4 heures de pré-hydrolyse, le milieu est dilué avec 240 mL d'eau distillée, puis chauffé à reflux durant 4 heures pour compléter l'hydrolyse. Après hydrolyse le mélange réactionnel est filtré sur Buchner, et le résidu noir de lignine de Klason obtenu lavé avec de l'eau distillée pour éliminer les traces d'acide. Le résidu est séché à 103°C jusqu'à masse constante pendant 48 heures (m_4). Une partie de cette fraction de lignine sera traitée thermiquement, puis analysée par RMN du solide.

Le taux de lignine de Klason est déterminée selon la formule ci dessous :

$$\text{Taux de lignine de Klason (\%)} = (m_4/500) \times 100$$

3.2.4.3. Traitement thermique des fractions d'holocellulose et de lignine

Le traitement thermique est réalisé sur de la sciure et sur une partie des fractions de lignine et d'holocellulose précédemment isolées et séchées à 103°C durant 48 heures. Les échantillons sont alors pesés (m_6) et mis dans un bécher de 50 mL qui est ensuite placé dans le réacteur du four. La température et le temps de traitement sont respectivement de 240°C et 21 heures puis. Les échantillons sont pesés après traitement thermique (m_7). L'appareillage du traitement thermique et la perte de masse générée par le traitement thermique sont décrites dans le paragraphe 3.2.3. (a).

3.2.4.4. Analyses RMN ^{13}C des fractions holocellulose et lignine

Les spectres RMN ^{13}C en phase solide CP-MAS (cross-polarisation / magic angle spinning) ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Université de Henri Poincaré sur un spectromètre Bruker MSL 300 à une fréquence de résonance 75,47 MHz. Les déplacements chimiques ont été calculés par rapport au TMS. Le temps d'acquisition était de 0,026 secondes avec un nombre de passages d'environ 1200. Tous les spectres ont été obtenus avec un temps d'attente entre deux passages de 5 secondes, un temps de polarisation croisé de une milliseconde et d'une plage spectrale de 20000 Hz. La vitesse de la rotation à l'angle magique était de 3,5 kHz. La séquence de pulse (Dixon 1982) TOSS (total suppression of side bands) a été utilisée pour supprimer les bandes de rotation, particulièrement importantes à haut champ pour ce type d'échantillon.

3.2.5. Titrage de l'acidité des échantillons

Après les différents traitements thermique (0,5 ; 1 ; 5 ; 7 et 15 heures à une température de 250°C), les échantillons de hêtre et de pin sont broyés. Un échantillon témoin de chaque essence est extrait au soxhlet à l'eau distillée durant 6 heures. Les sciures sont ensuite séchées à 103°C durant 24 heures. Le titrage est effectué en utilisant une burette automatisée à haute précision. Pour chaque titrage, 250 mg de sciure contenus dans un mélange de 25 mL d'eau distillée et 1 mL de 0,1N HCl sont neutralisées avec un volume précis de NaOH avec le phénolphtaléine comme indicateur.

L'acidité est obtenue selon l'équation suivante:

$$A \text{ (méq / g)} = (v - v_0) \times 10^{-2} / m$$

avec v comme volume de la solution de titrage (mL) de 0,01 M NaOH utilisé pour chaque échantillon, v_0 le volume (mL) de la solution de 0,01 M NaOH utilisée pour neutraliser 1 mL de 0,1 M HCl dilué dans 25 mL d'eau distillée et m la masse de sciure (g) utilisée pour le titrage.

Résultats et discussion

4. Résultats et discussion

4.1. Utilisation des extractibles comme marqueurs de la dégradation fongique

4.1.1. Définition des conditions d'analyse : élution-séparation, séchage-échantillonnage

4.1.1.1. Optimisation des conditions analytiques

La première partie de cette étude porte sur la définition précise des conditions analytiques optimales. Elle a été réalisée sur une essence connue pour sa faible durabilité, du bois de Hêtre et en particulier sur la fraction acétonique de ses extractibles, la plus importante en masse et comportant une majorité de composés phénoliques et polyphénoliques, *a priori* aisément détectables du fait de leur propriétés d'absorption du rayonnement ultraviolet. Le détecteur à barrette de diodes a permis d'enregistrer les chromatogrammes dans une gamme de 200 à 400 nm, autorisant, si besoin était, d'identifier des pics par les spectres UV. La plupart des figures présentées dans ce chapitre sont des extractions des données globales à la longueur d'onde de 280 nm, cette dernière correspondant fréquemment à un maximum d'absorption des molécules recherchées et donc à une capacité de détection optimale.

Le choix d'une phase stationnaire s'est orienté vers une colonne de type silice greffée par des chaînes aliphatiques octadécyle, cette phase inverse C18 étant la plus couramment utilisée pour séparer dans des temps et avec une résolution raisonnables, des molécules relativement polaires comme celles entrant dans la composition des extraits acétoniques.

Du fait de la diversité des structures potentiellement présentes, il était difficilement envisageable de réaliser les analyses en mode isocratique. La composition de la phase mobile et sa variation au cours du temps a donc fait l'objet d'une phase de mise au point à partir d'un gradient utilisé dans des travaux antérieurs du laboratoire, portant sur l'étude des extractibles du bois de chêne et basé sur l'utilisation de deux solvants eau et méthanol contenant chacun 0,05% d'acide trifluoroacétique. (figure 35).

Dans cette figure, la courbe superposée au chromatogramme indique le pourcentage d'eau dans la composition de la phase mobile, inversement proportionnel à sa force d'élution. La séparation n'étant pas satisfaisante, le gradient a été modifié en augmentant plus rapidement le pourcentage de méthanol et de manière constante durant les 45 premières minutes (figure 36).

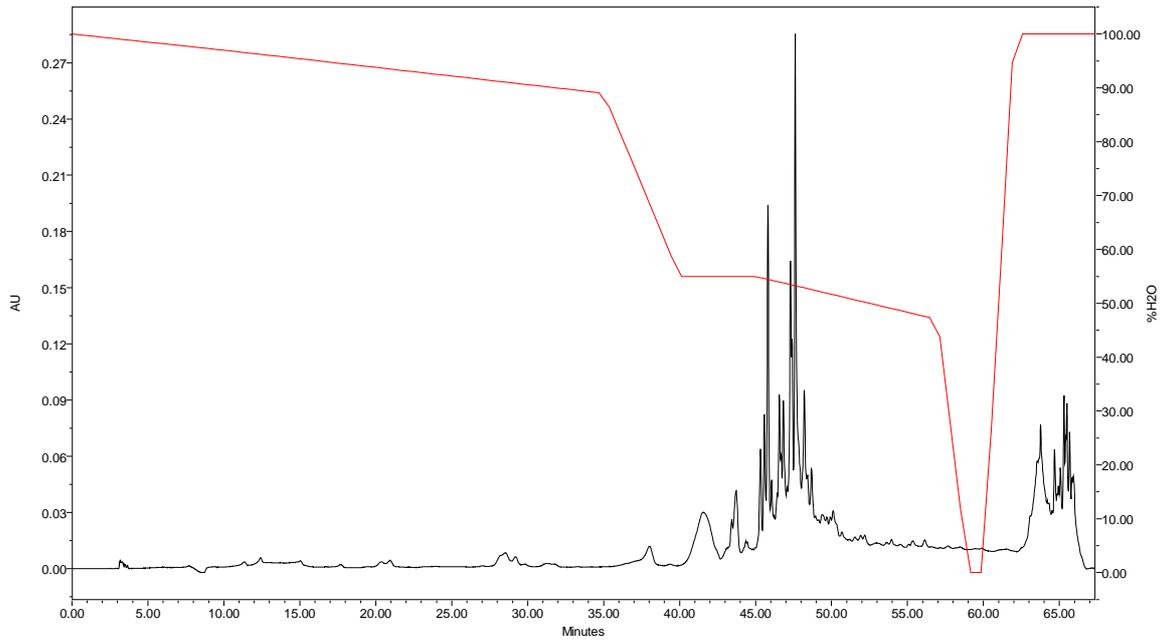


Figure 35: Superposition du chromatogramme et du gradient initialement utilisé pour la séparation des extraits acétoniques de hêtre

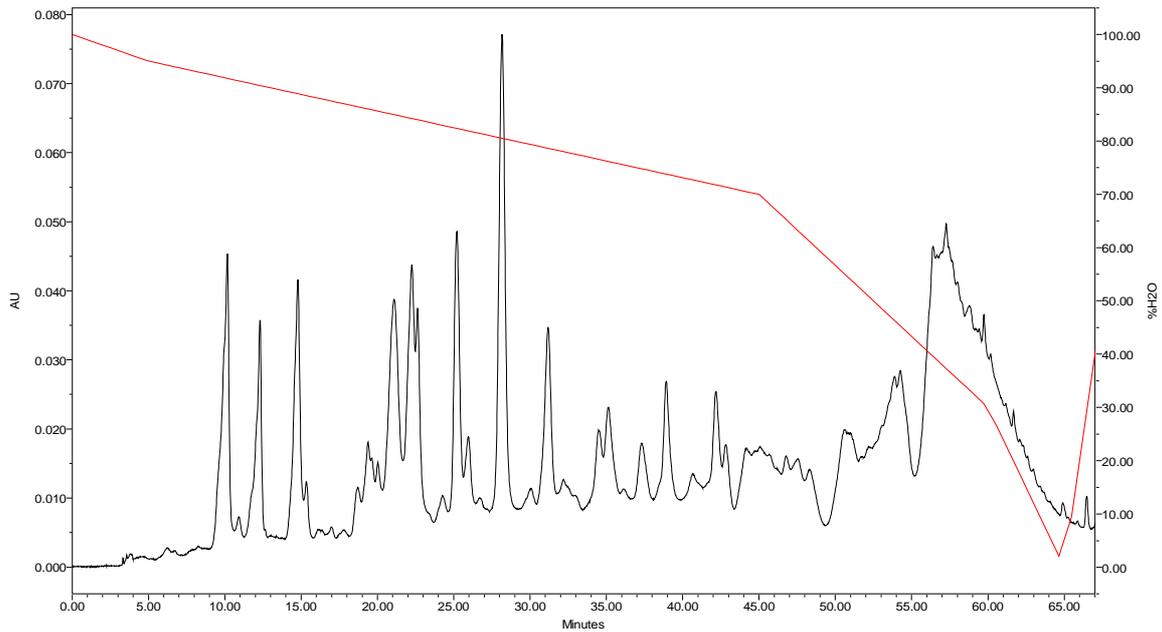


Figure 36: Chromatogramme des extraits acétoniques réalisé avec un gradient optimisé

La séparation des constituants de la fraction acétonique d'extractibles paraissant cette fois satisfaisante, ce gradient a été définitivement adopté pour la suite de l'étude. L'identification d'une majorité des pics principaux a donc pu être réalisée par comparaison avec des produits témoins (figure 37).

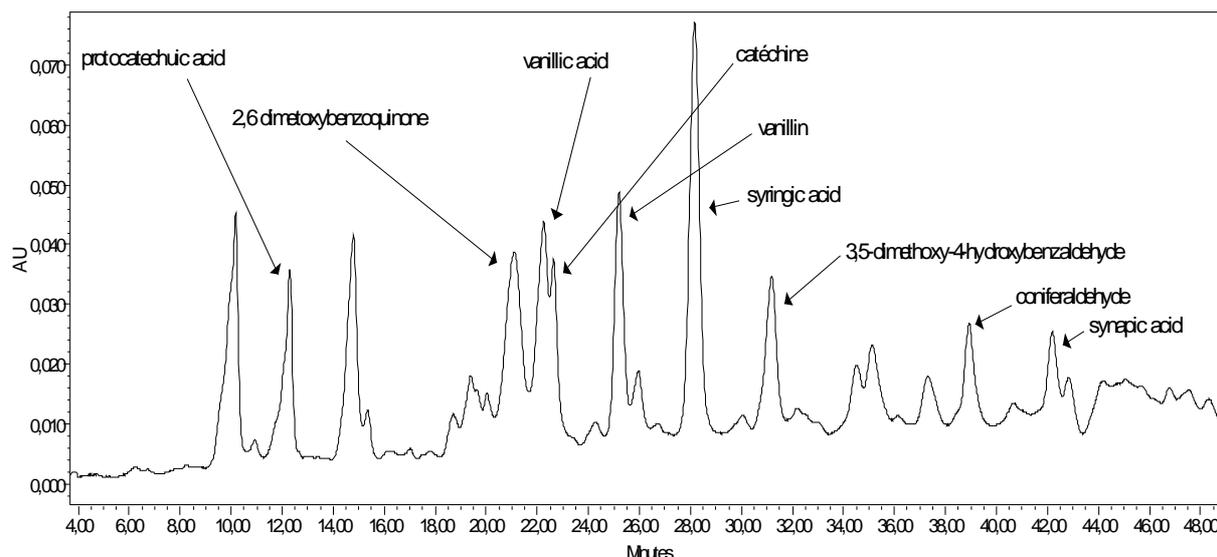


Figure 37: Identification des extractibles acétonique du bois de hêtre séché à 103°C

Bon nombre de ces composés, sont des produits d'oxydation de la lignine ou de composés pré existant comme la catéchine (Mammela 2001 ; Filley et al. 2002 ; Arunachalam et al., 2003 ; Kawai et al., 2004 ; Higushi T 2004) (figure 38). Les composés identifiés du chromatogramme A, représentent approximativement entre 40% et 50% des extractibles total de l'échantillon. Le reste des extraits acétoniques sort à des temps au delà de la zone étudiée du chromatogramme. Ces extraits sont probablement constitués d'autres composés polaires et de nombreux composés apolaires comme de nombreux acides gras (Mammela 2001 ; Zule et al., 2003).

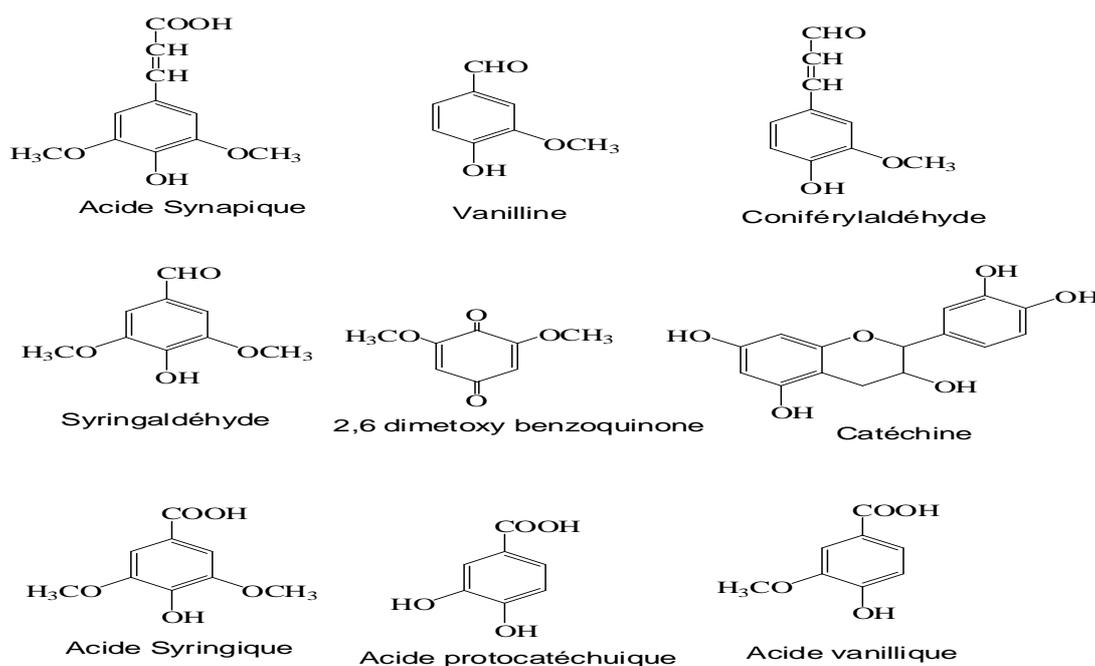


Figure 38: Différents composés identifiés

4.1.1.2. Etude de l'influence de la température de séchage sur la distribution et la nature des extractibles

Dans un deuxième temps, la température de séchage des éprouvettes a été étudiée pour deux raisons :

- il est généralement admis que les températures choisies pour le séchage du bois sont cruciales pour l'analyse et à la caractérisation des extractibles du bois car elles sont à l'origine de la dégradation thermique de certains extractibles ou de l'oxydation éventuelle de certaines structures sensibles. La comparaison entre les chromatogrammes des extractibles obtenus après séchage du bois à 103 °C durant 24 heures (figure 37) et sans séchage (figure 39) illustre clairement ce phénomène.

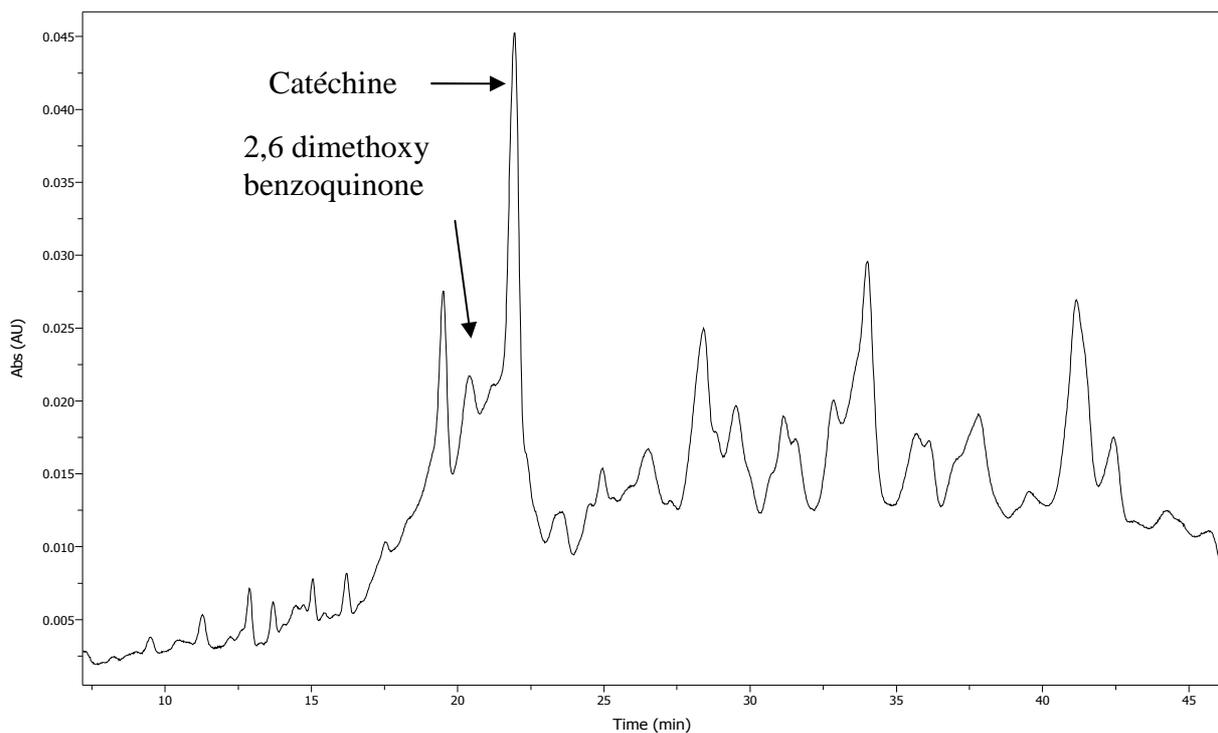


Figure 39: Chromatogramme des extractibles acétonique du bois de hêtre non séché

Concernant la 2,6-diméthoxybenzoquinone et la catéchine, deux produits identifiés dans les deux chromatogrammes figure 37 et figure 39, les quantités mesurées sont fortement différentes. La catéchine dans l'échantillon non séché, représente près de 30% des extraits totaux de la zone étudiée. Tandis que la 2,6-diméthoxybenzoquinone représente près de 10% des extraits de cette zone. Dans les échantillons séchés à 103°C, la catéchine est fortement

dégradée et ne représente plus que 8% et la 2,6-dimethoxybenzoquinone augmente à 15% des extraits de la zone étudiée. De plus, dans cet échantillon il y a de nouveaux composés apparus comme la vanilline et l'acide syringique qui représentent à eux deux, près de 30% des extraits de la zone étudiée.

De plus, le sommet de la catéchine est en partie caché dans le premier cas (séché à 103°C) en raison de la présence d'autres produits formés avec des temps de rétentions semblables pouvant fausser les dosages. Ces résultats montrent clairement l'influence des conditions de séchage sur les caractéristiques et la nature des composés présents dans des extraits de bois séché. Il apparaît qu'une température de séchage de 103°C modifie énormément la composition des extractibles du bois de hêtre, l'identification d'un grand nombre de composés nouveaux portant des fonctions carbonylés ou acides carboxyliques semblant indiquer des réactions d'oxydations intervenant lors du séchage réalisé en atmosphère normale.

- la phase de séchage est cependant obligatoire car elle seule permet d'obtenir une masse anhydre des échantillons sous forme de sciure ou de bloc et donc une masse reproductible puisque indépendante de l'hygrométrie de l'atmosphère. Cette masse et son évolution constitue bien souvent le seul paramètre mesurable pour caractériser les phénomènes de protection ou au contraire la faible durabilité du matériau. De plus, une température de séchage élevée de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ est très généralement imposée par les normes régissant les conditions de test sur le bois.

Ces deux constatations contradictoires nous ont conduit à définir les conditions de séchages les plus douces possibles afin de garantir une mesure de masse reproductible, tout en évitant au maximum la modification de la nature et des quantités d'extractibles, ces modifications étant caractérisées par la différence de masse et la différence d'aspect des chromatogrammes.

Il s'avérait donc nécessaire de rechercher la température optimale et le temps de séchage idéal, afin de réunir les conditions simultanées pour atteindre un niveau de déshydratation convenable pour l'analyse des pertes de masses, sans dégrader les extraits.

Ainsi, les températures suivantes ont été testées : 30, 55 et 80 °C avec des masses d'échantillons prises périodiquement pour évaluer le niveau de séchage et une analyse chromatographique pour confirmer la conservation des extractibles d'origine.

Cette étude nous a conduit à sélectionner une température de 55°C et un temps de séchage de 48 heures. En effet, ces conditions nous permettent d'atteindre le seuil de déshydratation proche de celui observé avec une température de 103°C (figure 40).

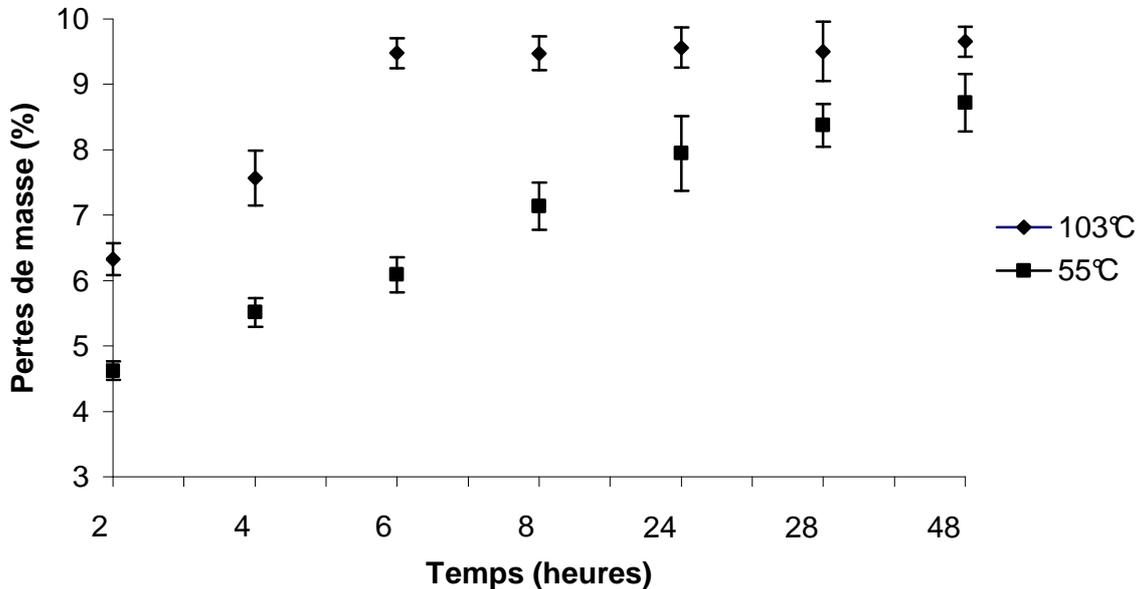


Figure 40 : Pertes de masses en fonction des temps et températures de séchage des échantillons.

Les pertes de masses des éprouvettes séchées à 103°C atteignent leurs valeurs seuil au bout de 6 heures de séchage, tandis que celles séchées à 55°C se rapproche de cette valeur au bout de 48 heures de séchage. Ce temps de séchage est d'ailleurs utilisé par Blanchette (1994) pour des échantillons séchés à 60°C alors que d'autres se contentent de 12 heures à 60 °C (Martínez M et al., 1999). Une autre remarque importante réside dans la constatation que les conditions de séchage préconisées par la norme EN 113 sont très dures pour les petites éprouvettes et les faibles quantités de sciures souvent utilisées au laboratoire.

La validité de ces nouvelles conditions est démontrée par l'analyse chromatographique (figure 41) :

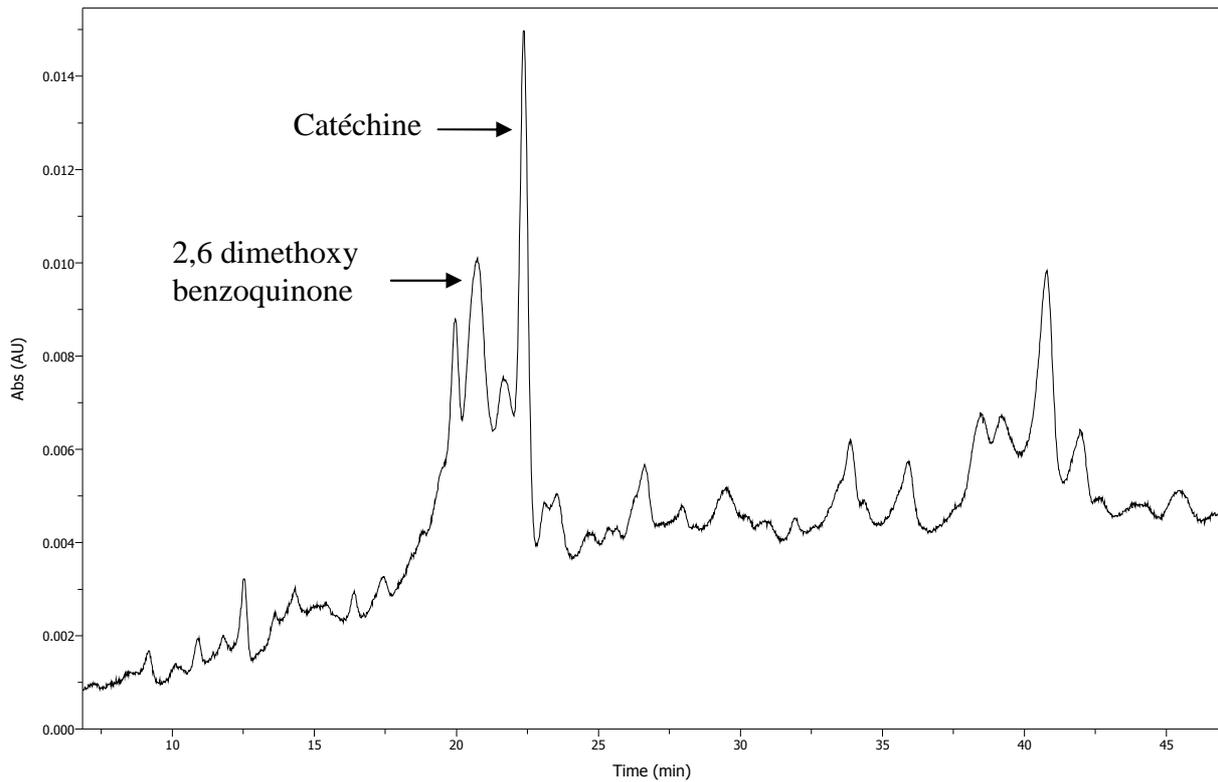


Figure 41 : Chromatogramme des extractibles acétonique du bois de hêtre à 280nm et séché à 55°C durant 48 heures.

Bien que le profil chromatographique du bois séché à 55°C ne soit pas parfaitement identique avec le chromatogramme du hêtre non séché qui sert de référence, le chromatogramme des extraits soumis à ces conditions de séchage doux, présente un profil semblable dans la zone de temps étudiée. Cela signifie que ces nouvelles conditions de séchage, n'ont pas affecté les caractéristiques des extractibles. Le pic de la catéchine semble être peu altéré par le séchage à température douce et reste un des composés les plus importants en termes de quantité dans le bois de hêtre, permettant ainsi une réponse relativement intense avec une détection UV.

Afin de définitivement valider les nouvelles conditions de séchage et l'effet possible de la modification des extractibles sur la durabilité du bois, des expériences ont été menées afin de comparer les pertes de masses des blocs de hêtre dégradés par *T. versicolor* avec des conditions de séchage avant et après dégradation de 55°C durant 48 heures, 103°C durant 24 heures et non séché (figure 42). La comparaison de ces trois courbes montre que les pertes de masses des différents blocs sont très semblables durant le temps de dégradation, surtout pour des temps de dégradation inférieur à 20 jours. Au delà, les blocs séchés à 55°C possèdent des pertes de masses plus proches de celles séchés à 103°C. La totalité des expériences qui vont suivre, se feront à des séchages de 48 heures à 55°C.

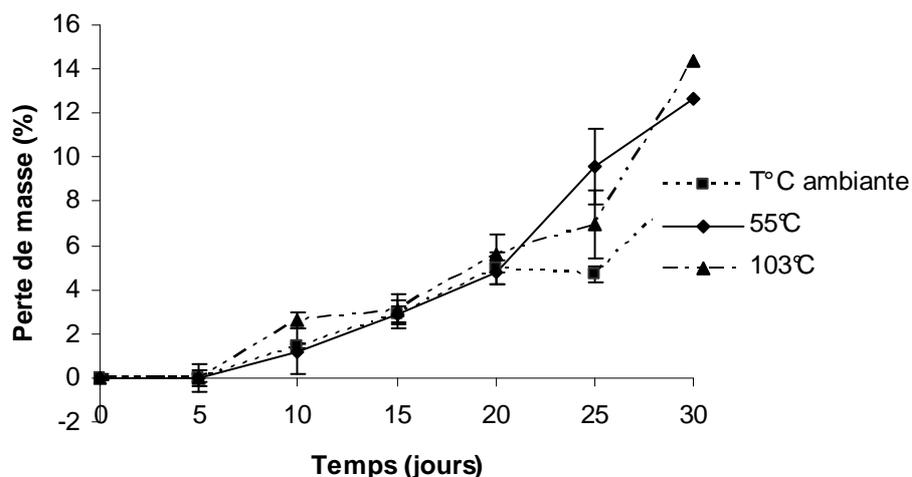


Figure 42 : Influence des températures de séchage des blocs sur la durabilité du hêtre dégradé par *Trametes versicolor*

Les analyses chromatographiques réalisées sur du bois séché à 55 °C, ont montré que la catéchine était le composé le plus facilement détectable et donc celui dont le dosage devrait être le plus significatif.

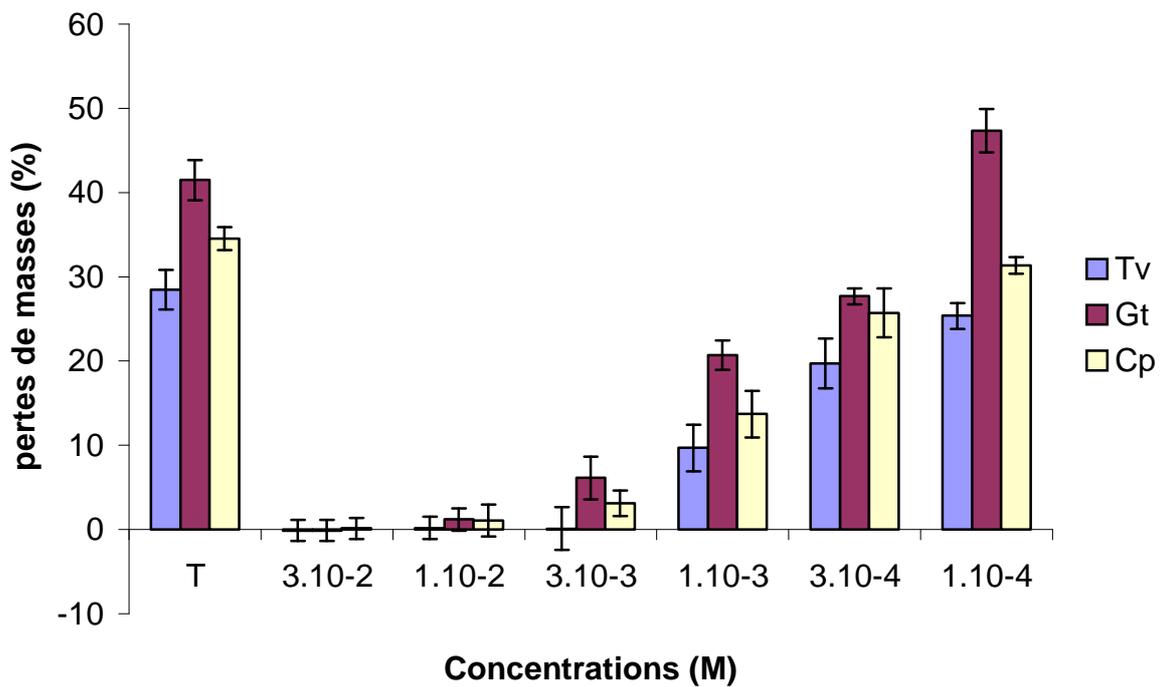
4.1.2. Détermination des conditions d'inhibition de la dégradation fongique.

Afin de corréliser la dégradation fongique et le dosage de marqueurs potentiels de celle-ci, il était nécessaire d'analyser les extractibles obtenus à partir d'éprouvettes dégradées ou non par les champignons de pourriture. Pour comparer des chromatogrammes obtenus dans des conditions les plus proches possibles, des séries d'éprouvettes imprégnées de doses inhibitrices ou non de fongicides ont été soumises à l'action des mycéliums. Deux molécules couramment employées dans le domaine de la préservation du bois ont été utilisées. Le propiconazole qui est un fongicide systémique de la classe des triazoles rentrant dans la catégorie des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïdes et l'IPBC, un composé de la famille des carbamates dont le mode d'action est associé à la toxicité de l'iode.

Des gammes de concentrations de chaque produit pour chaque essence et pour chaque champignon, ont été évaluées afin de déterminer des concentrations les plus basses inhibant ou non la croissance de chaque type de champignon sur chaque type de bois avec des critères de sélection des concentrations d'inhibitions prévues par la norme EN113. D'après cette norme, l'efficacité des produits de préservation par rapport à la virulence d'un champignon

agent de la pourriture blanche ou brune se fait en utilisant préférentiellement le hêtre et l'aubier de pin sylvestre. Le choix des concentrations et l'efficacité d'inhibition fongique d'un produit est déterminée par le pourcentage de pertes de masse obtenue au bout du temps d'exposition des échantillons au champignon : les pertes de masses des échantillons traités par un produit de préservation durant les 16 semaines d'exposition au champignon, doivent être $\leq 3\%$ pour que cette concentration soit considérée comme efficace.

(a)



(b)

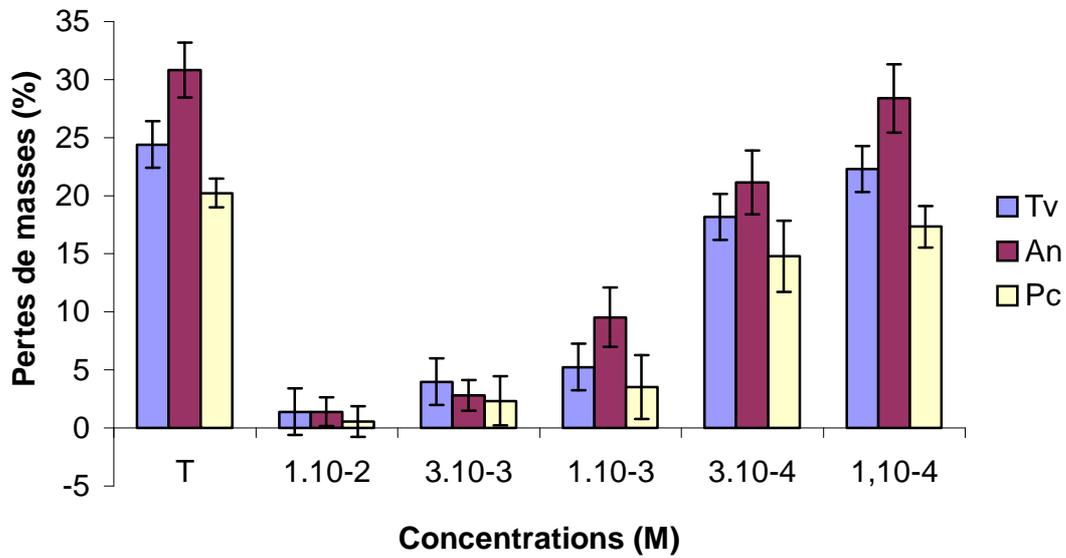
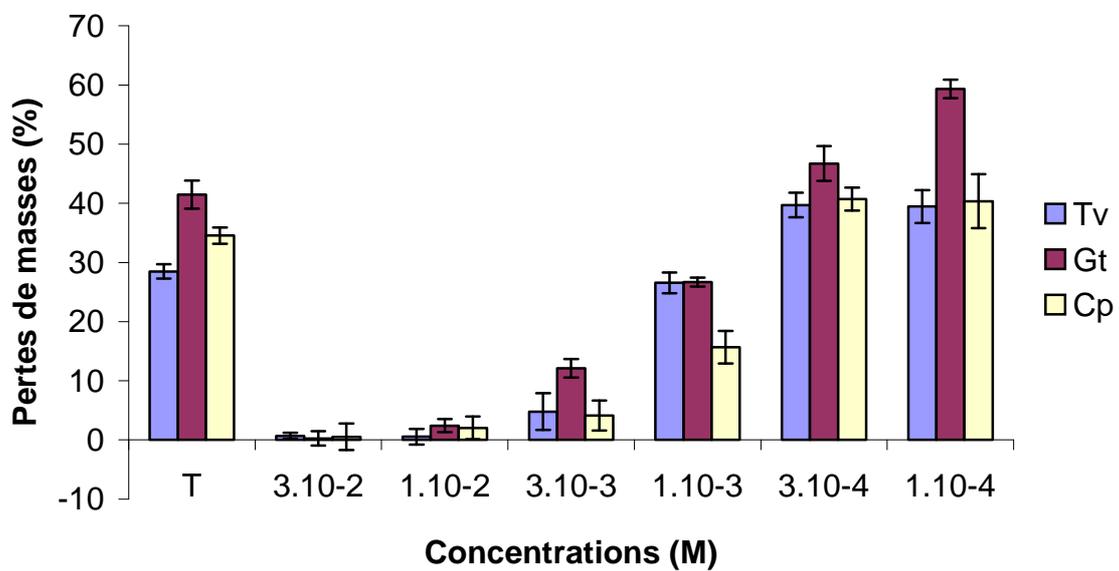


Figure 43 : Pertes de masse en fonction des concentrations en propiconazole des échantillons de hêtre (a) et du chêne soyeux(b) exposés à des champignons de pourriture

(a)



(b)

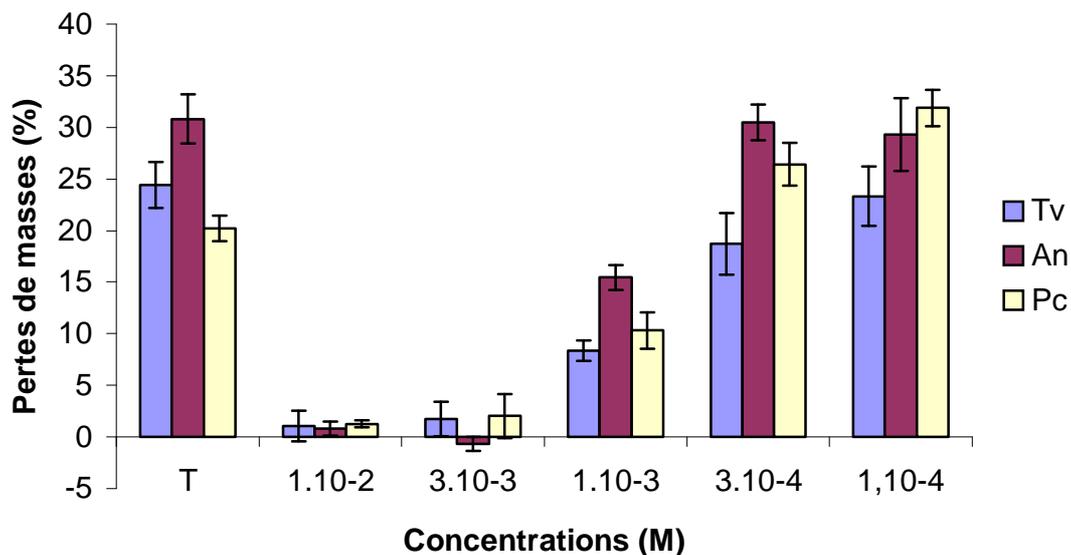


Figure 44 : Pertes de masse en fonction des concentrations en IPBC des échantillons de hêtre (a) et du chêne soyeux(b) exposés à des champignons de pourriture

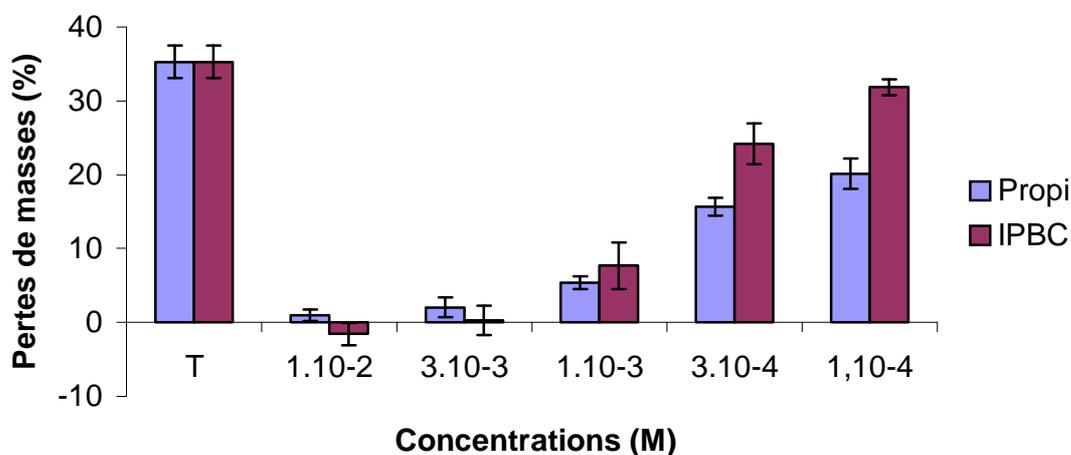


Figure 45 : Pertes de masse en fonction des concentrations en propiconazole et IPBC des échantillons de pin exposés à *Poria placenta*

La concentration choisie pour être la condition inhibitrice est de 10^{-2} M quelle que soient les fongicides et les champignons utilisés (figures 43-45). Les concentrations non inhibitrices ont été fixées à 3.10^{-4} M pour l'IPBC et 10^{-4} M pour le propiconazole, sauf dans le cas du pin pour lequel cette concentration est de 10^{-4} M quelque soit le fongicide. Un fait est à

remarquer : les différents champignons de pourriture blanche et brune, bien que n'ayant pas forcément les mêmes mécanismes enzymatiques de dégradation, arrivent tous à utiliser l'IPBC à des une concentration de 3.10^{-4} M comme activateur ou source de carbone et d'azote pour leur croissance. Il est difficile d'expliquer ce phénomène car bien que la dégradation de l'IPBC par certains microorganismes surtout les bactéries ait fait l'objet d'études (Steven Cook 2002), son mécanisme de dégradation chez les mycètes reste mal connu. Pour ce qui est du propiconazole, étant un fongicide systémique à large spectre d'activité et utilisé en général sous formes de co-formulation, sa dégradation par les microorganismes reste très peu étudiée.

4.1.3. Dégradation des extractibles du bois de hêtre par *Trametes versicolor*

4.1.3.1. Dégradation des extraits et évolution des pertes de masse

Cinq séries de blocs de hêtre ont été exposées à *Trametes versicolor* pour une durée de dégradation au maximum de 30 jours. Ces blocs ont été préparés différemment en fonction de la solution de produits de préservation dans laquelle ils ont été imprégnés sous vide : solution éthanolique de propiconazole (10^{-2} M et 10^{-4} M) ou d' IPBC (10^{-2} M et 3.10^{-4} M), les éprouvettes témoins étant imprégnées dans de l'éthanol uniquement. L'objectif était que les extractibles des échantillons témoins ou imprégnés avec des solutions à faibles concentrations soit modifiés lors de la dégradation fongique, contrairement à ceux des échantillons à fortes concentrations qui devaient rester inchangés. L'évolution du contenu des extractibles et leurs natures ont été analysées tout les 5 jours pour toutes les séries de blocs et l'humidité est mesurée sur les séries de blocs du dernier jour.

Préalablement à toute analyse des résultats, l'humidité des échantillons, après 30 jours d'exposition au champignon, a été mesurée afin de vérifier que les différentes conditions de traitement n'influençaient pas l'activité fongique indirectement par une modification importante du taux d'humidité qui serait préjudiciable au développement du champignon (tableau 5). En effet de nombreuses études ont montrés l'importance de l'humidité durant la dégradation du bois par les champignons de pourriture. Les exigences d'humidité dépendent considérablement des espèces de champignon.

Tableau 5 : Mesure des taux d'humidités du hêtre après dégradation par *T. versicolor*

	Témoins	Propi 10^{-2} M	Propi 10^{-4} M	IPBC 10^{-2} M	IPBC 3.10^{-4} M
Humidité finale (%)	62,3 ±1,2	41,5 ±2,3	55,6 ±1,4	45,3 ±1,8	58,4 ±2,3

Les échantillons témoins présentent une humidité de 62,3 %. Les échantillons traités au propiconazole présentent une humidité de quelques pourcents plus faible que celle des éprouvettes protégées par l'IPBC, avec une fourchette globale s'étalant de 41,5 à 58,4 % et se situant donc dans la gamme idéale. La valeur basse est proche de la limite inférieure définie pour une activité optimale de la colonie mais elle reste acceptable. On constate également que les taux d'humidité des éprouvettes les moins protégées (concentrations en fongicide les plus faibles) sont systématiquement de 13 à 14 % plus élevés que ceux des échantillons les mieux protégés. La quantité totale d'extractibles du bois de hêtre est en générale inférieure à 2 % de la masse de bois sèche (Fengel et Wegener 1989 ; Pettersen 1984) dans notre cas elle est de 1,6 %. Les quantités d'extraits acétoniques du bois de hêtre sont réduites durant les 30 jours de dégradation du bois par *T. versicolor* pour les échantillons témoins ou ceux traités avec de faibles concentrations de fongicides (figure 46).

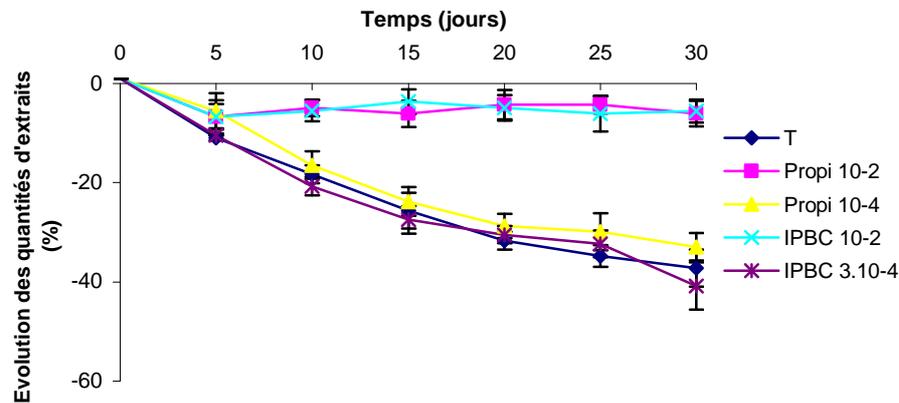


Figure 46 : Taux de dégradation des extraits acétoniques totaux du bois de hêtre en présence ou pas de produit de préservation par *T. versicolor* durant 30 jours

Les quantités d'extraits des échantillons traités avec des concentrations de 10^{-2} M varient peu, quelque soit le produit utilisé, la perte de 5% pouvant probablement s'expliquer par la diffusion des extractibles dans le milieu gélosé. Pour les échantillons non protégés (concentrations en fongicide faibles ou les témoins) les quantités d'extraits sont proches et diminuent rapidement durant les deux ou trois premières semaines, temps après lequel un palier semble être atteint.

A ce stade de l'étude, il apparaît que la quantification des extraits acétoniques globaux peut permettre de discerner quelle série d'échantillons va être dégradée de celle qui ne le sera pas, cette prévision pouvant être effectuée après environ 10 jours de temps d'expérience.

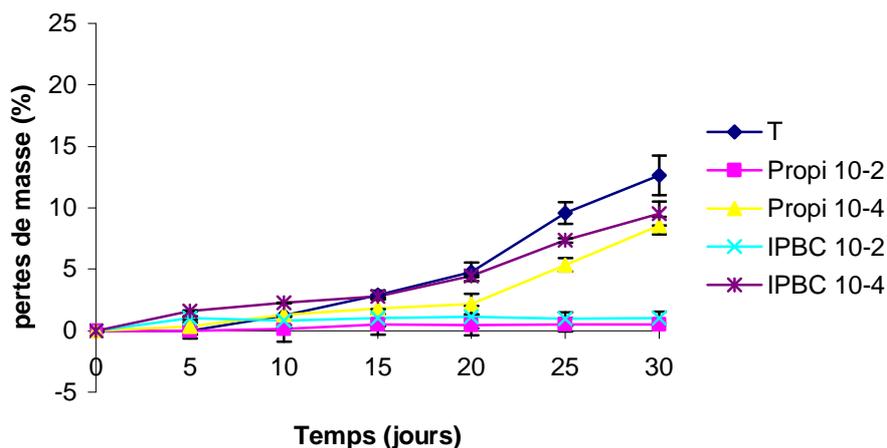


Figure 47 : Evolution des pertes de masses des éprouvettes de hêtre traité ou pas durant la dégradation par *T. versicolor*.

Il est intéressant de comparer ces courbes avec celles décrivant l'évolution des pertes de masse des éprouvettes de bois (figure 47) car elles ne montrent une évolution sensible qu'après 15 voire 20 jours d'expérience pour des valeurs de pertes de masses allant de 3 à 5 %, la dégradation des extraits acétoniques étant à ce moment là de l'ordre de 25 à 30 %, ce qui en fait un paramètre dont l'évolution est beaucoup plus facile à mesurer.

Cela permet également de constater que la dégradation des macromolécules constituant le bois s'initie très rapidement, le champignons ne se contentant pas de consommer les extractibles, pourtant *a priori* plus accessibles.

Nous avons ensuite cherché à savoir s'il était possible de mettre en évidence une ou plusieurs molécules entrant dans la composition des extractibles acétoniques et dont la dégradation par le champignon serait encore plus rapide et aisément détectable que les extraits dans leur globalité.

4.1.3.2. Chromatogrammes des extractibles du bois de hêtre dégradé par *Trametes versicolor*

Afin de suivre l'évolution des différents composés des extraits acétoniques du hêtre identifié précédemment durant la dégradation fongique, nous avons analysé ces extraits par HPLC tous les cinq jours. La fraction lipophile sortant à des temps plus élevés et ne présentant des composés suffisamment caractéristiques, nous nous sommes uniquement intéressés à une gamme plus polaire des extraits acétoniques, détectée entre 10 et 45 minutes (figure 48).

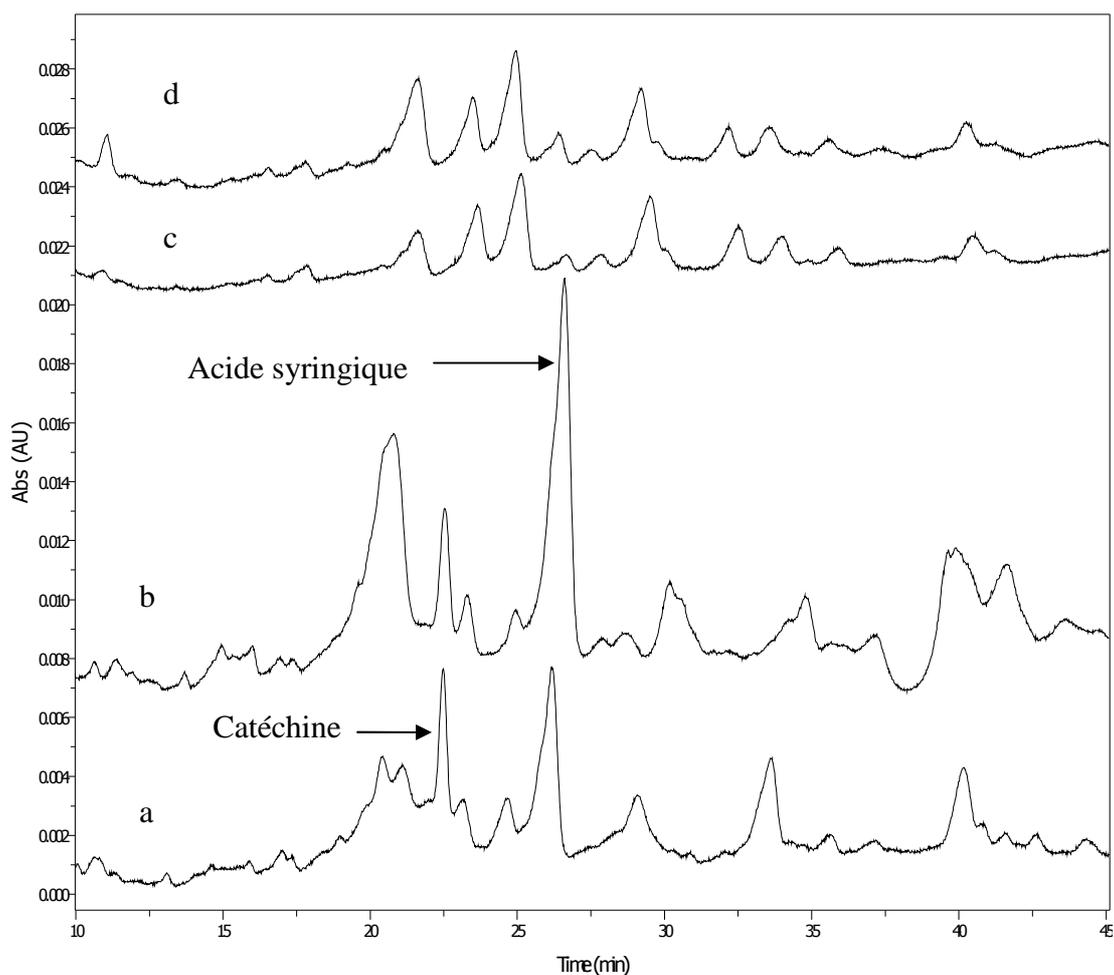


Figure 48: Chromatogrammes des extractibles du bois de hêtre non protégé dégradé par *T. versicolor* après 5(a), 10(b), 15(c) et 30(d) jours

Dans le cas des extraits des échantillons témoins, les chromatogrammes montrent une évolution importante de la distribution des signaux, avec des pics disparaissant et d'autres apparaissant. Cependant, il n'a pas été possible d'identifier toutes les structures produites au cours de la dégradation. A la rigueur, l'acide syringique, en tant que produit d'oxydation de la lignine, voit la taille de son pic augmenter puis diminuer et disparaître (Figure 48 et 49) et pourrait jouer le rôle d'un marqueur de dégradation.

En revanche, il a été possible de suivre la disparition d'espèces chimiques préalablement identifiées dans des extraits de bois non dégradés et ne provenant pas de la lignine, en particulier celle de la catéchine qui est totale après 15 jours. Deux séries d'analyses réalisées tous les 5 jours sur des éprouvettes imprégnées par le propiconazole et l'IPBC ont donné lieu à des chromatogrammes quasiment identiques pour les deux fongicides. C'est pourquoi, seuls

ceux obtenus à cinq, dix, quinze et trente jours avec le propiconazole illustreront cette partie de l'étude.

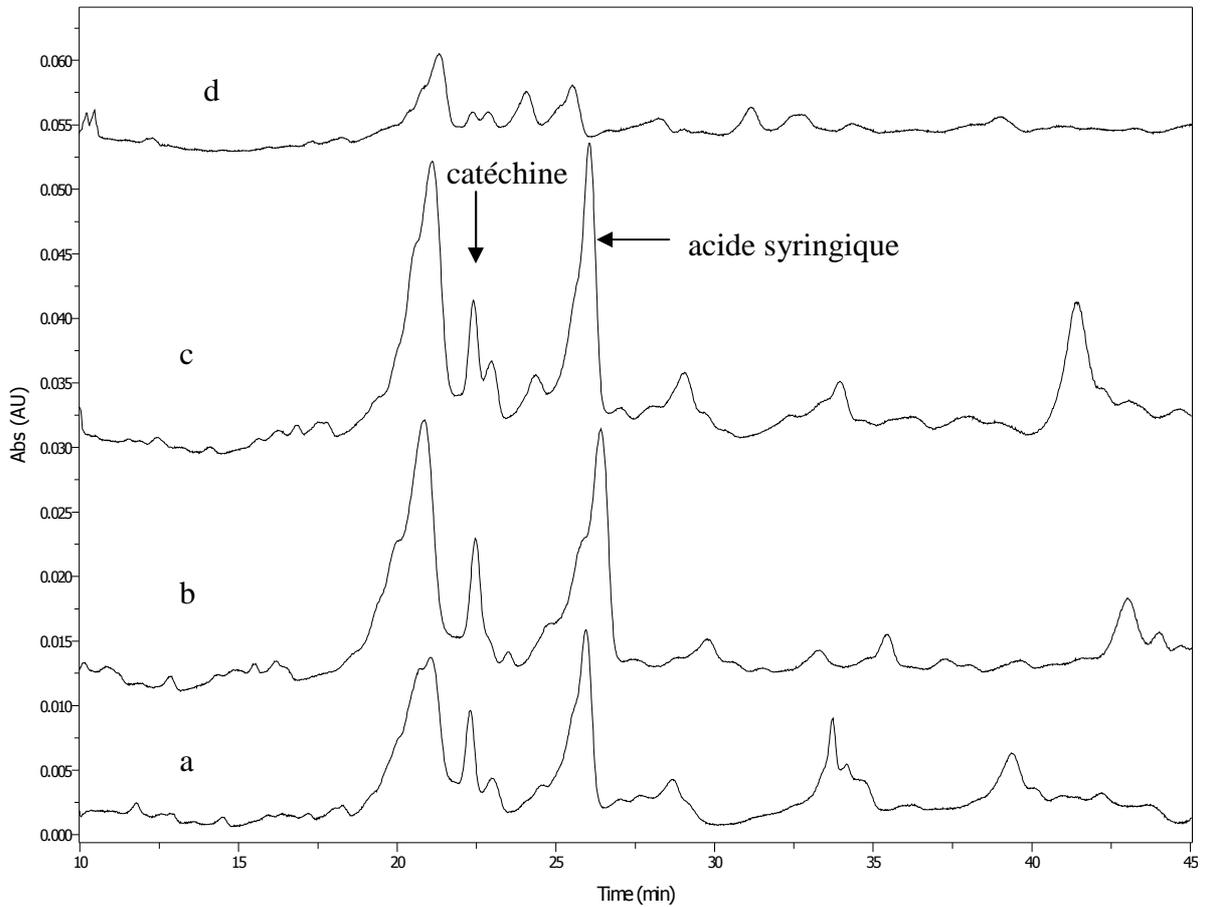


Figure 49: Chromatogrammes des extractibles du bois de hêtre protégé avec le propiconazole 10^{-4} M par *T. versicolor* après 5(a), 10(b), 15(c) et 30(d) jours

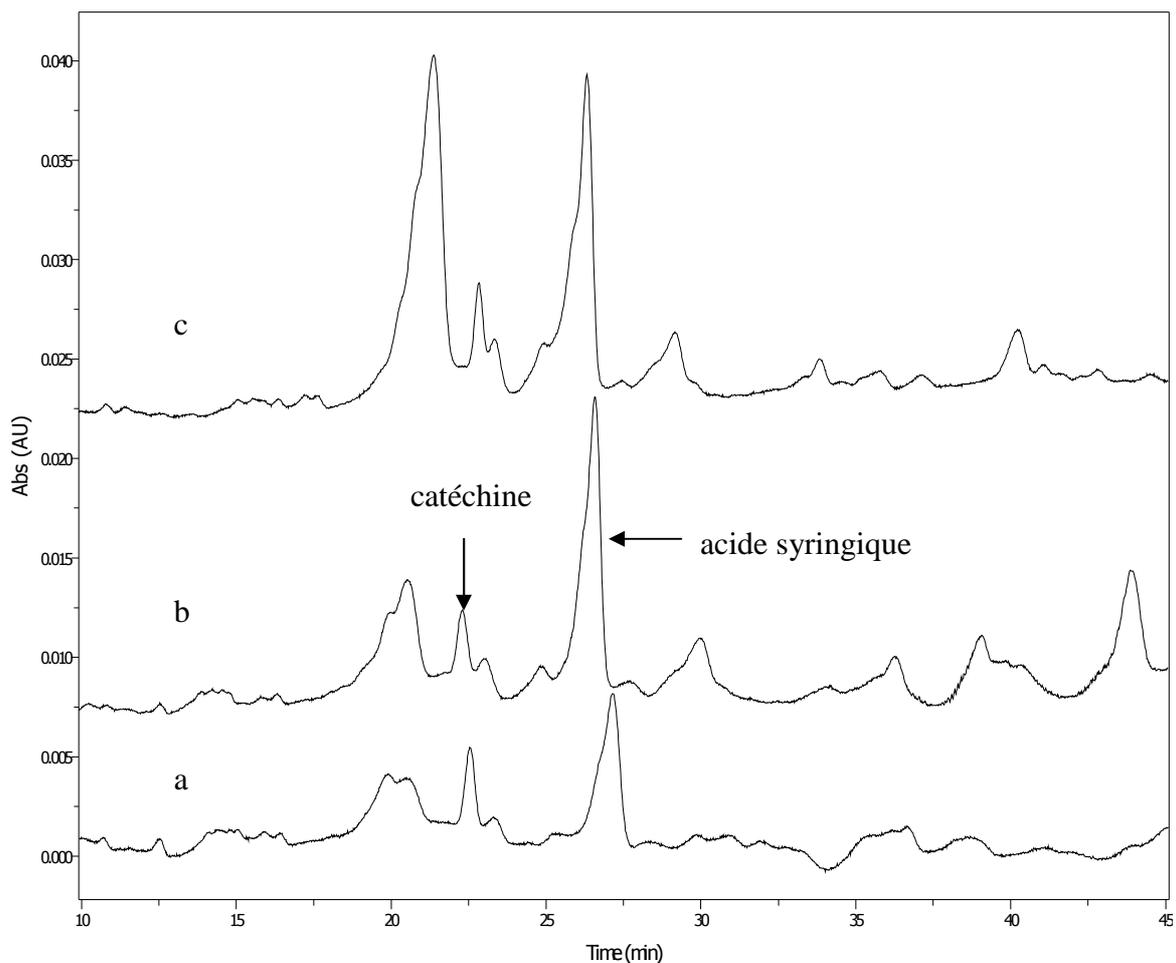


Figure 50: Chromatogrammes des extractibles du bois de hêtre protégé avec le propiconazole 10^{-2} M par *Trametes versicolor* durant après 5(a), 15(b) et 30(c) jours

Une interprétation directe des différents chromatogrammes reste difficile en raison de la différence entre le profil chromatographique de chaque analyse, la présence ou non de nouveaux composés en quantités importantes pouvant en outre, parfois modifier le temps de rétention des composés. Dans ce cas, l'utilisation du détecteur UV à barrette de diode a été décisive car elle a permis, à l'aide du spectre UV correspondant à chaque pic, de suivre le marqueur choisi. Ainsi, pour les échantillons traités par la solution de propiconazole 10^{-2} M, la quantification du signal de la catéchine donne une valeur d'adsorption assez constante autour de $5 \cdot 10^{-3}$ AU en dépit d'un léger décalage de son temps de rétention, et de l'apparition d'un gros pic resté mal identifié car regroupant différents composés dont la 2,6 diméthoxybenzoquinone. Comme dans le cas des échantillons témoins, le pic de la catéchine diminue pour les extraits des échantillons traités avec du propiconazole à 10^{-4} M. Mais cette diminution de la catéchine est moins flagrante et même au bout de 30 jours d'exposition, elle est encore faiblement détectable.

Après 30 jours d'exposition au champignon, les différents composés formés présentent des propriétés d'absorptions différentes, au regard des zones dans lesquelles ces composés absorbent (Figures 51 et 52). Ainsi certains composés formés en présence du propiconazole absorbent nettement dans des zones allant de 300 nm à 350 nm, ce qui n'est pas le cas pour ceux formés dans les échantillons témoins au bout de 30 jours. Cela pourrait indiquer que, en dépit d'un début d'oxydation des extractibles par le champignon, celui-ci s'est révélé incapable de les métaboliser.

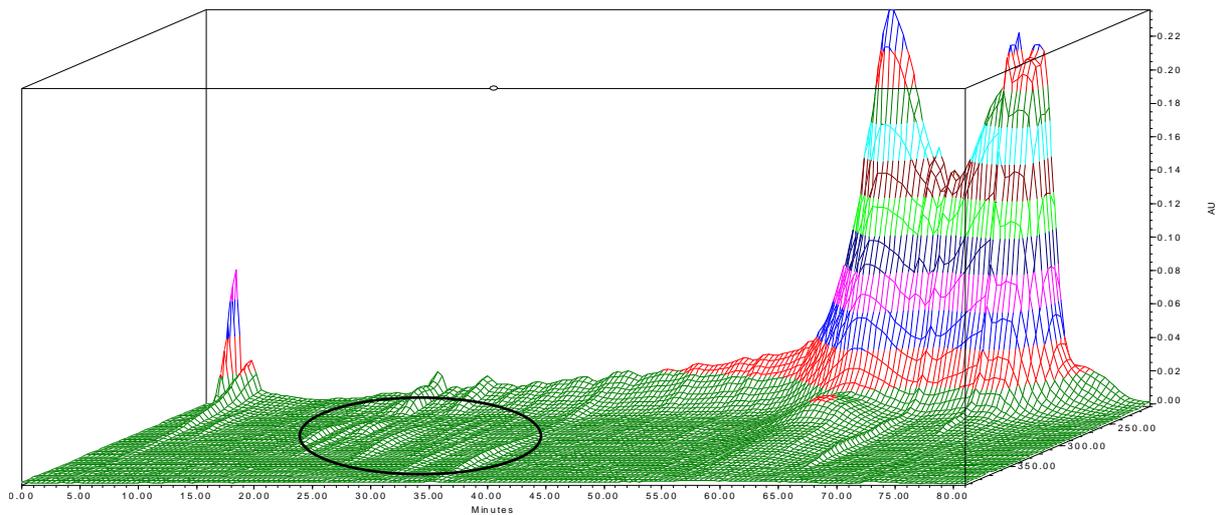


Figure 51 : Zones d'absorbance des composés de hêtre témoin après 30 jours de dégradation

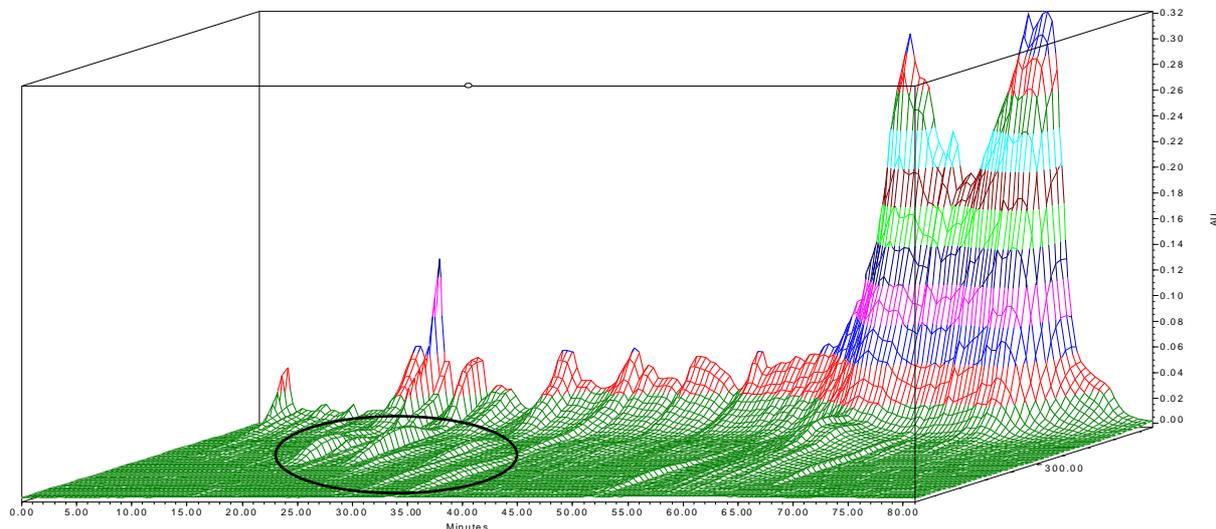


Figure 52 : Zones d'absorbance des composés de hêtre protégé après 30 jours de dégradation

Les dosages de la catéchine pour les 5 séries d'échantillons sont exprimés dans les courbes ci-dessous (figure 53).

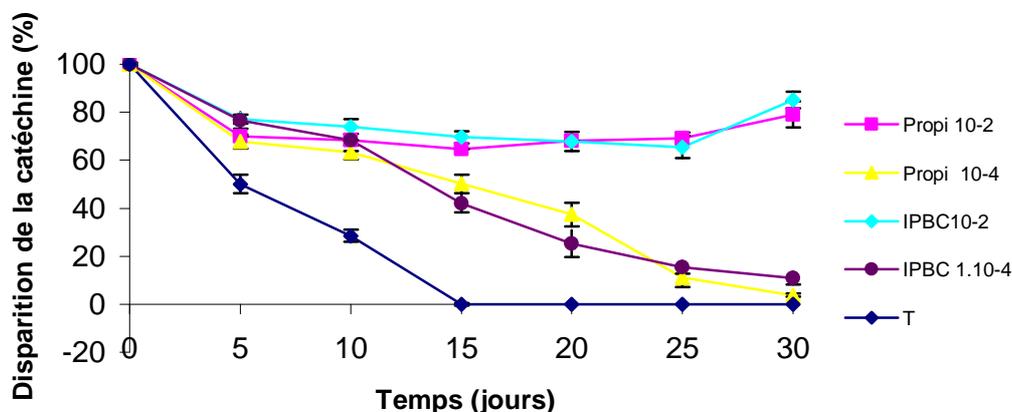


Figure 53 : Evolution de la quantité de catéchine en fonction du temps de dégradation

Pour ce qui est des échantillons protégés, une petite diminution de la concentration de catéchine a été observée pendant les 5 premiers jours. Elle est probablement due à des tentatives de colonisation du bois par le mycète. Après cette période, la concentration de catéchine est demeurée assez constante tout au long de la durée de l'étude, l'activité fongique étant inhibée par les fongicides.

L'allure des courbes obtenues dans le cas des éprouvettes mal protégées par des solutions trop faiblement concentrées en fongicides, a semblé très intéressante car elle décrivait une évolution intermédiaire absente des courbes de dégradations des extraits acétoniques globaux (figure 53) qui permettait d'espérer une éventuelle capacité à prévoir un niveau de dégradation intermédiaire. Cependant, la mise en parallèle de ces évolutions avec les pertes de masses obtenues après 12 semaines, n'a pas permis de conclure dans ce sens (tableau 6).

Tableau 6 : pertes de masses des éprouvettes de hêtre après 12 semaines de dégradation par *Trametes versicolor*

Concentration	Témoins	Propi 10 ⁻² M	Propi 10 ⁻⁴ M	IPBC 10 ⁻² M	IPBC 3.10 ⁻⁴ M
Perte de masses	38 %	3 %	24 %	2 %	41 %

En effet, si la perte de masse correspondant au traitement au propiconazole à 10⁻⁴M (24%) est bien intermédiaire entre celles respectivement obtenues pour les témoins (38%) et le bois

protégé au propiconazole $10^{-2}M$ (3%), la perte de masse mesurée avec des éprouvettes faiblement protégées avec l'IPBC (41%) est au moins équivalente à celle des témoins.

4.1.4. Evolution des extractibles du bois de hêtre par les pourritures brunes

De manière similaire à la méthode adoptée pour étudier l'évolution des extractibles du hêtre en cas de dégradation par des pourritures blanches, l'effet des champignons de pourritures brunes *Gloeophyllum trabeum* et *Coniophora puteana* a été quantifié de manière globale (figures 54 et 55) avant d'être analysé par HPLC.

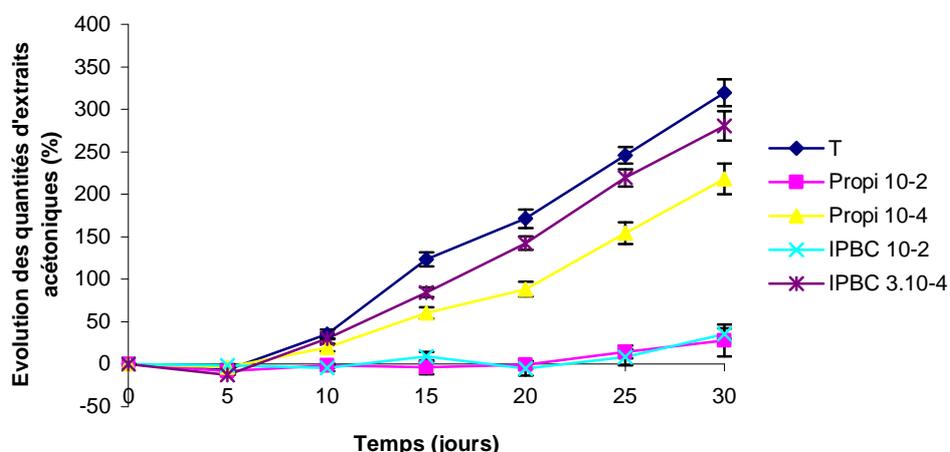


Figure 54 : Evolution des pourcentages d'extraits acétoniques du hêtre après dégradation par *Gloeophyllum trabeum*

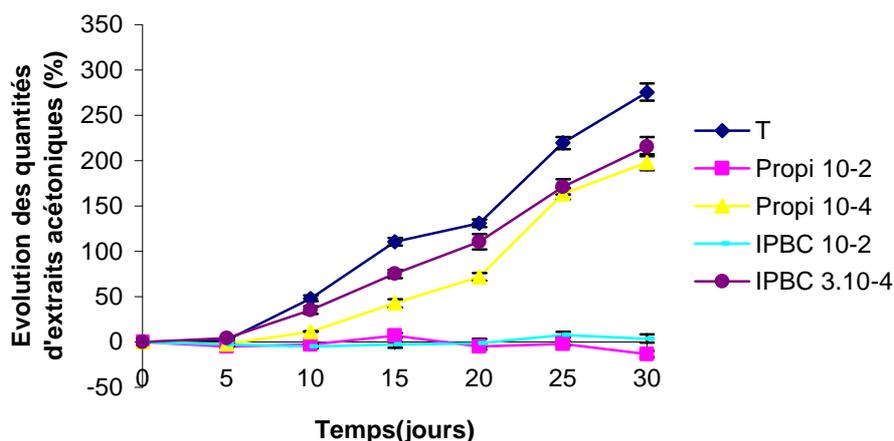


Figure 55 : Evolution des pourcentages d'extraits acétoniques du hêtre après dégradation par *Coniophora puteana*

Tableau 7 : Mesure des taux d'humidités du hêtre après dégradation par *G. trabeum*

	Témoins	Propi 10 ⁻² M	Propi 10 ⁻⁴ M	IPBC 10 ⁻² M	IPBC 3.10 ⁻⁴ M
Humidité finale (%)	68,7 ±2,1	46,9 ±1,1	55,2 ±1,6	49,1 ±2,3	52,3 ±1,1

Tableau 8 : Mesure des taux d'humidités du hêtre après dégradation par *C. puteana*

	Témoins	Propi 10 ⁻² M	Propi 10 ⁻⁴ M	IPBC 10 ⁻² M	IPBC 3.10 ⁻⁴ M
Humidité finale (%)	59,2 ±2,4	43,2 ±4,4	61,0 ±2,1	47,5 ±1,2	65,9 ±1,1

De manière générale, les valeurs des humidités (tableaux 7 et 8) variant entre 43,2% et 68,7% étaient propices au développement du champignon. Comme dans le cas des échantillons dégradés par *T. versicolor*, les humidités les plus faibles correspondaient toujours à celles des échantillons protégés. Il existe cependant une différence assez visible entre les deux champignons puisque, si la série de mesure réalisée avec *G. trabeum* était très similaire à celle obtenue avec *T. versicolor*, les valeurs d'humidité des éprouvettes insuffisamment protégées de *C. puteana*, se sont révélées anormalement élevées et même supérieures à celles du témoin. A l'opposé du comportement du bois mis en présence de pourritures blanches, les échantillons témoins et ceux imprégnés de concentrations non inhibitrices de fongicides, ont vu leur quantité d'extraits augmenter avec le temps de dégradation quelque soit le champignon de pourriture brune, comme cela avait déjà été observé par différentes études (Martínez M et al., 1999 ; del Rio 2001 ; Solár et al., 2007), les quantités d'extraits restant sensiblement constantes pour les échantillons protégés. Au bout des 30 jours de dégradation, les quantités d'extraits dues à *G. trabeum* étaient très légèrement supérieures à celles produites par *C. puteana*, mais surtout se situaient au-delà de 6 % dans tous les cas de blocs de bois non complètement protégés et devaient donc pouvoir servir d'indicateurs de la dégradation

En effet, la dégradation des composés du bois par les champignons de pourriture brunes résulte de l'action combinée des réactions non enzymatiques, d'enzymes hydrolytiques ou lignolitiques pour certains d'entre eux (Ritschkoff 1996 ; Lee et al., 2004). Contrairement à certains champignons de pourriture comme *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Stereum hirsutum* (Gutiérrez et al., 1999 ; Dorado et al., 2000, 2001) qui voient la quantité d'extraits diminuée durant la dégradation grâce à une forte assimilation des produit de dégradation des différents constituants, plusieurs basidiomycètes tels *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum* et *Poria subvermispora* durant la dégradation de bois, provoquent une augmentation de la fraction extractive (Gutiérrez et al., 1999 ; Martínez M. et al., 1999 ; Solár et al., 2007). Dans certains cas, cette augmentation pourrait être due à la biosynthèse de métabolites

secondaires du champignon, mais dans le cas des basidiomycètes elle est principalement due à l'accumulation de produits d'oxydation lors de dégradation de la lignine (Jin et al., 1990) et en moindre partie de ceux des polysaccharides. Cette augmentation des quantités d'extraits acétoniques est également observée lors de la dégradation de l'aubier et du duramen du pin sylvestre par *Ophiostoma ainoae* un champignon de coloration (Martínez-Iñigo et al., 1999), par contre une diminution de la quantité d'extraits est observée lors de la dégradation du bois d'Eucalyptus par *Ophiostoma valdivianum* (Gutiérrez A et al., 1999). Donc la capacité d'assimilation des extractibles natifs et des produits de dégradation ne dépend que du champignon et non de son groupe d'appartenance.

Les différents pourcentages des pertes de masses des échantillons de hêtre exposés aux deux champignons de pourritures brunes *Coniophora puteana* et *Gloeophyllum trabeum* durant les mêmes temps d'exposition sont présentés figure 56.

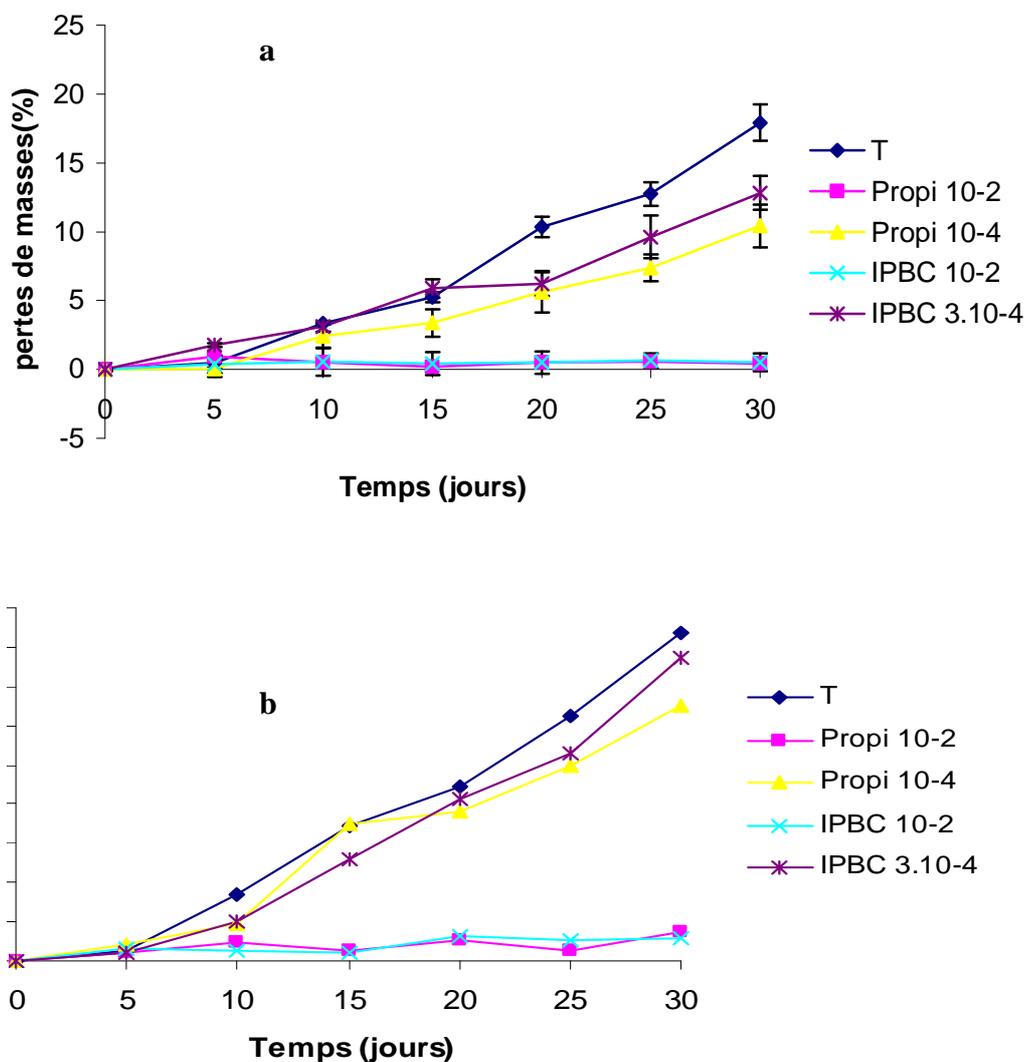


Figure 56 : Evolution des pertes de masses des éprouvettes de hêtre traitées ou non durant la dégradation par *Gloeophyllum trabeum* (a) et *Coniophora puteana* (b)

Après 30 jours d'exposition les pertes de masses des échantillons témoins ont atteint respectivement 16,8% et 17,6% pour ceux exposés à *C. puteana* et *G. trabeum*, *a priori* essentiellement dues à la dégradation des polysaccharides et un peu supérieures à celles causées par *T. versicolor*. La comparaison avec ce dernier a également mis en évidence un profil différent des courbes de dégradation puisque les pourritures brunes ont dégradé de manière constante à partir des (cinq) premiers jours alors que les courbes caractérisant la pourriture blanche (figure 47), présentaient une rupture de pente avec une accélération des processus à partir du vingtième jour. Cette activité importante et précoce des pourritures brunes semblait rendre plus difficile la recherche d'un marqueur de dégradation, néanmoins il était intéressant d'analyser les extractibles afin d'une part, de vérifier si la catéchine disparaissait de manière similaire ou non à ce qui avait été observé pour la pourriture blanche et d'autre part, pour essayer d'identifier soit la disparition, soit l'apparition d'un ou de plusieurs autres composés pouvant jouer un rôle de marqueur.

4.1.4.1. Chromatogrammes des extractibles du bois de hêtre dégradé par *Coniophora puteana* et *Gloeophyllum trabeum*

Le suivi de l'évolution des extractibles acétoniques par HPLC a été effectué tout les cinq jours afin d'étudier le comportement des différents extraits initiaux et ceux formés durant la dégradation. Seuls seront discutés les résultats obtenus avec des imprégnations au propiconazole, les expériences menées avec l'IPBC ayant conduits à des observations parfaitement identiques.

Comme dans le cas des échantillons dégradés par *T. versicolor*, nous nous sommes intéressés à la fraction polaire des extraits. Il est à noter que la grande variabilité au niveau de la composition chimique du bois est parfaitement illustrée ici par la différence existant entre les chromatogrammes du témoin non dégradé utilisé dans cette partie (figure 57) de notre étude contenant plus d'extraits initiaux identifiés et celui présenté précédemment (figure 41). Les éprouvettes utilisées avec les champignons de pourriture brunes, proviennent d'un billon différent de celui utilisé pour *T. versicolor*. Les échantillons témoins de ce lot présentent des composés d'oxydation de la lignine.

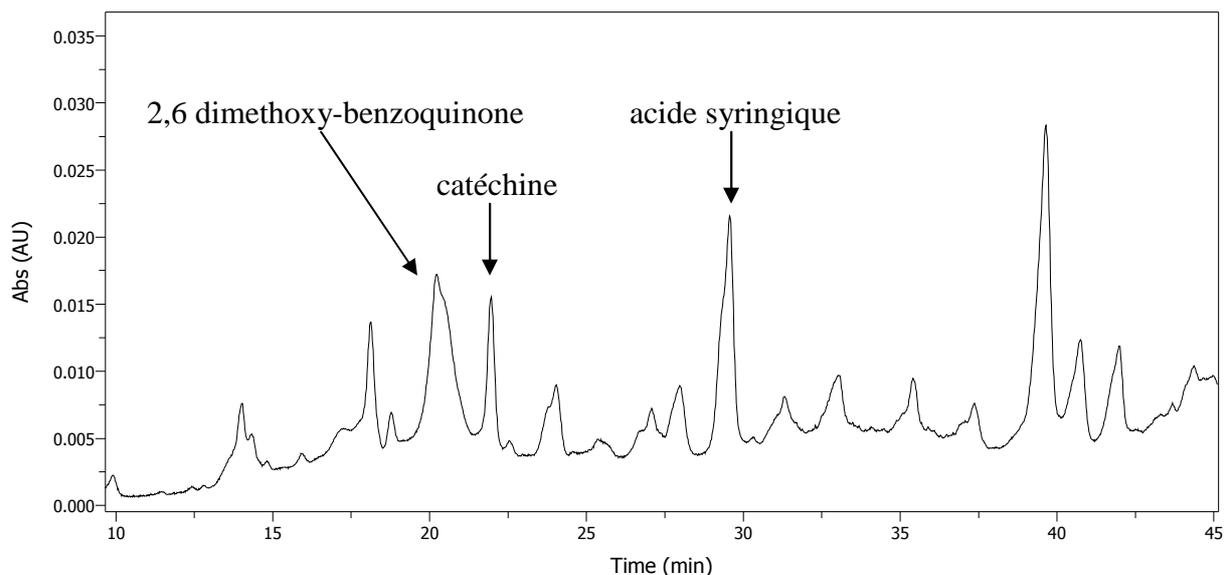


Figure 57 Chromatogramme des extraits du témoin du bois de hêtre

Ainsi, les molécules habituelles décrites chez le hêtre sont présentes avec la catéchine (22,5 min), la 2,6 dimethoxybenzoquinone (21,2 min) et acide syringique (28,5 min).

Les figures 58 et 59 représentent une superposition de chromatogrammes obtenus par l'analyse des extraits d'éprouvettes non imprégnées de fongicides. Les chromatogrammes étant très similaires dans le cas des éprouvettes imprégnées avec de faibles concentrations de biocides, ils ne seront pas présentés ici.

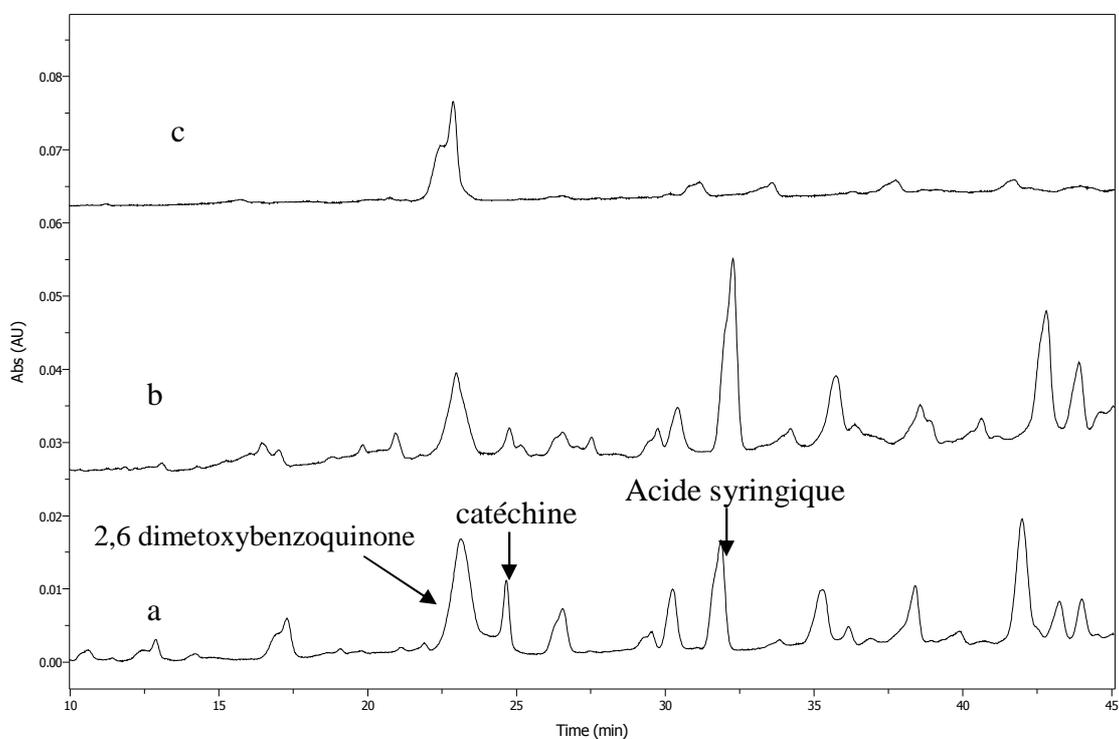


Figure 58 : Chromatogrammes des échantillons témoins dégradés Par *Coniophora puteana* durant 5(a), 15(b) et 30(c) jours

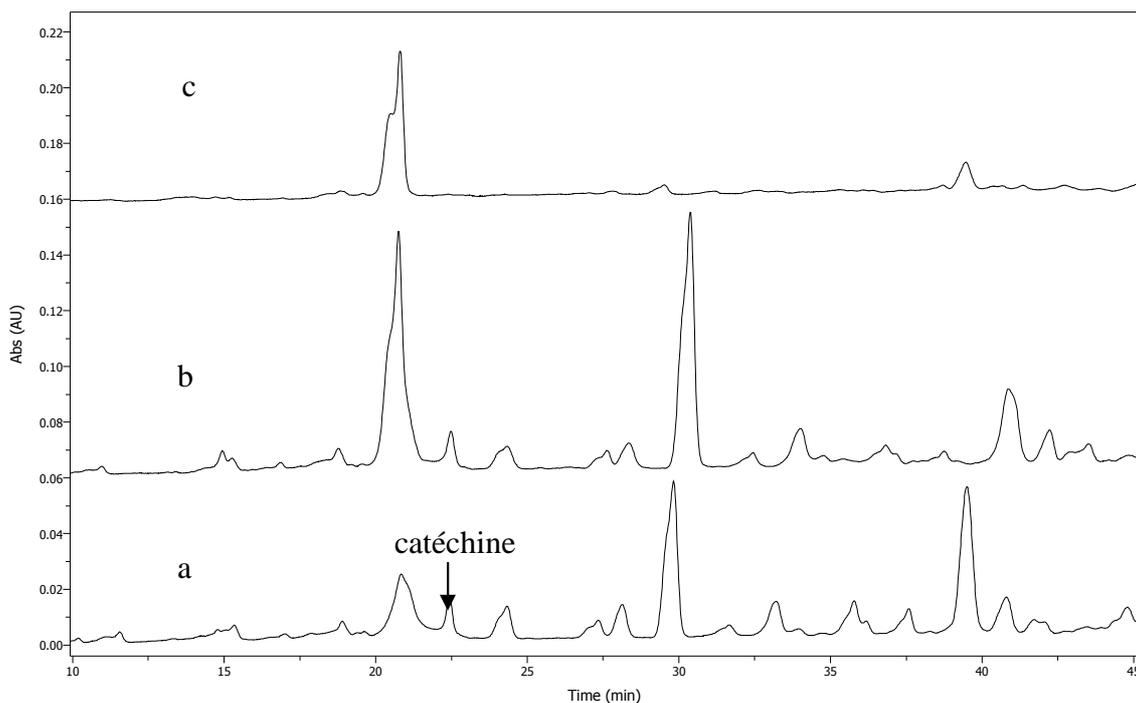
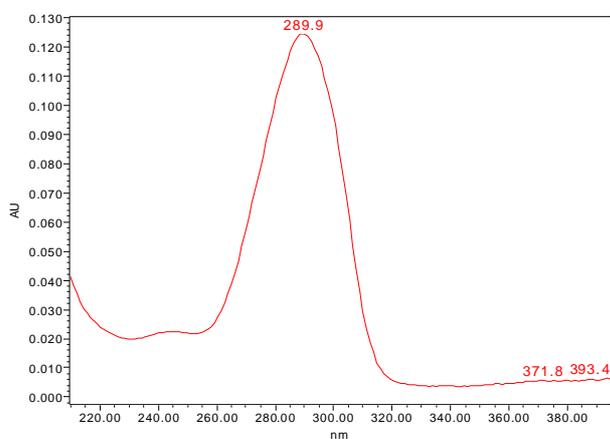
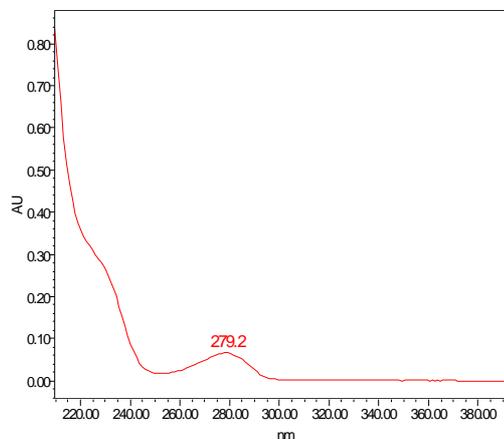


Figure 59 : Chromatogrammes des échantillons témoins dégradés par *Gloeophyllum trabeum* durant 5(a), 15(b) et 30(c) jours

La variation des profils chromatographiques entre le témoin non dégradé et les dégradés jusqu'à 15 jours (figures 58b et 59b) s'est avérée moins importante que pour ceux dégradés par *T. versicolor*, ce qui n'est pas anormal puisque les produits de dégradation des saccharides ne sont pas ou peu détectables en UV. Globalement, on a pu remarquer la croissance puis la disparition d'un pic non identifié à 46 minutes, un comportement identique mais légèrement plus tardif du pic à 28,5 minutes de l'acide syringique ainsi que l'augmentation continue du signal à 21,2 minutes de la 2,6-diméthoxybenzoquinone, l'identification de ces composés principaux avant et après dégradation ayant pu être obtenue en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres UV (figure 60) avec ceux des standards.



2,6 diméthoxy-benzoquinone à 27 minutes



Catéchine à 22,5 minutes

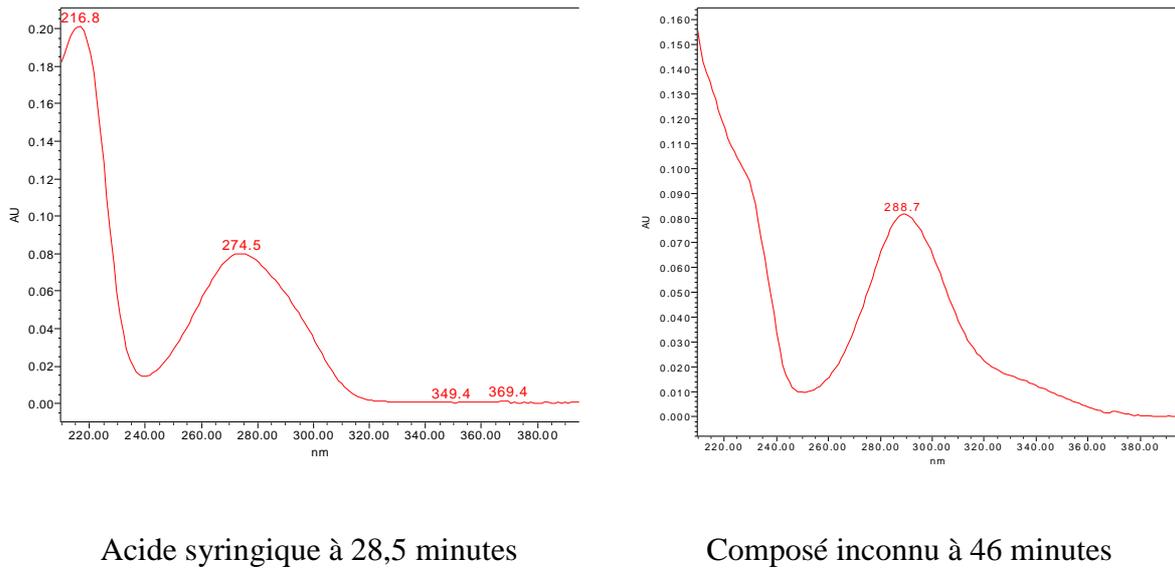


Figure 60 : Spectres UV des principaux signaux du chromatogramme

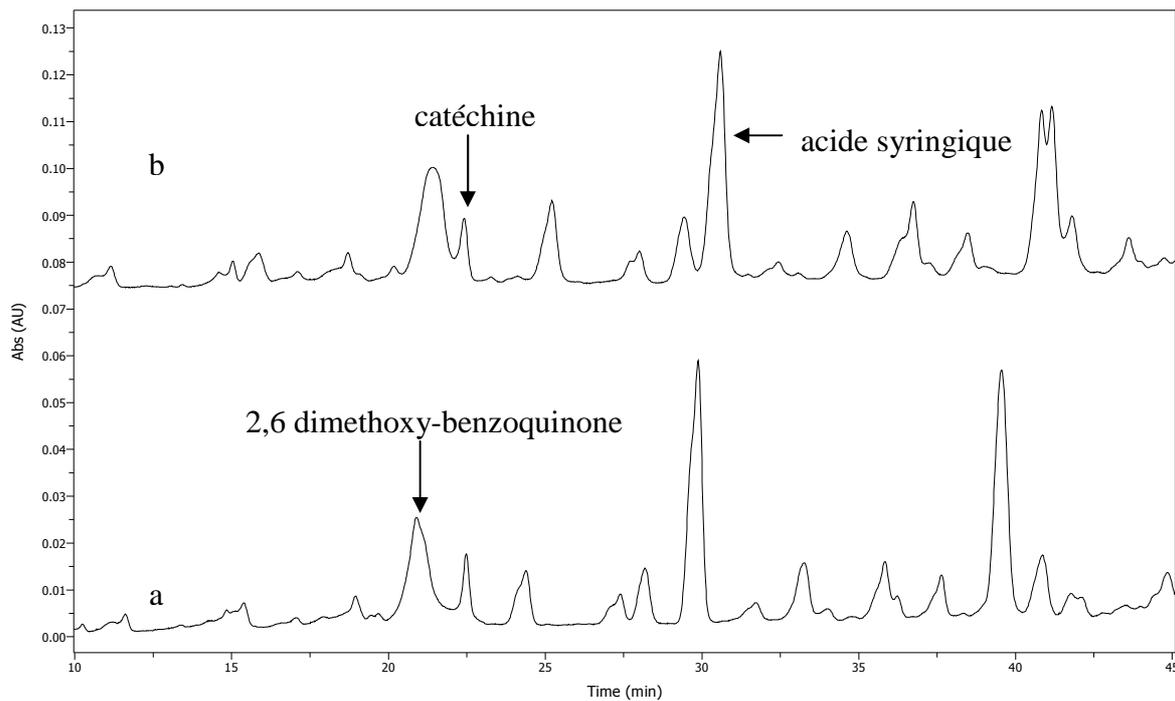


Figure 61 : Chromatogrammes des échantillons traités au propiconazole à 10^{-2} M durant 30 jours de dégradation par *G. trabeum* (a) et *C. puteana* (b).

Pour ce qui est des échantillons protégé avec le propiconazole (10^{-2} M) (figure 61), seules de très faibles variations d'intensité relatives des signaux ont pu être remarquées, en accord avec la faible variation du pourcentage d'extraits. Un allongement du temps de rétention de la plupart des pics est constaté pouvant être du à de nombreux facteurs.

Pour ce qui est des échantillons témoins après 30 jours de dégradation, on observe une nette variation des profils chromatographiques entre les échantillons dégradés et celui du témoin non dégradé. Certains composés comme la 2,6 dimethoxy-benzoquinone, l'acide syringique et le composé inconnu à 46 minutes, durant les 15 premiers jours voient leurs quantités varier énormément (Figures 58a, 58b, 59a et 59b), même si les profils chromatographiques restent assez proches. Comme avec *T. versicolor* après 30 jours de dégradation, les profils chromatographiques présentent une nette dégradation des composés initialement présents, rendant ainsi les chromatogrammes quasi linéaires à l'exception de la présence de la 2,6 dimethoxy-benzoquinone (Figure 58c et 59c). Ces résultats pourraient sembler en contradiction avec l'augmentation des taux d'extraits précédemment décrits, l'explication la plus probable restant que les deux champignons dégradent principalement les polysaccharides, en composés non observables en UV.

Pour ces deux champignons de pourriture brune, on observe une plus nette diminution des composés en présence de *C. puteana* comparée à *G. trabeum*. Quelque soit le champignon utilisé, au bout de 30 jours de dégradation du bois de hêtre, la disparition de la catéchine est totale. La concentration non inhibitrice de propiconazole, entraîne également la diminution des pics contenus dans les extraits initiaux. Durant les 30 jours de dégradation, les quantités des différents composés varient énormément. La catéchine, l'acide syringique et le composé à 46 minutes disparaissent presque totalement, par contre la 2,6 dimethoxy-benzoquinone est le composé majoritaire, restant au bout de 30 jours de dégradation bien que sa quantité a diminuée. Cela laisse supposer que durant la dégradation, de nombreux composés ont été convertis en quinone par des phénomènes d'oxydations enzymatiques ou non enzymatiques, comme l'avaient montré Lacki et Duvnjak (1998) lors de la conversion de l'acide synapique par les polyphénols oxydases de *T. versicolor*.

4.1.4.2. Evolution des quantités de quelques composés durant la dégradation du hêtre par *Coniophora puteana* et *Gloeophyllum trabeum*

L'évolution des quantités de catéchine durant la dégradation par les pourritures brunes des échantillons du bois de hêtre est présentée dans les figures 62 et 63

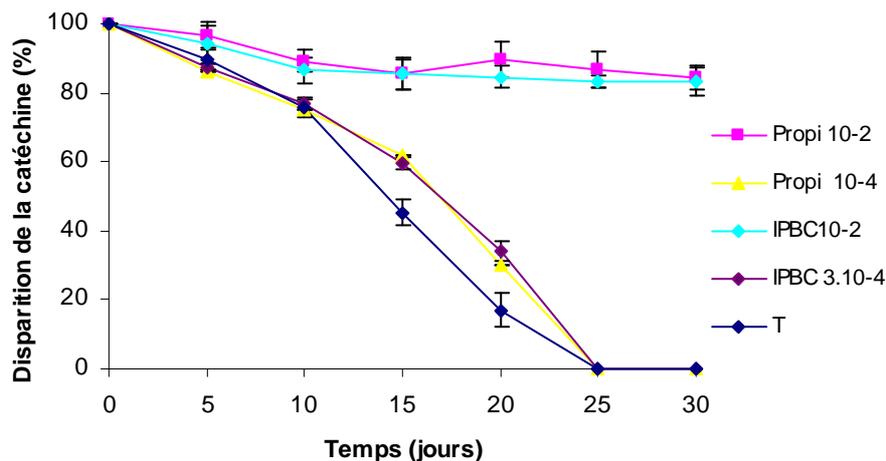


Figure 62 : Evolution de la quantité de catéchine en fonction du temps de dégradation par *G. trabeum*

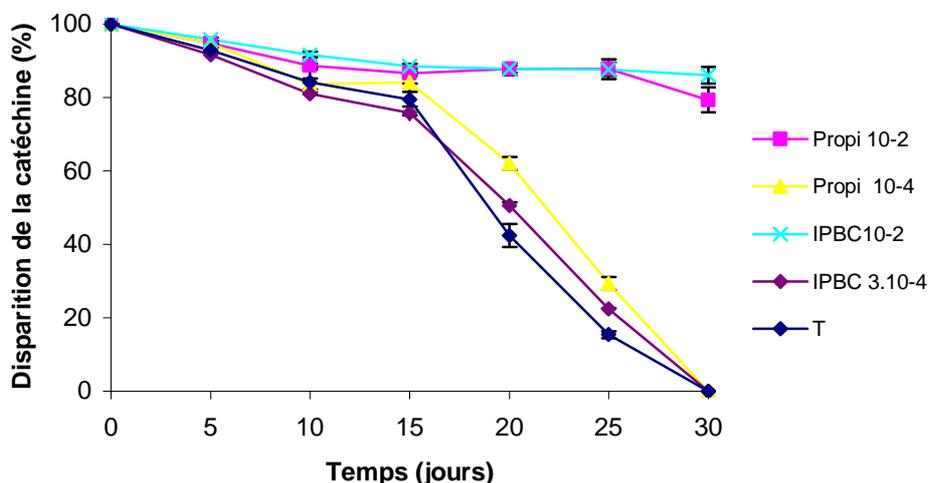


Figure 63: Evolution de la quantité de catéchine en fonction du temps de dégradation par *C. puteana*

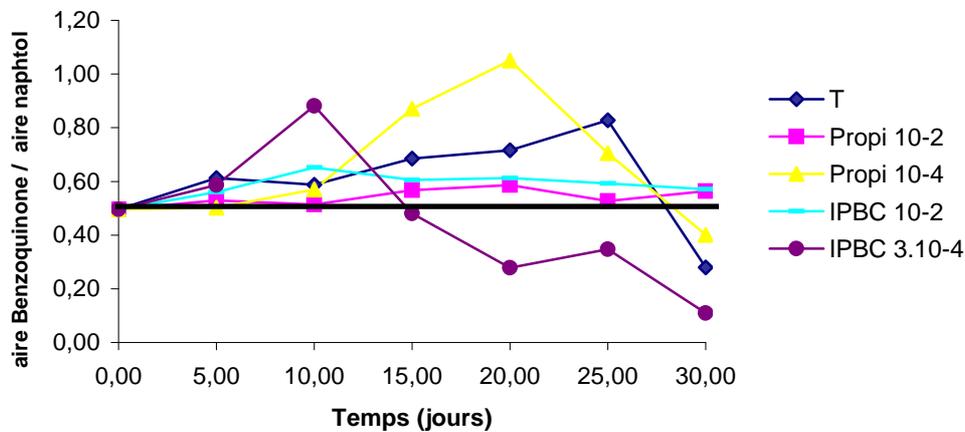
La quantité de catéchine des échantillons protégés a peu variée durant les 30 jours de l'expérience, avec des pertes situées entre 10% et 15% de la quantité initiale obtenues dès les 10 premiers jours.

Le signal de la catéchine a diminué graduellement dans les extraits des échantillons témoins et traités à faibles concentrations pour disparaître au bout de 25 jours avec *G. trabeum* et 30 jours avec *C. puteana*. Ces temps de dégradation sont plus longs que ceux observés lors des séries d'essais menés avec *T. versicolor*, qui étaient de 15 jours. Cela s'explique par le fait que la batterie enzymatique des pourritures blanches est plus adaptée à la dégradation des composés phénoliques que les processus employés par les pourritures brunes, l'inconvénient étant qu'il ne sera donc pas possible d'utiliser la catéchine comme marqueur précoce de

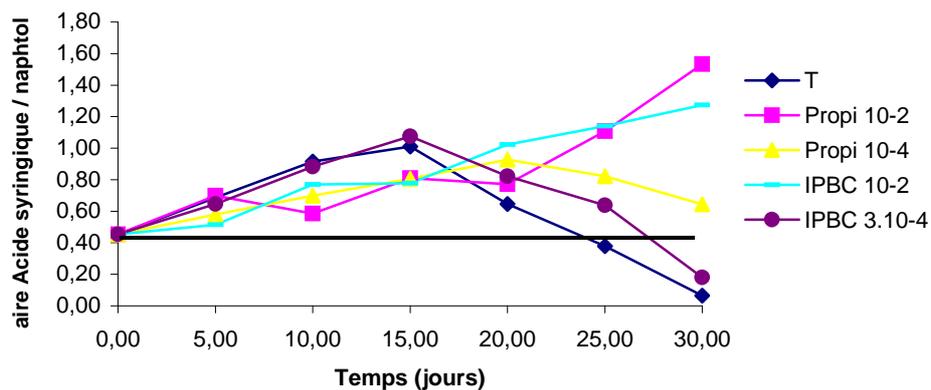
dégradation, du fait que son dosage ne présente une diminution sensible qu'à partir du dixième ou du quinzième jour, c'est-à-dire simultanément ou après que les pertes de masses n'aient commencé à être mesurables.

Nous avons alors essayer d'analyser l'évolution de la quantité des autres composés précédemment mis en évidence comme étant caractéristiques de la dégradation du bois, en utilisant le naphhtol comme référence interne pour doser ces produits figures 64 et 65. Cet alcool aromatique étant beaucoup moins polaire que les extractibles, il présente un temps de rétention plus élevé et n'apparaît donc pas sur la partie des chromatogrammes présentée.

a



b



c

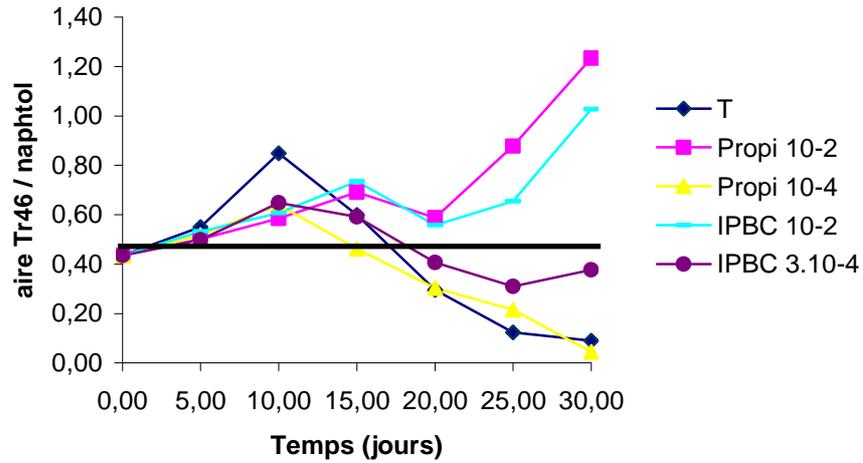
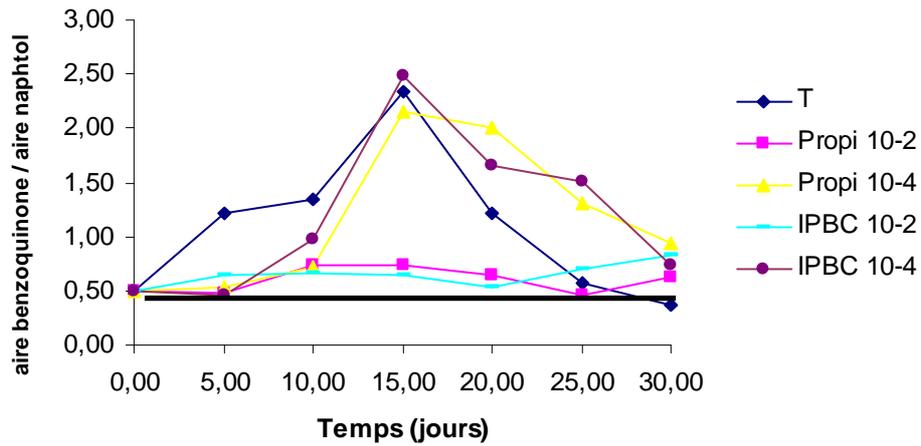
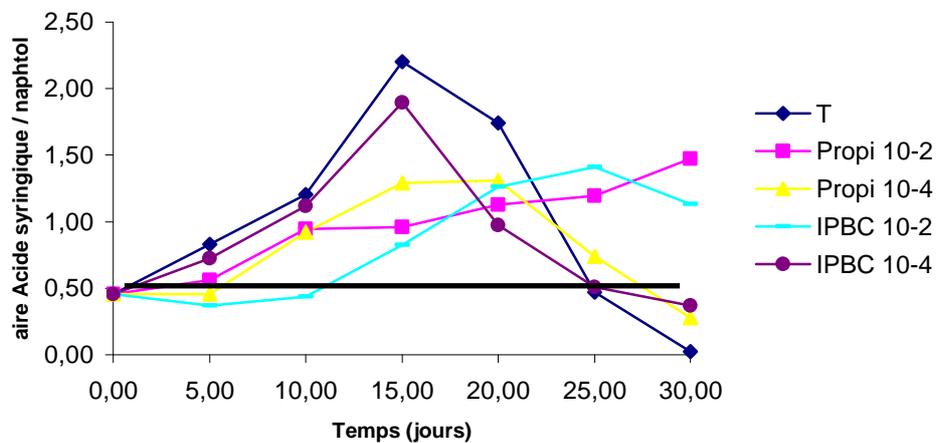


Figure 64 : Evolution du rapport: aire Tr 46 / aire naphthol) lors de la dégradation du bois de hêtre par *C. puteana*

a



b



c

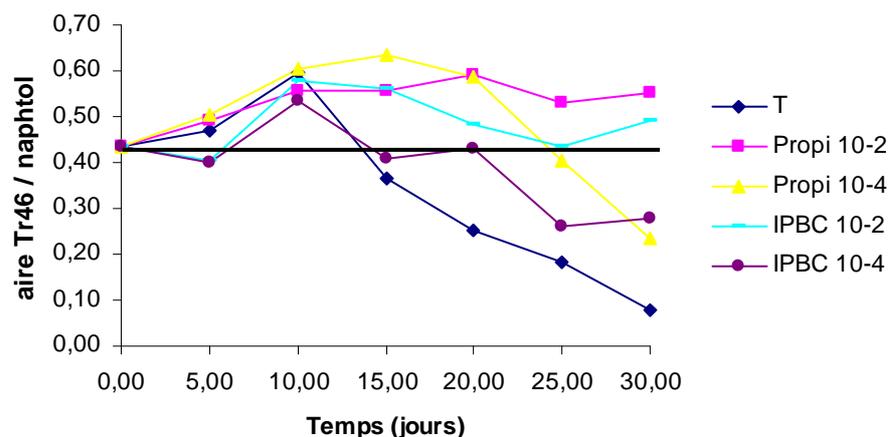


Figure 65 : Evolution du rapport: aire Tr 46 / aire naphтол) lors de la dégradation du bois de hêtre par *G. trabeum*

Dans le cas de la dégradation par *C. puteana*, la quinone n'apparaît pas comme un bon candidat au rôle de marqueur car il est difficile de trouver une tendance franche permettant de distinguer les éprouvettes protégées de celles qui ne le sont pas. Au contraire, l'acide syringique et dans une moindre mesure le composé inconnu sortant au temps de rétention de 46 min (appelé Tr46), permettent de faire cette distinction, mais seulement en fin d'expérience, au delà du vingtième jour.

Dans le cas de *G. trabeum*, l'amplitude des variations est plus importante et Tr46 et l'acide syringique semblent encore présenter les tendances les plus intéressantes mais qui n'apparaissent que tardivement.

L'analyse de l'évolution des extractibles au cours de la dégradation du bois de hêtre par les pourritures brunes a donc conduit à la mise en évidence de plusieurs composés caractéristiques de cette dégradation. Cependant, le dosage de ces marqueurs ne permet que de constater l'attaque fongique sans permettre de l'annoncer avant qu'elle ne se produise.

4.1.5. Evolution des extractibles du bois de chêne soyeux lors de sa dégradation

Le *Grevillea robusta* est un feuillu poussant en Australie et en Afrique australe. Il est très rencontré et utilisé en menuiserie et dans la construction dans des pays comme le Kenya d'où proviennent les échantillons utilisés dans cette étude. C'est un bois non durable vis à vis des termites et des champignons (Mburu 2007). Le bois de *G. robusta* contient environ 7% d'extraits totaux dont environ 5% sont lipophiles. Ces quantités d'extractibles sont faibles comparées à celles habituellement rencontrées dans les bois de feuillus des régions tropicales

souvent très durables. Des analyses des extraits du bois de *G. robusta* ont montrés que les extraits lipophiles sont essentiellement composés de n-alkyl et n-alcenyl résorcinols (figure 66) (Ritchie et al., 1965 ; Ridley et al., 1968 ; Cannon et al., 1973 ; F. Mburu 2007), qui sont donc solubles et extractibles dans des solvants peu polaires comme le chlorure de méthylène.

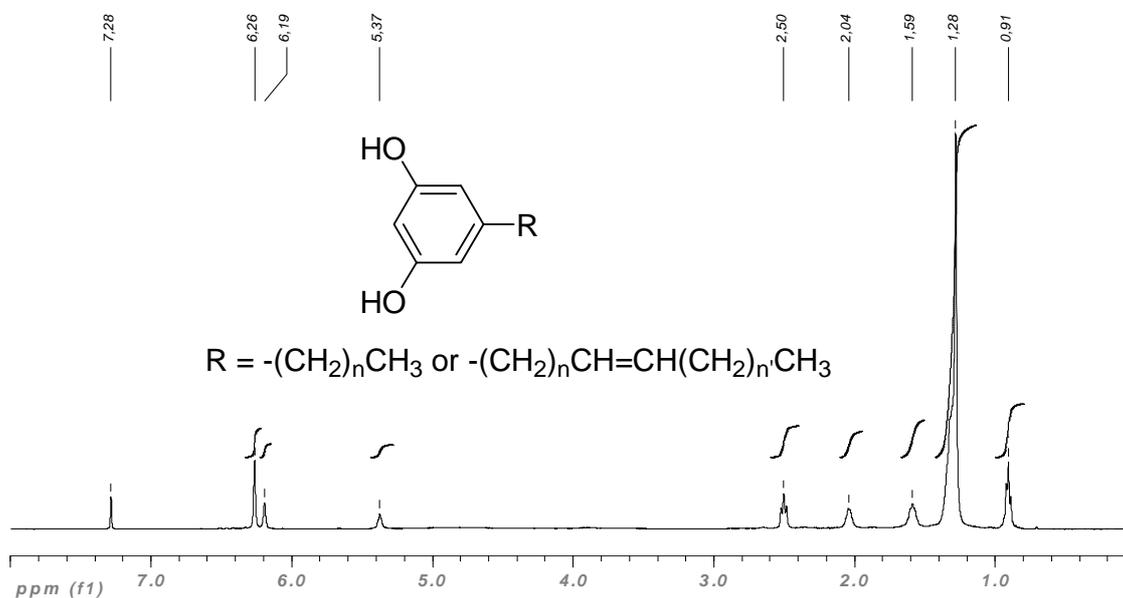


Figure 66 : Spectre RMN du proton des extraits au dichlorométhane du bois de *Grevillea robusta* (n-alkyl et n-alcenyl résorcinols (Mburu 2007))

4.1.5.1. Chromatogramme des extraits dichlorométhane du bois du chêne soyeux

L'utilisation d'une phase stationnaire C18 très apolaire a entraînée la mise au point d'un gradient de phase mobile assez court et abrupte, présenté ci-dessous (figure 67), qui a permis d'obtenir un chromatogramme très simple des extractibles, ne faisant quasiment apparaître que deux pics majoritaires autour de 22 minutes qui représente plus de 90% des aires totales des extraits détectables en UV (figure 67).

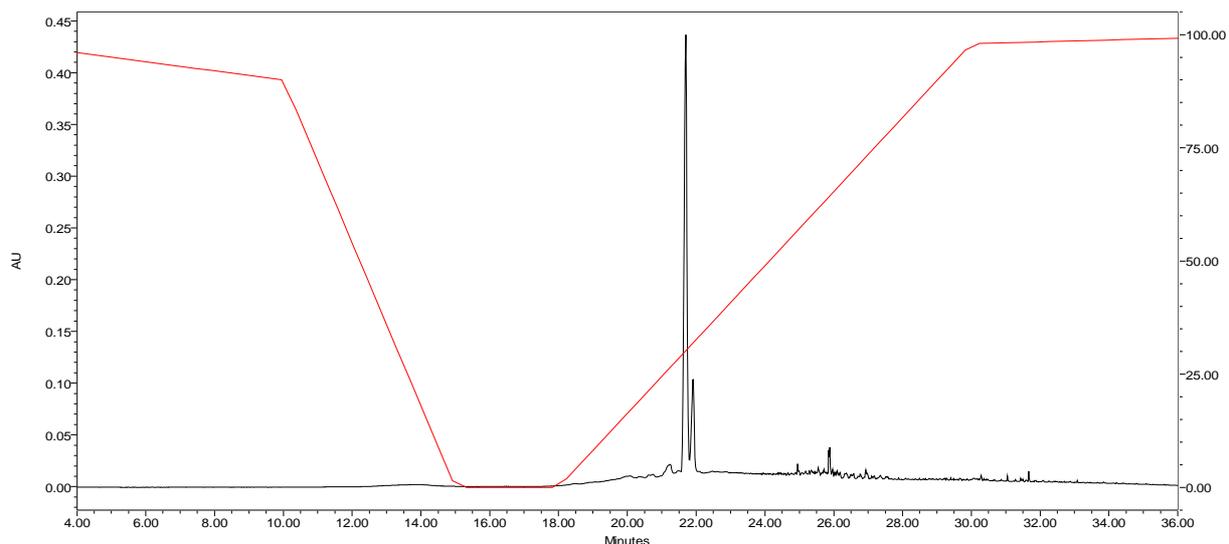


Figure 67 : Extraits dichlorométhane du bois de *Grevillea robusta* avec le pourcentage d'eau du gradient Eau/TFA

La nature exacte de ces composés n'a pas été déterminée avec certitude, faute de disposer de standards correspondant aux structures évoquées ci-dessus. Cependant, les spectres UV des deux principaux pics présentaient la même allure avec un même maximum d'absorption à 274,5 nm (figure 68) rappelant le motif résorcinol.

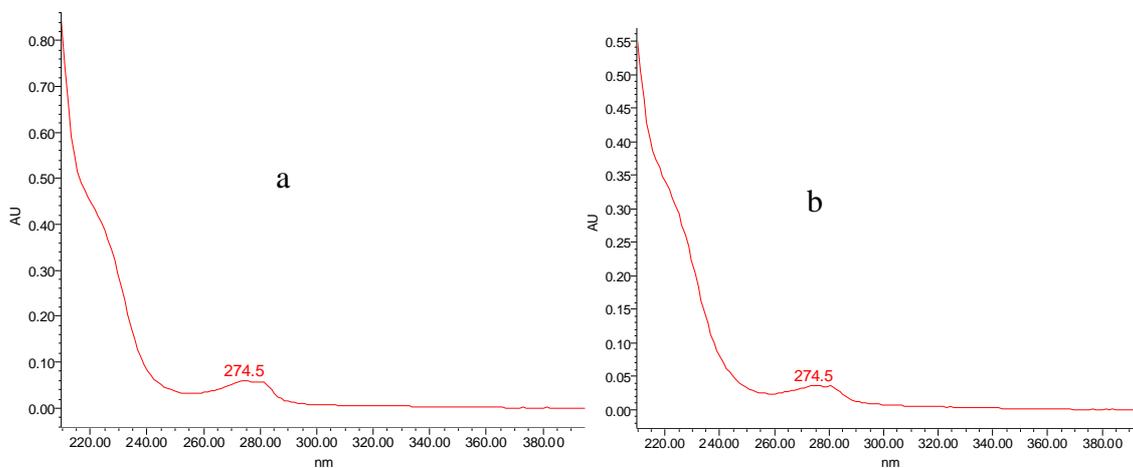


Figure 68 : spectre UV à 280nm du pic à 21,86 minutes (a) et 22,2 minutes (b)

Trois champignons, connus pour leur forte capacité à dégrader différents bois, ont été sélectionnés pour cette partie de l'étude. Les deux pourritures fibreuses *T. versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium* sont parmi les plus étudiées des champignons de pourriture et utilisées dans le domaine de la préservation du bois et des analyses enzymatiques de dégradation du matériel lignocellulosique. Le champignon de pourriture cubique *Antrodia sp*

isolé par le CIRAD, provient d'une région tropicale et souvent utilisé dans des tests de durabilité de bois tropicaux (Amusant et al., 2004 ; Kokutse et al., 2006).

4.1.5.2. Evolution des taux d'extraits durant la dégradation du bois du chêne soyeux

Pour cette partie d'étude, nous avons cherché d'une part à suivre l'évolution des extractibles du bois de *Grevillea robusta* durant la dégradation par des champignons de pourritures et d'autre part de doser et si possible d'identifier certains produits de dégradation caractéristiques afin de pouvoir prévenir la dégradation fongique.

Pour chacun des trois champignons utilisés dans cette partie, cinq séries de blocs de *Grevillea robusta* sont exposés à la dégradation pour une durée de dégradation maximale de 30 jours. Les différents blocs sont traités comme précédemment avec le hêtre à savoir imprégnés dans des solutions de propiconazole (10^{-2} M et 10^{-4} M) ou d'IPBC (10^{-2} et $3 \cdot 10^{-4}$ M). L'humidité des blocs a été déterminée au bout des 30 jours de dégradation, les extractibles ont été déterminés par gravimétrie puis analysés par HPLC tout les 5 jours.

La quantité d'extraits dichlorométhane contenue dans le bois de *Grevillea robusta* est d'environ 5% de la masse sèche de bois (Mburu 2007). Dans notre cas cette quantité est de 4,82%.

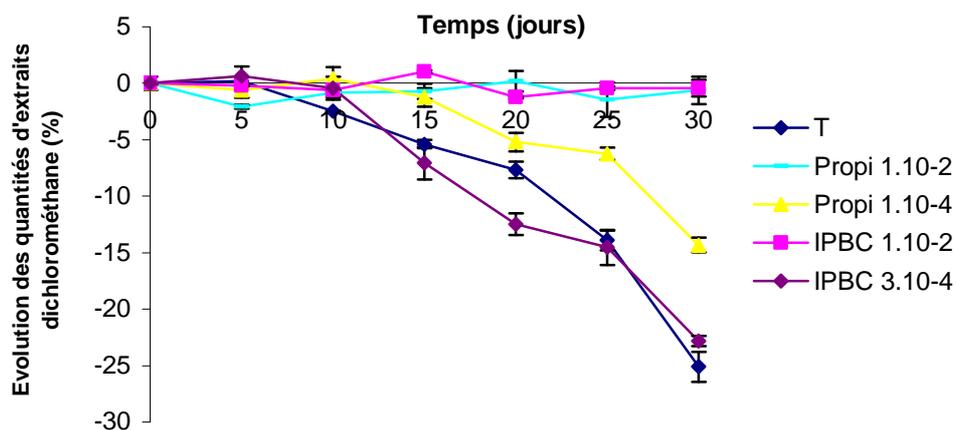


Figure 69 : Evolution des pourcentages d'extraits au dichlorométhane de *Grevillea robusta* après dégradation par *Trametes versicolor*

Tableau 9 : Mesure des taux d'humidités *Grevillea robusta* après dégradation par *Trametes versicolor*

Jours	Témoins	Propi 10 ⁻² M	Propi 10 ⁻⁴ M	IPBC 10 ⁻² M	IPBC 3.10 ⁻⁴ M
Humidité(%)	62,44 ±1,22	44,46 ±1,9	61,43 ±2,35	46,51 ±3,12	48,45 ±2,43

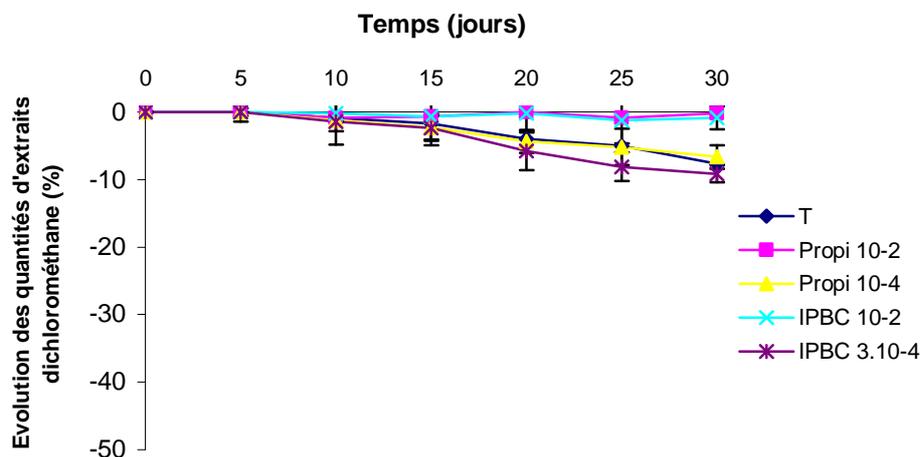


Figure 70 : Evolution des pourcentages d'extraits au dichlorométhane de *Grevillea robusta* après dégradation par *Phanerochaete chrysosporium*

Tableau 10 : Mesure des taux d'humidités *Grevillea robusta* après dégradation par *Phanerochaete chrysosporium*

Jours	Témoins	Propi 10 ⁻² M	Propi 10 ⁻⁴ M	IPBC 10 ⁻² M	IPBC 3.10 ⁻⁴ M
Humidité(%)	56,43 ±1,12	48,69 ±2,3	57,01 ±2,33	52,32 ±3,56	55,21 ±2,12

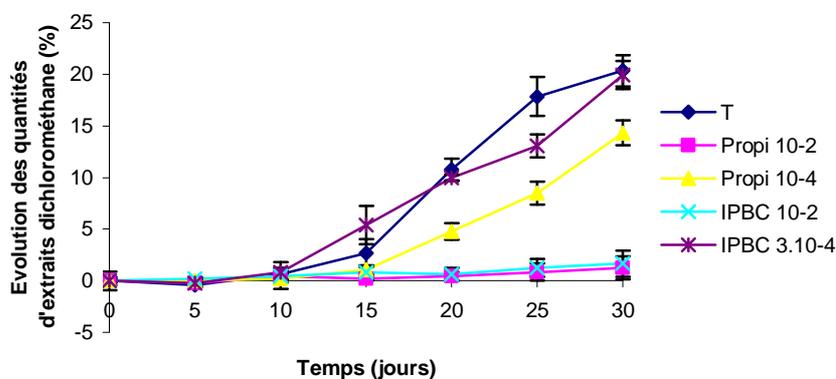


Figure 71 : Evolution des pourcentages d'extraits au dichlorométhane de *Grevillea robusta* après dégradation par *Antrodia sp*

Tableau 11 : Mesure des taux d'humidités *Grevillea robusta* après dégradation par *Antrodia sp*

Jours	Témoins	Propi 10 ⁻² M	Propi 10 ⁻⁴ M	IPBC 10 ⁻² M	IPBC 3.10 ⁻⁴ M
Humidité(%)	69,54 ±3,5	50,65 ±2,3	60,22 ±2,67	52,43 ±1,26	55,75 ±1,44

Les échantillons témoins, de manière générale, présentaient des taux d'humidités sensiblement plus élevés (56,43 à 69,54 %) que ceux des échantillons imprégnés (44,46% à 61,43%), les valeurs les plus basses correspondant toujours aux plus faibles taux de dégradation (tableaux 9, 10, 11). Néanmoins, les différentes valeurs sont restées propices au bon développement des mycéliums.

De nouveau, il a été possible de mettre en évidence un effet différent entre les deux types de pourriture. Pour les blocs de bois peu ou pas protégés, les souches fibreuses entraînent une diminution du pourcentage d'extractibles, la souche cubique (*Antrodia sp*) provoque un accroissement de leur proportion (Figures 69, 70 et 71). Quelque soit le produit de préservation utilisé, une concentration de 10⁻² M n'a autorisé que de très faibles variations des quantités d'extraits avec des taux se situant entre 4,82% et 4,72% pour la plus basse.

L'importante diminution des quantités d'extraits des échantillons non protégés en présence de *T. versicolor*, montre que les activités enzymatiques de dégradation émises par ce champignon sont capables de dégrader les composés lipophiles de *G. robusta*. Par contre le champignon de pourriture blanche *P. chrysosporium* n'ayant principalement que des peroxydases pour dégrader les composés phénoliques (contrairement à *T. versicolor* qui en plus possède des laccases), dégrade les extraits de *G. robusta* de façon moindre.

Pour les blocs mis en présence d'*Antrodia sp*, l'augmentation du taux d'extraits est significative après 20 jours de dégradation chez les échantillons témoins et ceux traités avec IPBC 1.10⁻⁴ M (respectivement 10,78% et 9,9%). Ces taux augmentent avec le temps de dégradation jusqu'à atteindre des valeurs de 20,3% et 19,9%. Cette augmentation est due à l'ajout des produits de dégradation de la lignine et de façon moindre à des possibles métabolites émis par le champignon durant cette dégradation (Jin et al., 1990 ; Martínez M et al., 1999 ; Solár et al., 2007).

4.1.5.3. Evolution des pertes de masse durant la colonisation du bois du chêne soyeux

Les figures 72, 73 et 74 montrent l'évolution des pertes de masses des échantillons traités ou non et soumis à la dégradation fongique durant 30 jours.

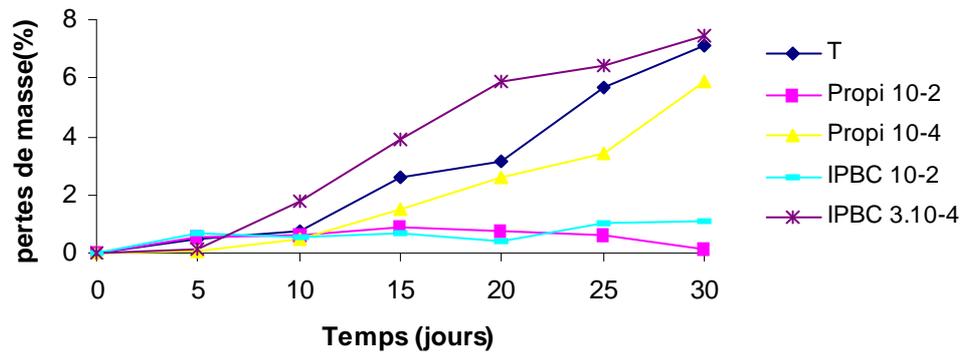


Figure 72 : Evolution des pertes de masses des éprouvettes de hêtre traité ou pas durant la dégradation par *T. versicolor*

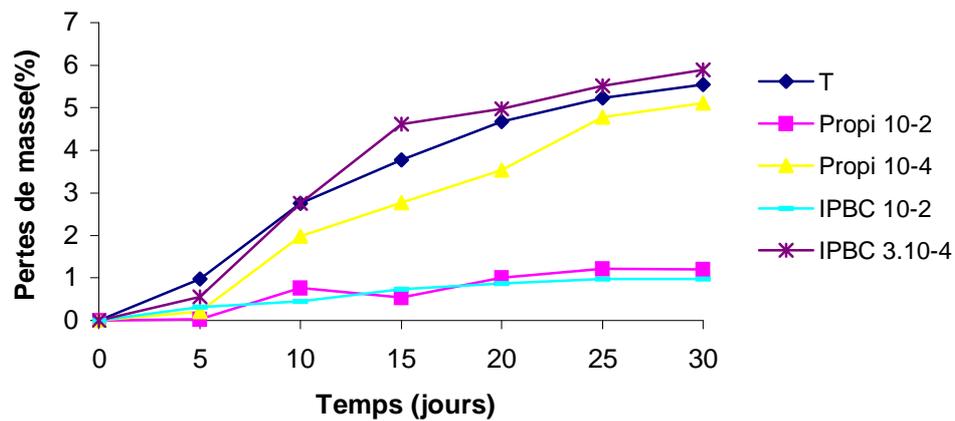


Figure 73 : Evolution des pertes de masses des éprouvettes de hêtre traité ou pas durant la dégradation par *P. chrysosporium*

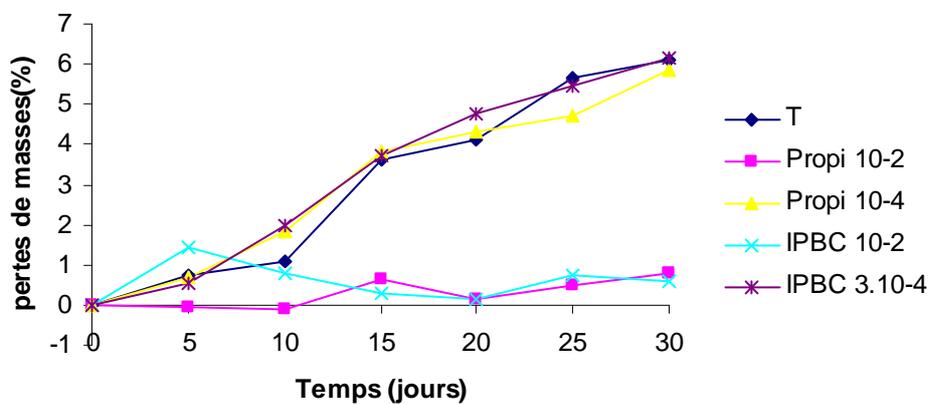


Figure 74 : Evolution des pertes de masses des éprouvettes de hêtre traité ou pas durant la dégradation par *Antrodia sp*

Ces séries d'expériences ont montré que la perte de masse des échantillons était aisément mesurable à partir de 10 jours avec *P. chrysosporium* et entre 10 et 15 jours pour *T. versicolor* et *Antrodia sp*. En comparant ces courbes avec celles des figures 69, 70 et 71, il apparaît clairement que les phénomènes d'augmentation ou de diminution des quantités d'extractibles, surviennent simultanément et ne peuvent pas permettre de prévoir l'évolution des blocs de bois.

4.1.5.4. Chromatogrammes des extractibles du chêne soyeux lors de sa dégradation

Afin de suivre l'évolution des extraits du bois de *G. robusta* durant la dégradation par différents champignons, la méthode de dosage avec le naphthol comme référence interne a été mise en œuvre, celui-ci étant visible sur les chromatogrammes présentés (figure 75).

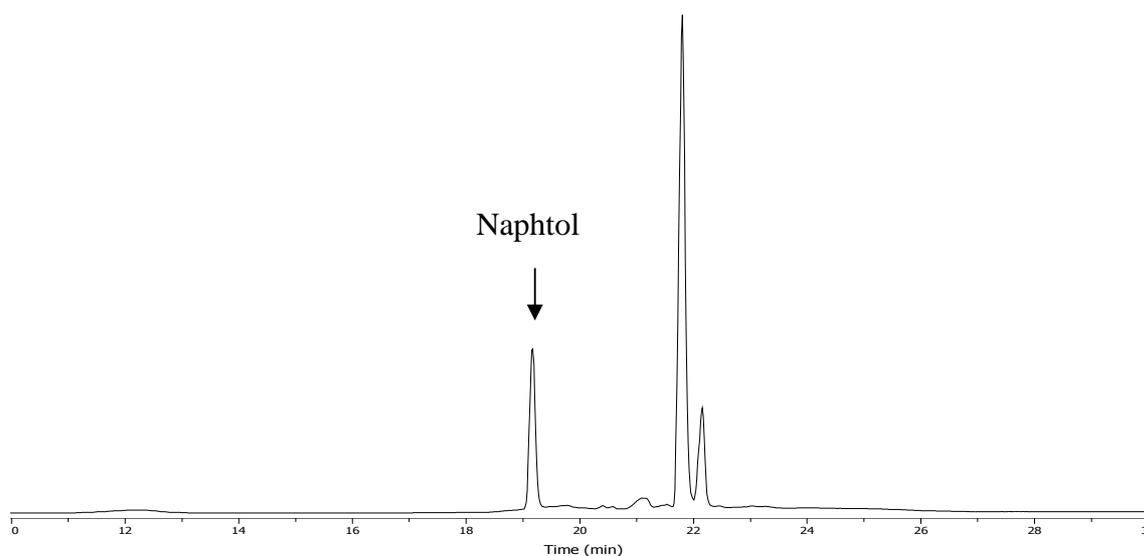


Figure 75 : Chromatogramme à 280 nm des extraits au CH_2Cl_2 de *G. robusta* avec naphthol

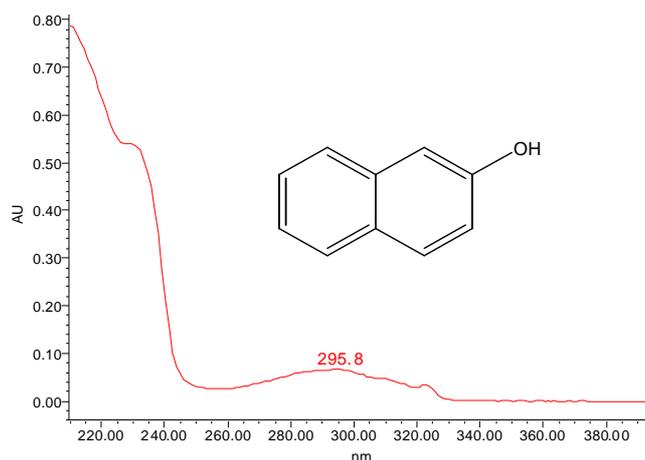


Figure 76 : spectre UV du naphthol

Afin de suivre l'évolution des différents composés contenus dans les extraits dichlorométhane du bois de *Grevillea robusta* durant la dégradation fongique, les extraits ont été analysés par HPLC tout les cinq jours durant 30 jours. Les chromatogrammes présentés sont ceux des extraits d'échantillons témoins et traités avec le propiconazole, les résultats obtenus avec l'IPBC étant tout à fait comparables.

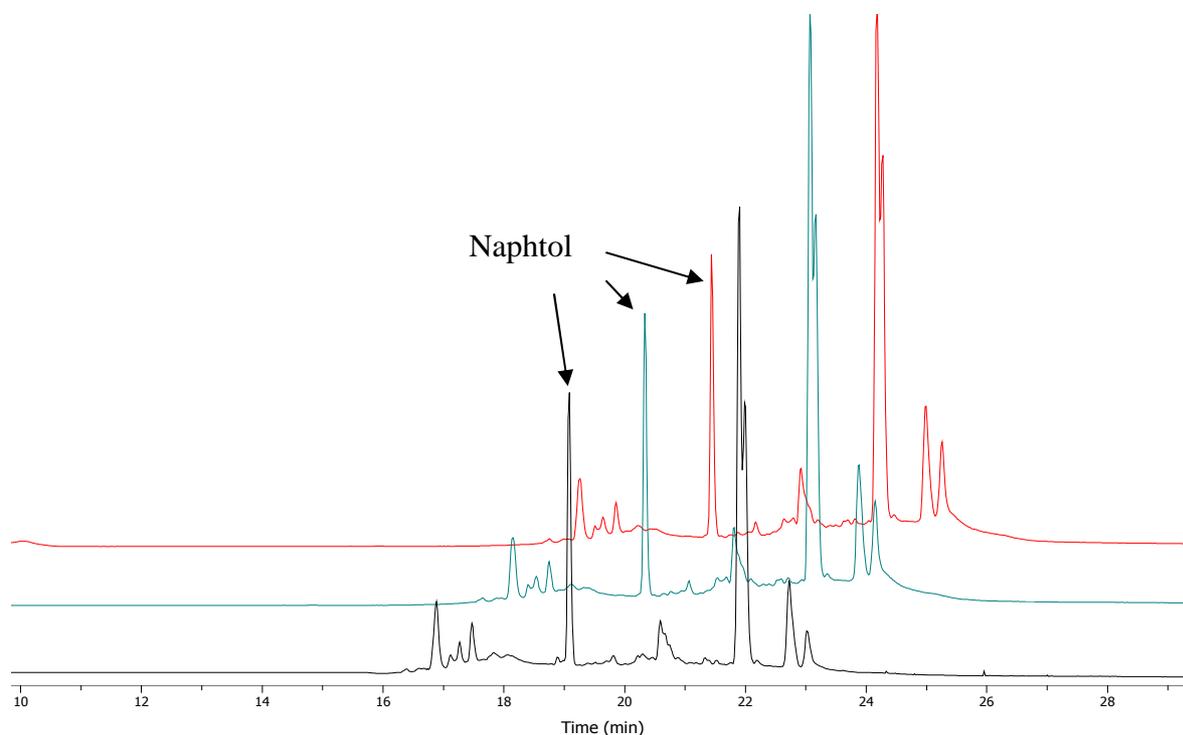


Figure 77 : Chromatogrammes des extraits des blocs protégés par du Propiconazole (10^{-2} M) après 30 jours d'exposition à *T. versicolor* (noir), *Antrodia sp* (rouge), *P. chrysosporium* (vert)

Les chromatogrammes des extraits protégés avec du propiconazole (figure 77) montrent de grosses similitudes avec de témoin non dégradé (figure 75). Malgré tout, on constate l'apparition de nouveaux groupes de pics avant et après le standard et au alentour de 22,9 et 23 minutes. Tous ces différents pics apparaissent dans tous les échantillons et peuvent être dues à une légère dégradation des extraits majoritaires ou de la lignine. Bien que la concentration de 10^{-2} M protège le bois de la dégradation fongique au vu des pertes de masse des échantillons, néanmoins elle ne tue pas immédiatement le champignon qui peut encore à certains moment modifier les extractibles. Ces nouveaux composés peuvent également provenir du champignon qui émet certains métabolites durant sa croissance, voir tentative de croissance (Verscheure et al., 2002).

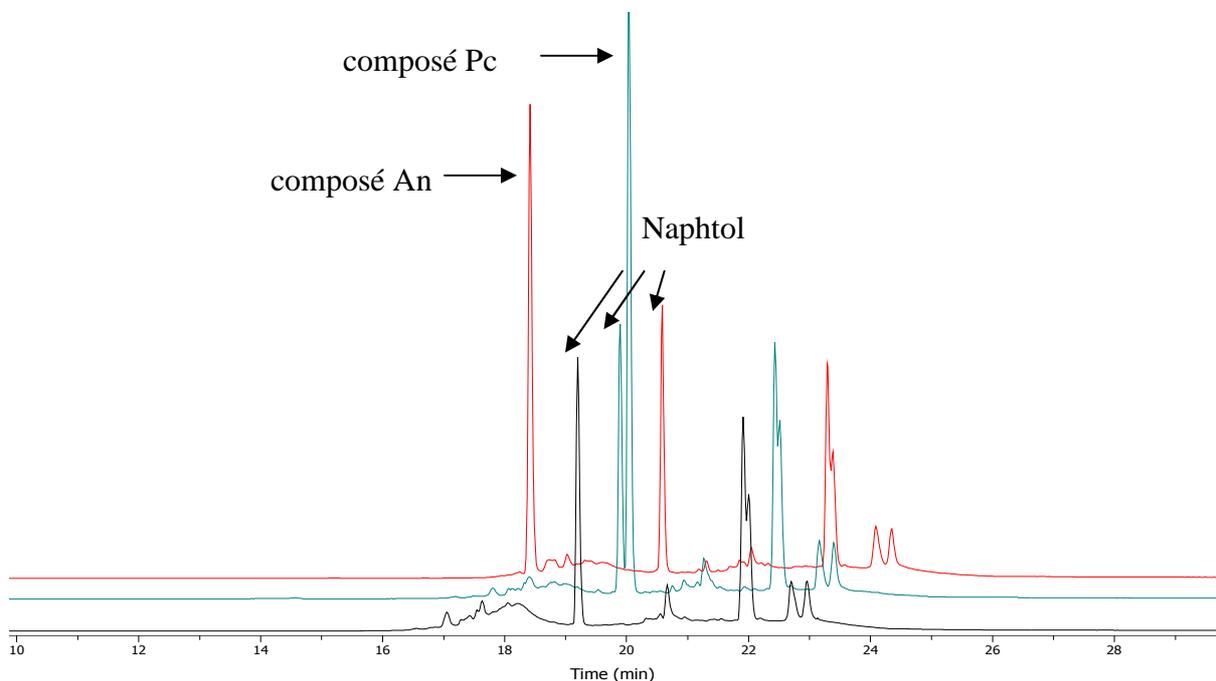


Figure 78 : Chromatogrammes des extraits des échantillons traités avec du propiconazole (10^{-4} M) durant 30 jours d'exposition à *T. versicolor* (noir), *Antrodia sp* (rouge), *P. chrysosporium* (vert)

Dans le cas des extraits d'échantillons traités avec du propiconazole à 10^{-4} M (figure 78), les chromatogrammes se sont révélés largement différents de celui du témoin non dégradé avec l'apparition de nouveaux pics majoritaires composé An à 16,9 minutes et composé Pc à 19,3 minutes, sauf en présence de *T. versicolor*. Pour chaque type de champignon, on constate des produits de dégradation différents. Ces identifications sont faites en fonction des temps de rétention et des spectres UV.

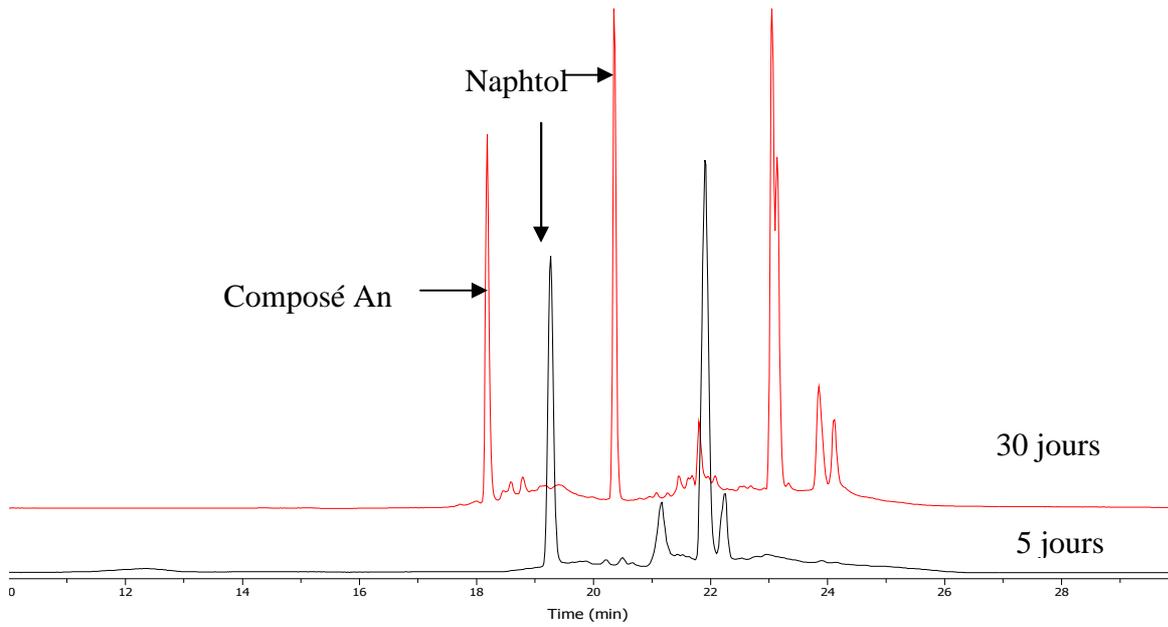


Figure 79 : Chromatogrammes des extraits des éprouvettes *Antrodia sp* témoin 5 et 30 jours

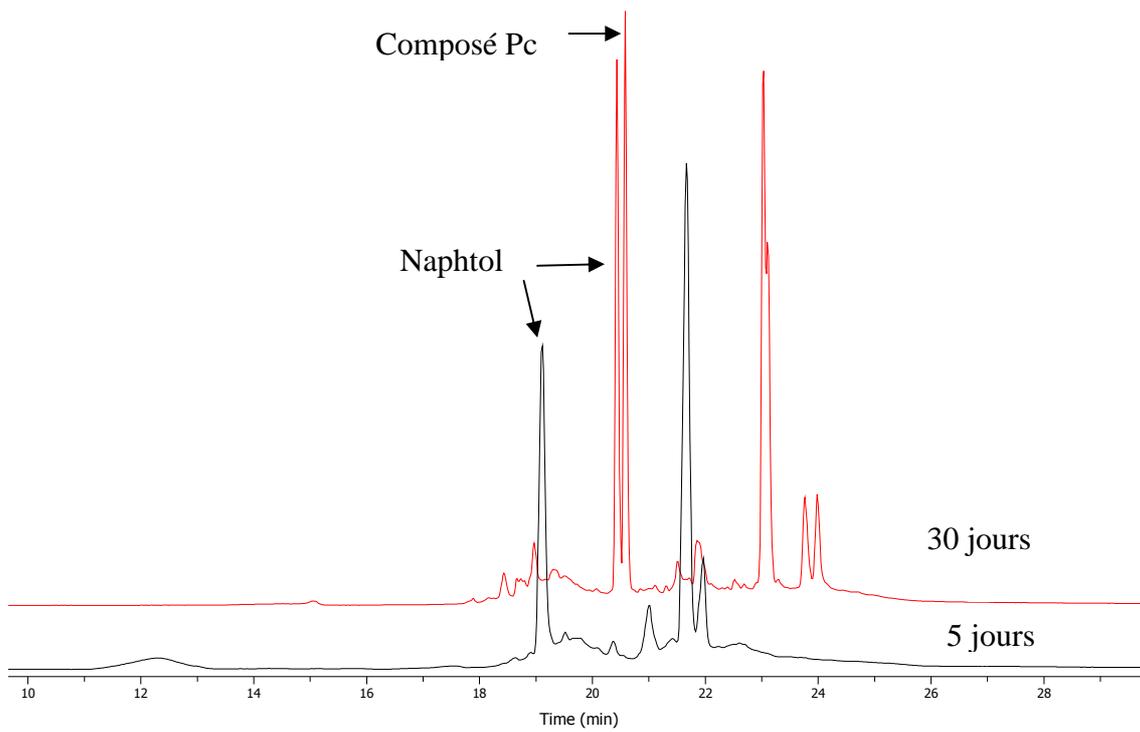


Figure 80 : Chromatogrammes des extraits des éprouvettes *P. chrysosporium* témoin à 5 et 30 jours

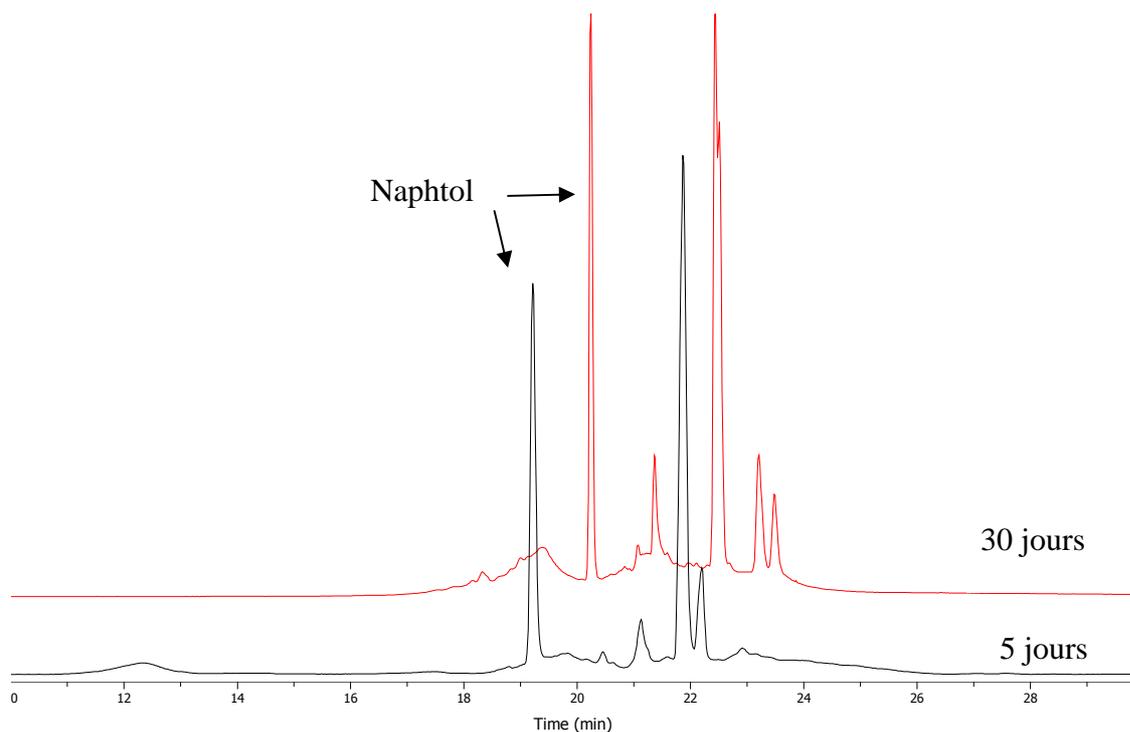


Figure 81 : Chromatogrammes des extraits des éprouvettes
T. versicolor témoin 5 et 30 jours

Les figures 79, 80 et 81 montrent les profils chromatographiques des extractibles des échantillons témoins de *G. robusta* à 5 et 30 jours. Après 30 jours de dégradation par *A. sp*, on observe l'apparition du pic du composé An, tandis qu'avec *P. chrysosporium* on observe l'apparition du pic du composé Pc. La dégradation du bois de *Grevillea robusta* par *T. versicolor* (figure 81) entraîne l'apparition d'un ensemble de composés minoritaire regroupés entre 17,5 et 18,3 minutes, ce qui est également observé durant la dégradation par les deux autres pourritures.

Les spectres UV de quelques uns des principaux produits de dégradation sont présentés dans la figure 82.

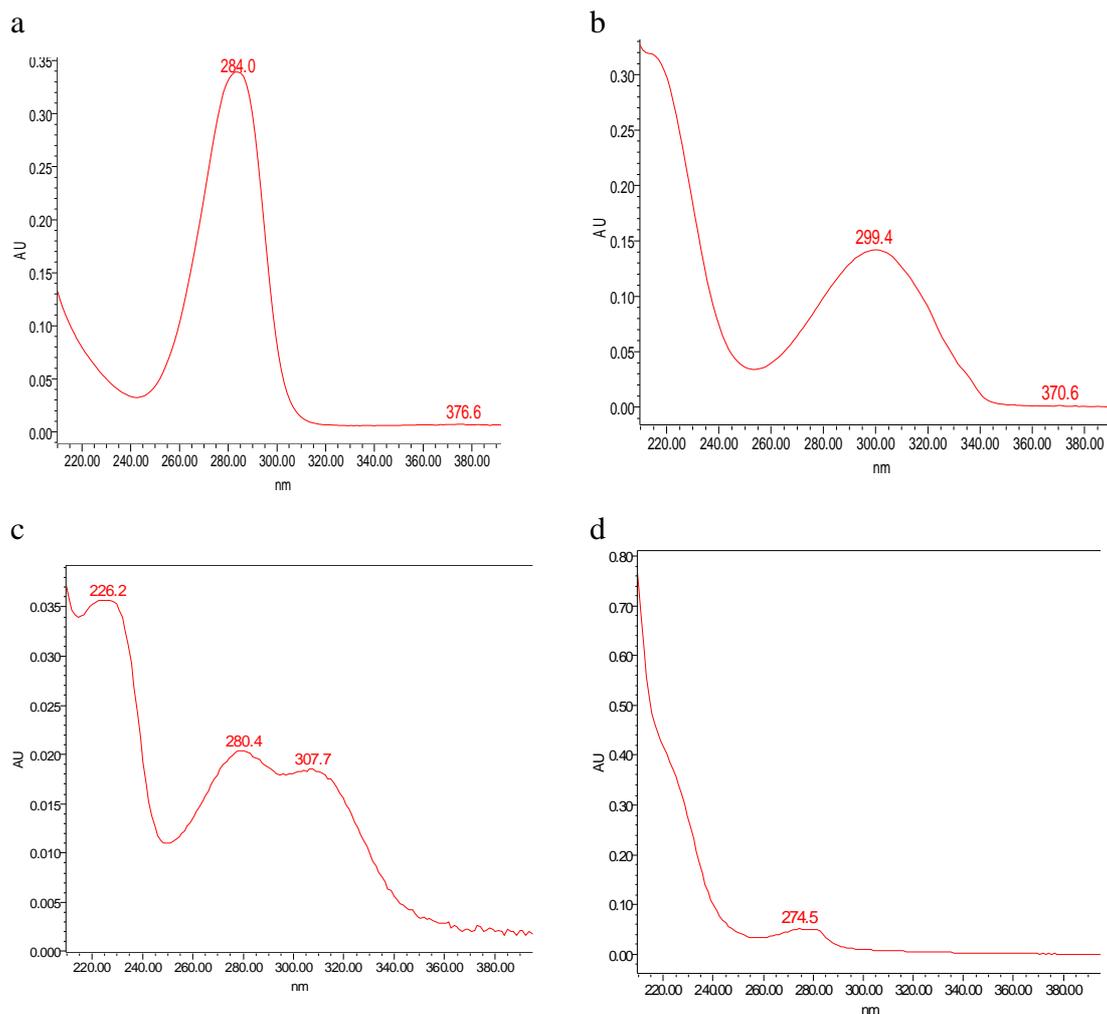


Figure 82 : spectres UV de produits de dégradation du bois de *Grevillea robusta*
 (a) composé An, (b) composé Pc, (c) un composé du massif entre 16,5 et 18 minutes,
 (d) dédoublement du pic initial

Les valeurs des maximums d'absorption des composés An (a) et Pc (b), respectivement de 284 et 299 nm semblent indiquer des motifs poly-phénoliques et donc des produits de dégradation de la lignine.

La dégradation par *T. versicolor* quant à elle ne produit pas de pics flagrants avec des temps de rétention bien marqués, mais entraîne l'apparition d'un gros massif autour de 18 minutes constitué d'un ensemble de composés mal séparés dont l'un a son spectre UV dans la figure 82c, avec cette fois des valeurs d'absorption caractéristiques de fonction carbonylés conjugués.

Les chromatogrammes des jours intermédiaires (15, 20 et 25) présentent la même allure, il a semblé préférable de ne pas les joindre afin de ne pas surcharger les figures.

Plus le temps de dégradation augmente, plus les chromatogrammes deviennent complexes, mais contrairement aux extraits initiaux du bois de hêtre qui sont complètement dégradés par les différents champignons, les extractibles de *Grevillea robusta* sont encore détectables après 30 jours quelque soit le champignon utilisé.

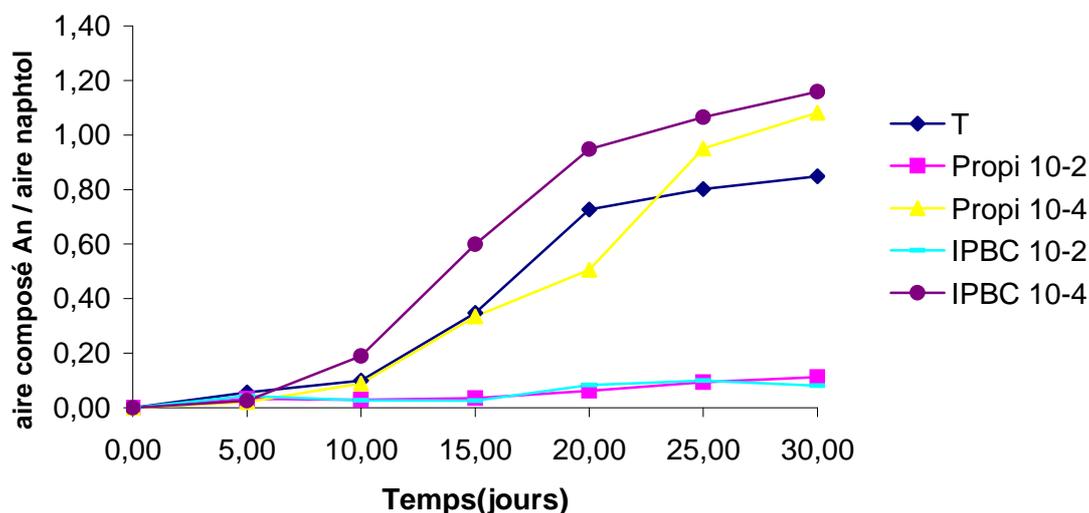


Figure 83: Evolution du facteur de réponse des composés: aire composé An / aire naphhtol lors de la dégradation du bois de hêtre par *Antrodia sp*

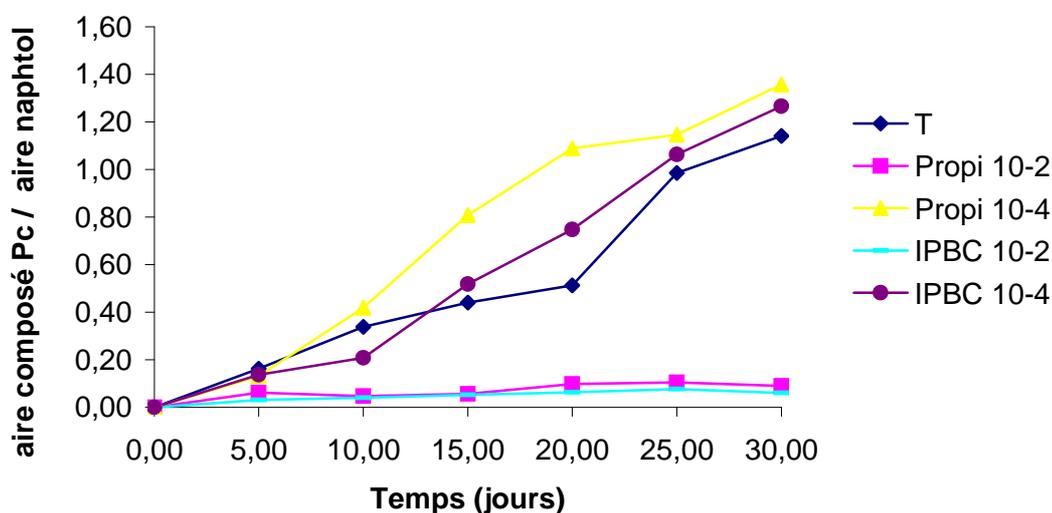


Figure 84: Evolution du facteur de réponse des composés: aire composé Pc / naphhtol lors de la dégradation du bois de hêtre par *P. chrysosporium*

Le dosage des composés An et Pc, montre que les quantités de ces deux produits de dégradation augmentent avec le temps de dégradation. L'augmentation du pic du composé An

commence à être significative entre 10 et 15 jours (figure 83), tandis que celle du composé Pc (figure 84) commence entre 5 et 10 jours, c'est-à-dire que les évolutions des dosages de ces marqueurs et des pertes de masses sont parfaitement concomitantes.

Il est donc possible de conclure cette partie, en soulignant que :

- l'importante quantité des principaux extraits du bois de *Grevillea robusta* fait en sorte qu'ils ne sont pas totalement dégradés durant les 30 jours de colonisation, que se soit chez les témoins ou en présence d'une faible concentration de fongicide. De plus, avec les pertes de masse inférieures à celles rencontrées avec le bois de hêtre, la dégradation des extraits dans ce cas demeure moins rapide.
- l'apparition de certains produits de dégradation peut être caractéristique de la souche dégradant le bois et qui de ce fait pourraient servir de marqueurs

4.1.6. Evolution des extractibles du bois de Pin Sylvestre durant sa dégradation par *Poria placenta*

Le bois de Pin est avec celui d'Eucalyptus, l'un des plus utilisés pour la fabrication de la patte à papier. De nombreuses études ont été réalisées afin d'optimiser la fabrication de cette patte en éliminant des extractibles qui influencent beaucoup la qualité du papier obtenu. Pour cela, l'utilisation des champignons de pourriture blanche capables de dégrader les extractibles lipophiles du pin a fait l'objet de nombreuses études (Gutierrez et al., 1999 ; Martínez-Iñigo et al., 1999 ; Dorado et al., 2001). La pourriture cubique *Poria placenta*, très agressive vis à vis du bois de pin est l'un des modèles d'étude lors du suivi de la dégradation des bois de résineux selon la EN113. Nous essayerons de suivre l'évolution des extractibles du bois de pin durant une dégradation par une pourriture brune *Poria placenta*, et voir s'il est possible de corréler le comportement de certains extractibles avec les pertes de masses observées chez les différents échantillons.

4.1.6.1. Production d'extractibles durant la dégradation du bois de Pin par P. placenta

Dans cette partie de l'étude, la capacité de la pourriture brune *Poria placenta* a été évaluée du point de vue de son potentiel de dégradation des polysaccharides et des extractibles lipophiles du bois de pin. La partie utilisée ici est l'aubier de pin à cause de sa relativement faible toxicité fongique comparée au duramen (Martinez- Iñigo et al., 1999).

Tableau 12 : Mesure des taux d'humidité après 30 jours d'évolution par *Poria placenta*

Jours	Témoins	Propi 10 ⁻² M	Propi 10 ⁻⁴ M	IPBC 10 ⁻² M	IPBC 3.10 ⁻⁴ M
Humidité (%)	52,31±1,34	45 ,41±2,12	46,56±1,11	43,78±2,02	50,57±1,56

La première remarque est que, en général, comme pour les autres pourritures cubiques (*Coniophora puteana* et *Gloeophyllum trabeum*) durant la colonisation des éprouvettes témoins et non efficacement protégées, la quantité d'extraits augmente (figure 1), ce qui est en accord avec les données bibliographiques (Martínez M et al., 1999 ; Solár et al., 2007). La quantité d'extraits totaux contenue dans l'aubier de Pin est en moyenne autour de 4% à 5% de la matière sèche (Claassen et al., 2000 ; Dorado et al., 2000). Dans notre cas, cette quantité d'extraits initiale dans nos échantillons témoins est de 4,04%. Les quantités d'extraits des échantillons protégés comme présentés dans les parties précédentes, varient peu avec ici de légères augmentations au bout de 30 jours de dégradation. De plus les taux d'humidités observées sont favorables au développement du champignon (tableau 12). La dégradation des composés du bois est plus importante chez les échantillons témoins que chez ceux traités avec IPBC 3.10⁻⁴ et au propiconazole à 10⁻⁴ M au bout de 30 jours de dégradation avec des augmentations de taux d'extraits respectivement de 138%, 115% et 94% (figure 85). On peut noter que même si les éprouvettes sont protégées avec des concentrations assez élevés, la variations des taux d'extraits des ces échantillons ne sont pas nulles bien que faibles.

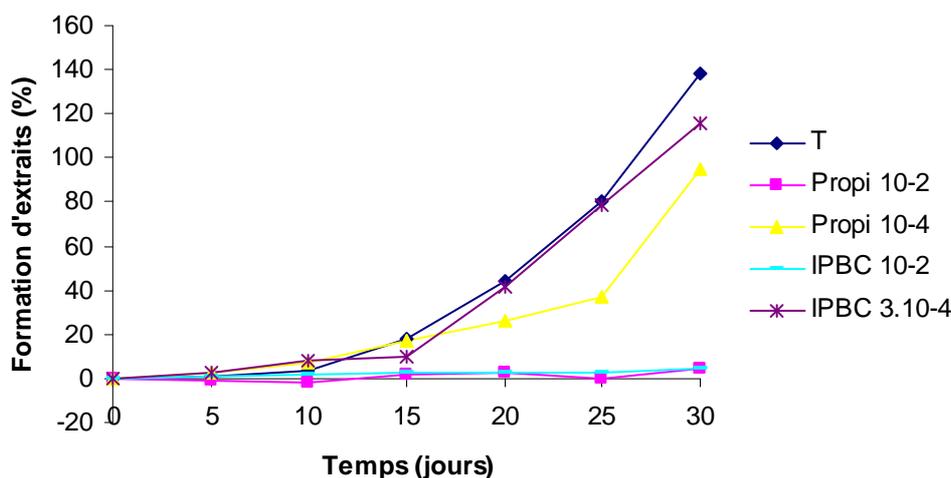


Figure 85 : augmentation des extraits CH₂Cl₂ totaux du bois de Pin en présence ou non de produit de préservation par *P. placenta* durant 30 jours

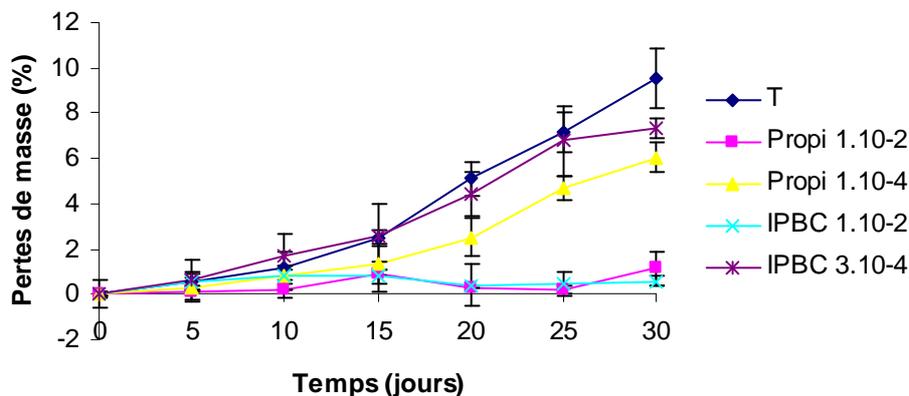


Figure 86 : Evolution des pertes de masse des éprouvettes de Pin traité ou non durant la dégradation par *Poria placenta*

En comparant l'évolution de la quantité d'extractibles à la perte de masse des éprouvettes, on observe une bonne synchronisation dans le temps entre les courbes (figures 85 et 86). Les valeurs en pourcentages étant plus élevés pour l'augmentation de masses des extractibles (+20% à 15 jours) que pour les pertes de masses des blocs (3% à 15 jours), elles pourraient être utilisées comme indicateurs plus rapidement détectables (et donc significatifs) dans les temps de dégradation initiaux.

4.1.6.2. Chromatogrammes des extractibles du bois de Pin dégradé par *P. placenta*

Les extractibles de l'aubier de pin sont composés d'acides résiniques, acides gras à longues chaînes libres, de triglycérides, de stérols et de composés phénoliques. Le programme d'élution des extractibles d'aubier de pin a été celui utilisé pour le hêtre et a conduit au chromatogramme ci-dessous (figure 87).

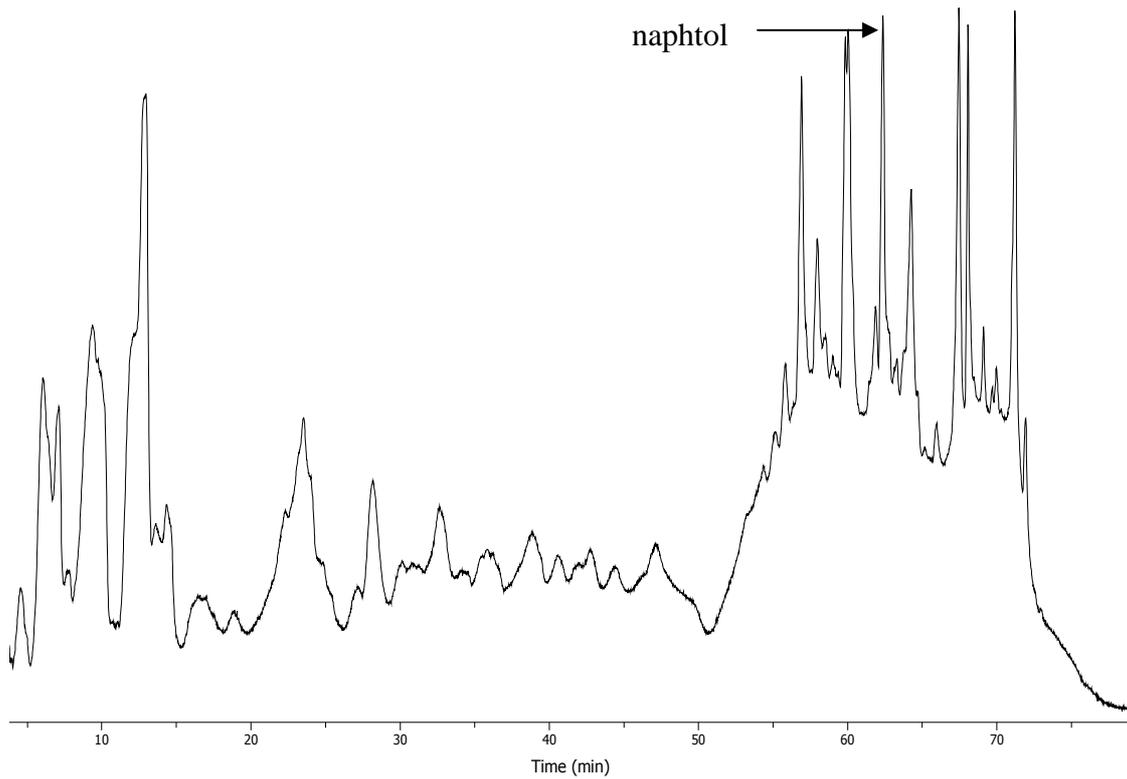


Figure 87 :Chromatogramme des extractibles d'aubier de pin non dégradés

Deux fractions principales de composés ont été mises en évidence et globalement identifiées :

- la première située entre 5 et 30 minutes est constituée de composés phénoliques
- la seconde entre 55 et 75 minutes comprend des composés lipophiles dont l'acide abiétique à 67 minutes.

L'évolution des extractibles durant la dégradation est présentée dans les figures 88 à 90 avec les extraits d'échantillons correspondants à certains témoins et aux blocs traités avec le propiconazole.

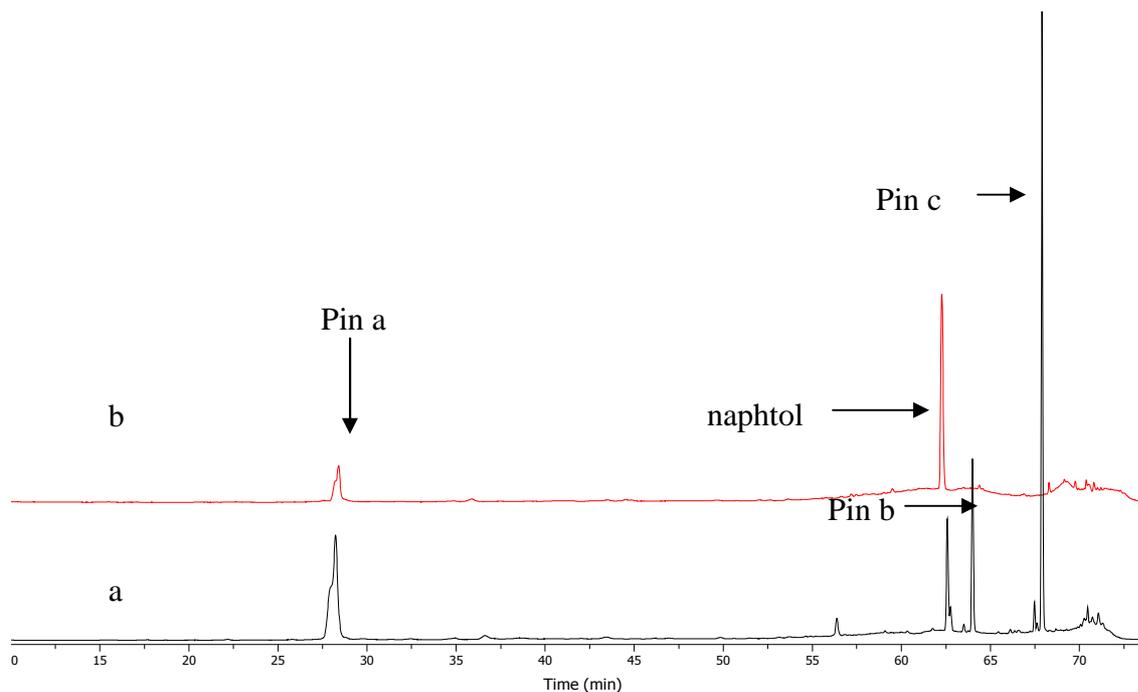


Figure 88 : chromatogrammes des échantillons témoins après 15 (a) et 30 (b) jours

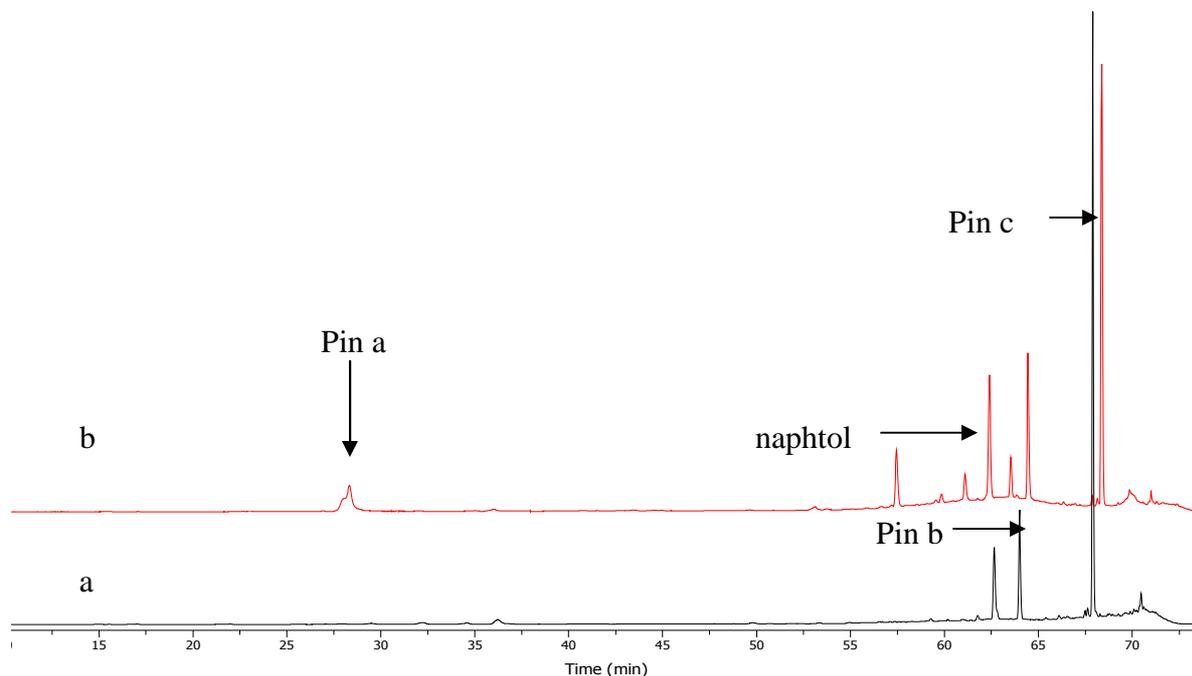


Figure 89 : chromatogrammes des échantillons traités avec le propiconazole à $10^{-4}M$ après 15 (a) et 30 (b) jours

On note en général, l'apparition de nouveaux composés avant et après le naphtol qui sort lui à 63 minutes. L'apparition puis la diminution des pics voir disparition de pics des échantillons témoins et traités avec du propiconazole à $10^{-4}M$, laisse penser à de possibles conversions

d'extraits durant cette dégradation. Dans les premiers jours de colonisation, un composé majoritaire apparaît à 67 minutes et disparaît après 30 jours de dégradation dans les échantillons témoins. Les spectres UV de certains pics sont présentés figure 90.

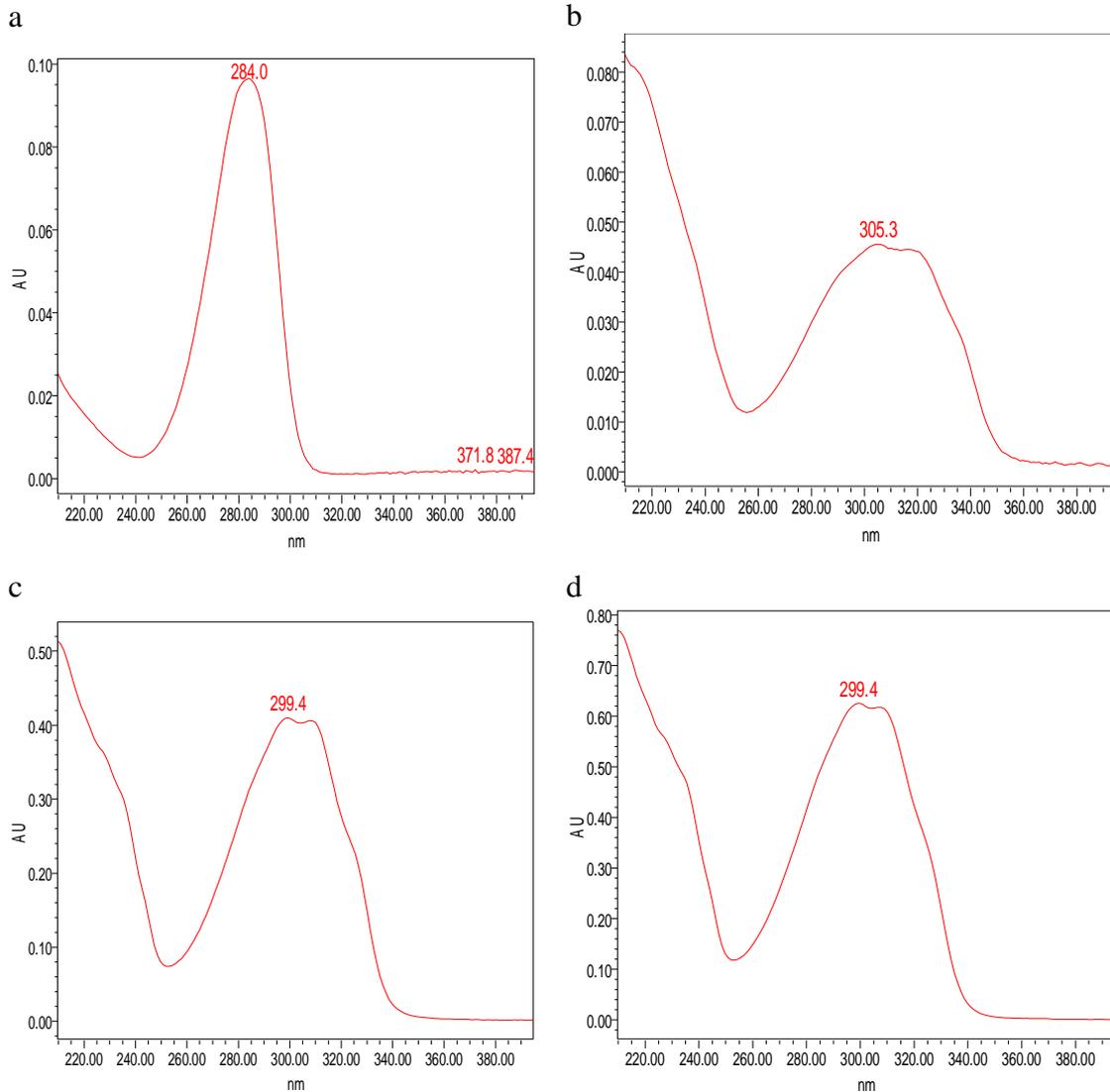


Figure 90 : spectres UV des produits de dégradation du bois de pin par *P. Placenta* : pin a (a), composé à 58 minutes (b), pin b (c), pin c (d)

Les composés apparus n'ont pas pu être identifiés, l'analyse par GC/MS s'avérerait ici primordial, les maximums d'absorption indiquant des structures apparemment caractéristiques.

Les extractibles des éprouvettes protégées avec le propiconazole à 10^{-2} M présentent un chromatogramme très différent de celui des extraits dégradés (figure 91).

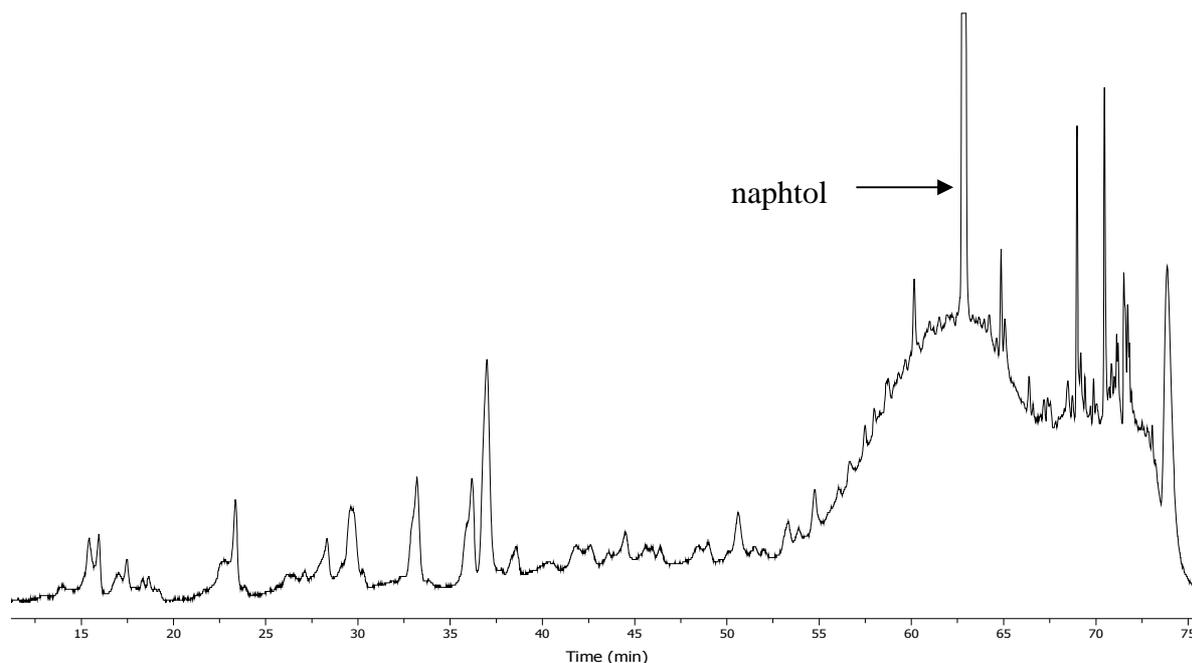


Figure 91 : chromatogrammes des échantillons traités avec le propiconazole à 10^{-2} M après 15 et 30 jours

Par contre, il n'est pas totalement identique à celui du témoin non dégradé à par certaines zones dans lesquelles on retrouve les même composés au vu de leur spectres UV et de leurs temps de rétentions. Les extraits lipophiles autour du naphtol ont disparu alors que de nouveaux composés sont apparus composés entre 30 et 40 minutes. La variation des extractibles lipophiles d'échantillons protégés, laisse supposer d'éventuels phénomènes d'oxydations des composés initiaux malgré les faibles pertes de masse.

4.1.6.3. Evolution de quelques composés durant la dégradation du bois de Pin par *P. placenta*

Les figures 92, 93 et 94 montrent l'évolution des quantités des composés Pin a, Pin b et Pin c apparaissant durant la colonisation et dégradation du bois de pin par *Poria placenta*.

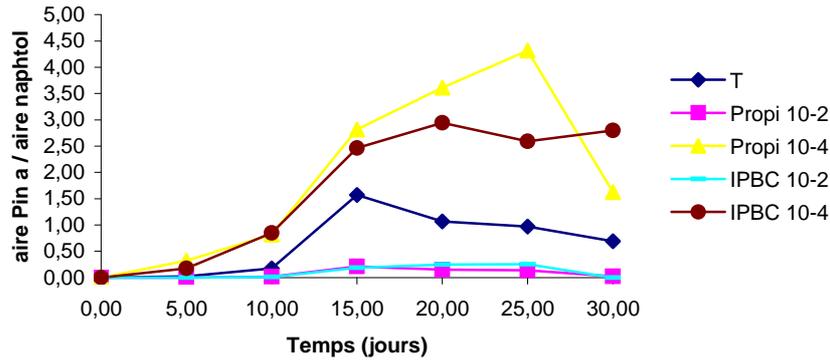


Figure 92: Evolution du facteur de réponse des composés: aire composé Pin a / aire naphthol lors de la dégradation du bois de hêtre par *P. placenta*

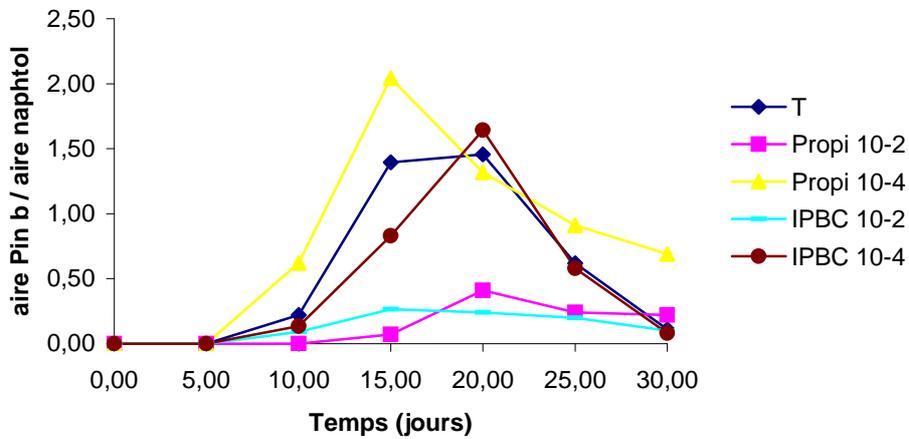


Figure 93: Evolution du facteur de réponse des composés: aire composé Pin b / aire naphthol lors de la dégradation du bois de hêtre par *P. placenta*

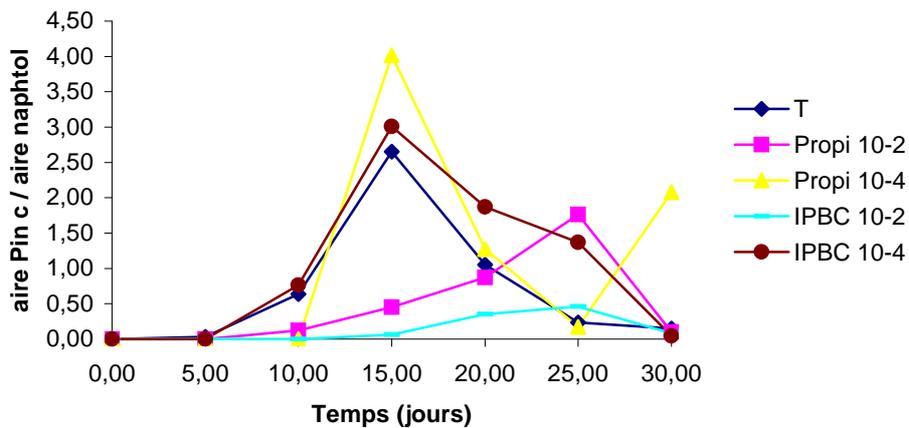


Figure 94: Evolution du facteur de réponse des composés: aire composé Pin c / aire naphthol lors de la dégradation du bois de hêtre par *P. placenta*

Pour les composés Pin a et b (figures 92 et 93), l'évolution est similaire avec une augmentation importante à 15 ou 20 jours des quantités détectées en cas de dégradation et un niveau plutôt constant pour les éprouvettes correctement protégées. Ce comportement permettrait donc d'utiliser Pin a et b comme marqueurs de la dégradation fongique, d'autant plus que leurs signaux augmentent de manière très significative avant que la perte de masse n'atteigne 3%.

L'analyse des dosages du composé Pin c semble plus difficile étant donné que, quelque soit le traitement subi, les échantillons montrent un accroissement puis une diminution du signal correspondant, la différence portant sur la vitesse d'apparition du composé Pin c qui est d'autant plus rapide que l'éprouvette n'est pas protégée. Pin c pourrait donc constituer un marqueur de l'activité métabolique du champignon plutôt qu'un critère fiable annonçant le niveau de dégradation du matériau.

4.1.7. Conclusions

Dans cette première partie, l'objectif était d'identifier des molécules extractibles du bois, caractéristique de sa dégradation par des champignons de pourritures, afin d'essayer de mettre au point une méthode d'analyse rapide par HPLC des résultats de divers traitements de préservation sur la durabilité du matériau bois. Il a donc été nécessaire de préciser les conditions d'échantillonnages des extraits, de séparation et détection par chromatographie liquide à haute pression de composés détectables par spectroscopie UV et de s'assurer qu'il existait bien une corrélation entre les dosages de ces marqueurs et la perte de masse concomitante ou future des éprouvettes considérées.

L'objectif a été atteint dans le cas du bois de hêtre dégradé par *T. versicolor*, le dosage de la catéchine permettant de différencier les éprouvettes de bois qui présenteront une perte de masse importante de celles qui resteront préservées. La tentative de généralisation de ce résultat à des pourritures brunes a été moins convaincante, mettant en lumière la difficulté de trouver un seul « marqueur universel » valable pour toutes les essences et toutes les souches fongiques. L'acide syringique et un autre composé qu'il reste à identifier se sont montrés les meilleurs marqueurs potentiels dans ces conditions.

Avec *G. Robusta*, les dosages d'extractibles disparaissant lors de la dégradation s'est révélée peu efficace, l'apparition de composés inconnus mais néanmoins caractéristiques de par leur absorbance en UV s'est avérée plus pertinente.

Enfin, la corrélation entre les pertes de masses d'échantillons de Pin Sylvestre et la quantité de certains produits de dégradation qu'il reste à caractériser, semble intéressante dans l'optique de décrire des marqueurs de dégradation.

Ces résultats restent toutefois incomplets puisque l'étape ultime de validation de la méthode d'évaluation proposée ici, c'est-à-dire la corrélation entre les dosages et les pertes de masses après 12 ou 16 semaines de dégradation, n'a pas encore été menée à bien.

La détermination structurale des composés inconnus pouvant jouer le rôle de marqueur constituerait également une suite logique et intéressante à ces travaux

4.2. Comportement des polysaccharides du bois lors du traitement thermique

4.2.1. Introduction

La préservation d'essences peu durables implique généralement le recours à des biocides à large spectre d'activité imprégnés au cœur du bois. De tels procédés sont de plus en plus surveillés étant donné leur impact sur l'environnement, et leur usage pourrait bientôt être considérablement restreint. De plus, sous l'effet des pressions environnementales de plus en plus importantes dans la plupart des pays européens, on observe un changement d'attitude important quant à l'usage des biocides dans le domaine du traitement du bois, justifiant le recours à de nouvelles alternatives. Parmi ces alternatives, le traitement thermique du bois par pyrolyse douce a fait l'objet de nombreuses recherches. Plus durable, le bois traité thermiquement devient également plus stable dimensionnellement. Il voit en revanche sa couleur modifiée prenant une teinte plus sombre et devient plus fragile mécaniquement. Bien que de nombreuses études aient été consacrées à la compréhension des phénomènes impliqués dans l'augmentation de la durabilité, il existe actuellement encore certaines interrogations. En effet, pratiquement toutes les études réalisées sur des bois d'origine industrielle ne présentent pas de données précises sur la conduite du traitement thermique ou, des paramètres essentiels comme la perte de masse due au traitement est rarement disponible. Ce manque d'information est lié aux contraintes techniques rencontrées lors du traitement au cours duquel le bois ne peut pas être directement utilisé sec, impliquant l'utilisation de bois renfermant initialement une certaine teneur en humidité, qui de surcroît peu varier d'une essence à l'autre.

Des travaux précédents menés au laboratoire, ont montré une importante corrélation entre l'intensité du traitement et la durabilité du bois vis à vis de *Trametes versicolor*, champignon lignivore de la pourriture blanche utilisé comme modèle. Dans son travail de thèse, Mohamed Hakkou a mis en évidence que le caractère hydrophobe du bois qui change brutalement aux alentours de 160°C, ainsi que la génération d'extraits lors du traitement pouvant jouer le rôle de biocides avaient peu d'effet sur l'augmentation de la durabilité. En revanche, les pertes de masse consécutives aux réactions de dégradation des constituants macromoléculaires du bois étaient très fortement corrélées à la durabilité (figure 96).

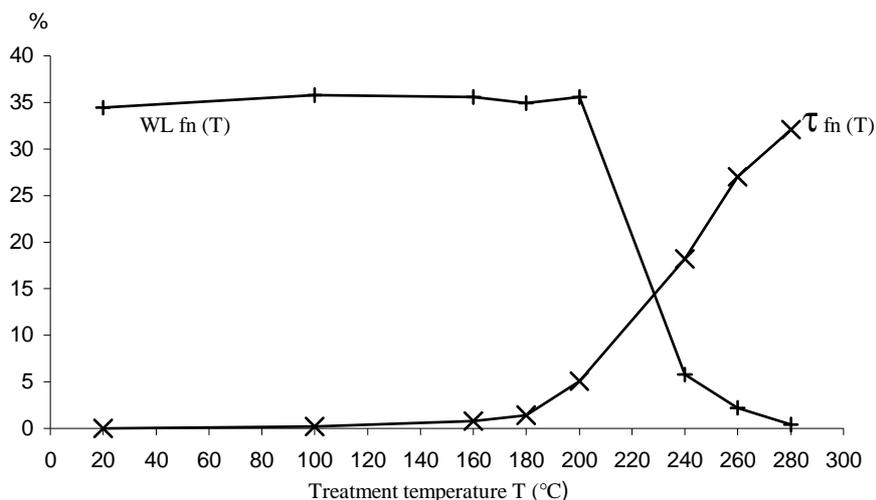


Figure 96. Corrélation entre les pertes de masse dues au traitement thermique (□) et celles dues à l'action de *Trametes versicolor* (WL) (Hakkou, 2006)

Sachant que ces pertes de masse sont fortement dépendantes des conditions opératoires utilisées lors du traitement (figure 97, Pétrissans et al., 2007), et que quelques dizaines de degrés de différence peuvent avoir des conséquences importantes sur les réactions et la vitesse de dégradation du matériau, il nous a semblé primordial de reprendre ces résultats en nous penchant sur l'évolution de la composition chimique des polysaccharides constitutifs du bois rapportés pour être les constituants les plus instables lors de ce type de traitements.

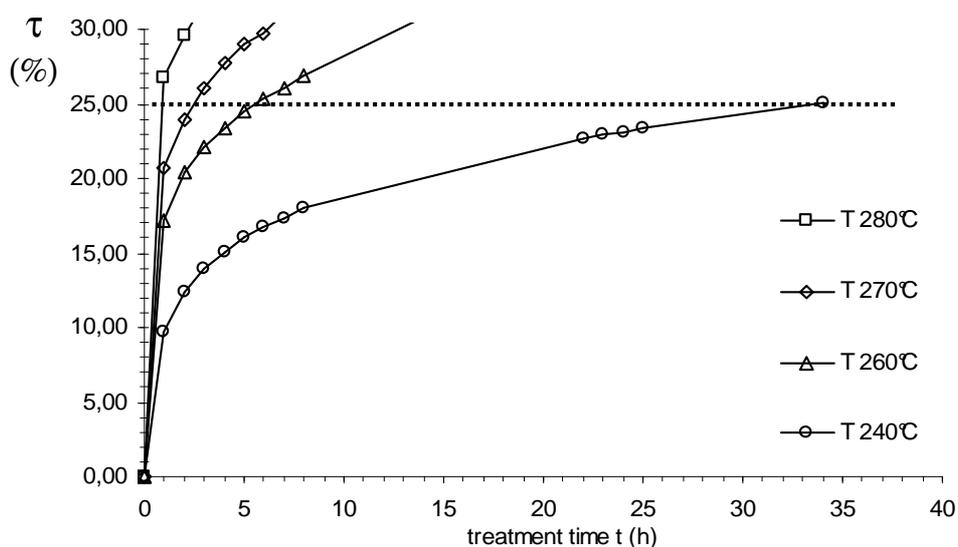


Figure 97. Effet de la température de traitement sur les cinétiques de dégradation du bois (Pétrissans et al., 2007)

4.2.2. Analyse HPLC des monosaccharides constitutifs des polysaccharides du bois

Différentes études ont été réalisées sur l'évolution de la composition des polysaccharides du bois suite au traitement thermique.

Boonstra et Tjeerdsma (2006) ont mis en évidence une diminution de la teneur en hémicelluloses suite au procédé de traitement PLATO. Cette diminution est corrélée aux conditions de traitement aux cours desquelles, la phase d'hydrothermolyse est réalisée à 165 ou 185°C, et la phase de durcissement finale réalisée à 180°C. Dans cette étude, seuls les taux globaux d'holocellulose, d'alpha cellulose et de lignine ont été déterminés.

Yildiz et al. (2006) rapportent une étude au cours de laquelle, la température de traitement (130 à 200°C) et le temps de traitement (2 à 10 heures) ont été étudiés. Les résultats également basés sur l'analyse des fractions d'holocellulose, de cellulose et de lignine montrent une diminution importante de la fraction holocellulose, quand la température ou la durée de traitement augmente. Dans le même temps, le taux de lignine augmente jusqu'à pratiquement 40%, alors que le taux de cellulose diminue légèrement ou reste constant selon les conditions utilisées.

La quantification et la caractérisation des unités osidiques simples constitutives des polysaccharides ont fait l'objet de quelques études. Alén et al. (2002) rapportent un travail au cours duquel, ils ont analysé par GC après silylation, la composition de la fraction soluble obtenue après hydrolyse acide, de différents échantillons de bois traités en présence de vapeur d'eau, pour des durées de 2 à 8 heures et des températures de 180 à 225°C. Les résultats obtenus montrent une augmentation du rapport glucose/ monosaccharides totaux, en fonction du temps de traitement et de la température. Une autre étude réalisée par Gosselink en 2004, indique les mêmes tendances sur des bois traités à 275°C pendant 15 min, et présentant des pertes de masse de l'ordre de 13%. Dans ces conditions, l'analyse par chromatographie gazeuse des sucres simples dérivés sous forme d'acétate, indique une forte diminution de tous les oses simples à l'exception du glucose, qui voit sa quantité seulement légèrement diminuer. Repellin et Guyonnet (2005), tout comme Windeisen et al. (2007), rapportent quant à eux des études dans lesquelles l'analyse des sucres simples a été réalisée soit par HPLC, soit par GC. Cependant, les résultats présentés ne le sont que de manière relative, montrant simplement l'évolution de quelques sucres, sans toujours donner de résultats sur les quantités absolues de tous les sucres présentes dans le bois, ni de les corréler à des pertes de masse lors du traitement. Les tendances observées restent toutefois les mêmes que précédemment, avec une

diminution de la quantité des différents oses constitutifs des hémicelluloses relativement au glucose.

4.2.2.1. *Mise au point des conditions d'hydrolyses*

Avant d'analyser la nature des sucres des polysaccharides constitutifs du bois traité thermiquement, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'analyse des sucres présents dans le bois de hêtre non traité. Contrairement à de nombreux auteurs utilisant la méthode Tappi standard T222-om-88, ou une variante de cette dernière impliquant l'utilisation d'un autoclave à 120°C pour réaliser l'hydrolyse (Karr et al., 1991 ; Rowell et al., 2005 ; Irbe et al., 2006), nous avons effectué l'hydrolyse dans un ballon équipé d'un réfrigérant placé dans bain d'huile à 120°C. Différentes conditions d'hydrolyse ont été envisagées en adaptant la méthode d'hydrolyse par H₂SO₄ (72%) proposée par Karr et al. (1991). L'hydrolyse est réalisée en deux étapes. Une première étape de pré-hydrolyse en présence d'acide sulfurique concentré, suivie d'une seconde étape d'hydrolyse après dilution avec de l'eau distillée et chauffée. Pour cette mise au point des conditions d'hydrolyse des polysaccharides, seuls le glucose et le xylose qui représentent les deux principaux monosaccharides présents dans le bois de hêtre ont été dosés. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 13.

Tableau 13. Effet des conditions d'hydrolyse sur la détermination des taux de lignine de glucose et de xylose du bois de hêtre

Echantillon	Conditions d'hydrolyse	Lignine de Klason(%)	Glucose(%)	Xylose(%)
Hêtre	t.a., 1h / reflux, 1h	22,9 ± 0,5	17,5 ± 0,3	9,7 ± 0,3
Hêtre	t.a., 1h / reflux, 2h	23,0 ± 0,4	24,7 ± 0,1	13,4 ± 0,1
Hêtre	t.a., 1h / reflux, 3h	22,5 ± 0,5	31,5 ± 0,6	14,9 ± 1,1
Hêtre	t.a., 1h / reflux, 4h	22,7 ± 0,4	44,0 ± 0,4	14,2 ± 0,3
Cellulose	t.a., 1h / reflux, 2h	-	55,5 ± 0,4	-
Cellulose	t.a., 1h / reflux, 3h	-	74,8 ± 0,5	-
Cellulose	t.a., 1h / reflux, 4h	-	82,0 ± 1,1	-
Cellulose	t.a., 1h / reflux, 5h	-	55,5 ± 0,6	-

t.a. = température ambiante

D'après la littérature (Fengel et Wegener, 1984), la composition chimique du bois de hêtre est de 24% de lignine, 49 % de cellulose, 25% d'hémicelluloses et 2% d'extractibles. Ces

pourcentages peuvent varier légèrement en fonction des auteurs, des échantillons et des méthodes utilisées (Yilgor et al., 2001 ; Solár et al., 2007). La quantité globale de glucose devrait donc se situer aux alentours 49% et celle du xylose, principal constituant des glucuronoxylanes de feuillus, aux alentours de 20 %. Des teneurs en xylose de 15% à 18% ont également été rapportées dans la littérature (Yilgor et al., 2001 ; Solár et al., 2007). Dans tous les cas le rapport relatif de la quantité de xylose / quantité de glucose devrait être voisin de 1/3.

L'analyse des résultats obtenus montre que dans tous les cas, le taux de lignine est relativement constant et reproductible quelles que soient les conditions d'hydrolyse utilisées. Ces dernières influencent de façon importante les quantités de glucose et de xylose analysées. Pour des temps d'hydrolyse croissants de 1 à 4 heures, on observe une augmentation de la quantité de glucose qui atteint pratiquement les 49% théoriques. La quantité de xylose augmente jusqu'à 3 heures pour atteindre pratiquement 15%, puis diminue légèrement à partir de 4 heures traduisant probablement une dégradation de ce dernier dans des conditions trop dures d'hydrolyse. Aux vues de ces résultats, les conditions optimales d'hydrolyse de la sciure du bois de hêtre, correspondent à une pré-hydrolyse pendant 1 heure en présence d'acide sulfurique concentré, suivi d'une hydrolyse en milieu dilué et chauffé pendant 4 heures. La quantité de matière manquante pour obtenir 100%, est attribuables aux autres sucres neutres et acides uroniques non dosés, ainsi qu'à de possibles pertes dues à une hydrolyse incomplète ou à la dégradation aisée des monosaccharides en milieu acides.

Des essais réalisés dans les mêmes conditions sur de la cellulose, indiquent également un optimum pour le temps d'hydrolyse. En dessous de 4 heures, l'hydrolyse est incomplète alors que pour des temps supérieurs à 5 heures, on observe un début de dégradation du glucose.

4.2.2.2. Evolution des composants du bois de hêtre durant la pyrolyse douce

Après avoir mis au point les conditions expérimentales d'hydrolyse sur la sciure de hêtre non traité, nous avons entrepris l'analyse d'échantillons de bois traités thermiquement à différentes températures. Pour cela, nous avons étendu notre gamme d'analyse aux principaux hexoses (glucose, mannose, galactose, arabinose et rhamnose) et pentoses (xylose et arabinose) potentiellement présents dans le bois. Du fait des conditions d'analyses utilisées (colonne aminée), les acides uroniques n'ont pas été analysés. Les figures 98 et 99 décrivent l'allure des chromatogrammes obtenus après optimisation des conditions d'analyse.

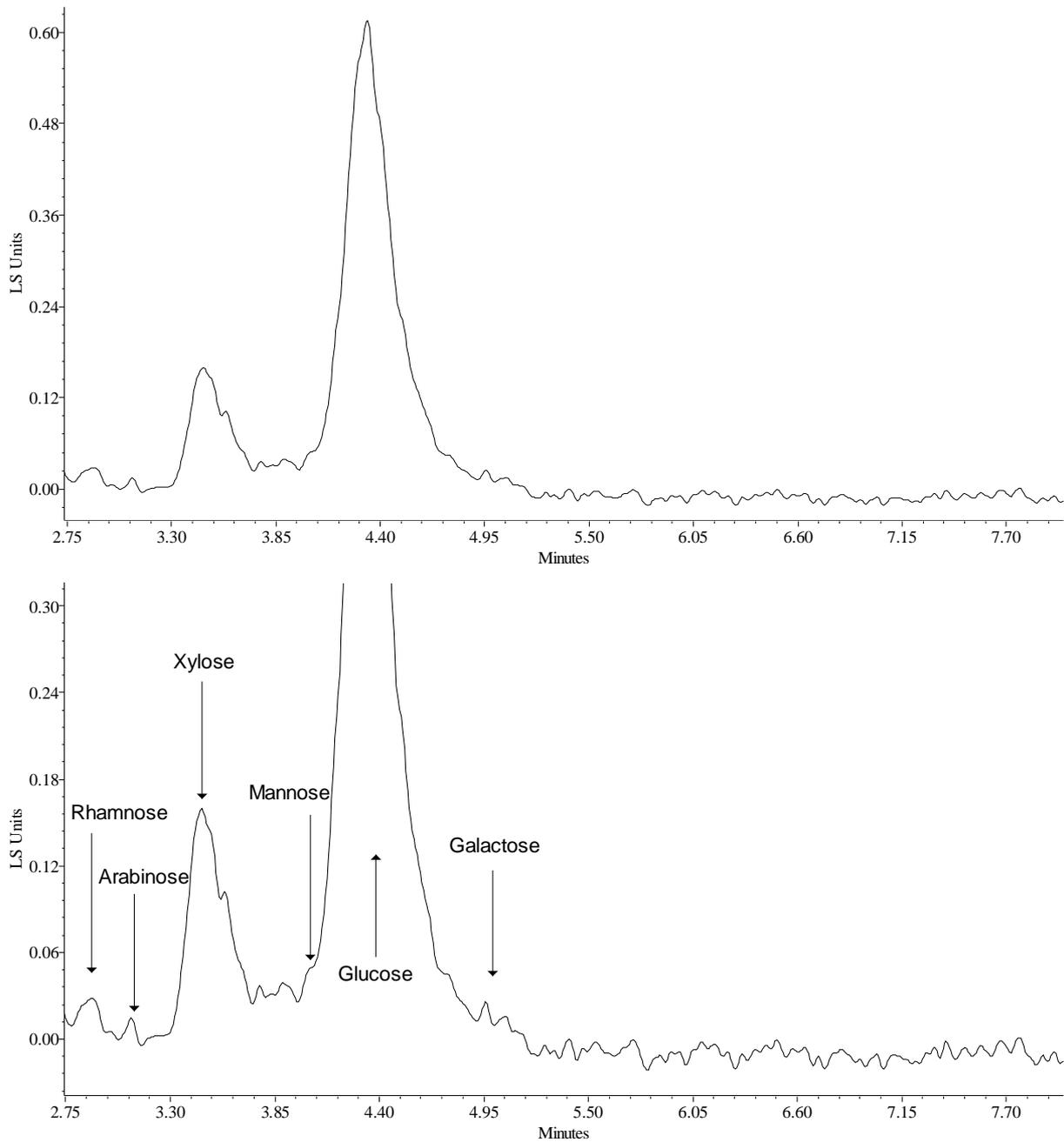


Figure 98 : Chromatogramme montrant la séparation des différents monosaccharides après hydrolyse d'un échantillon de hêtre. Discovery LC-NH₂ (250 mm x 4.6 mm i.d.), 30°C, acétonitrile / eau / méthanol (78/20/2) v/v, 1.5 mL.min⁻¹

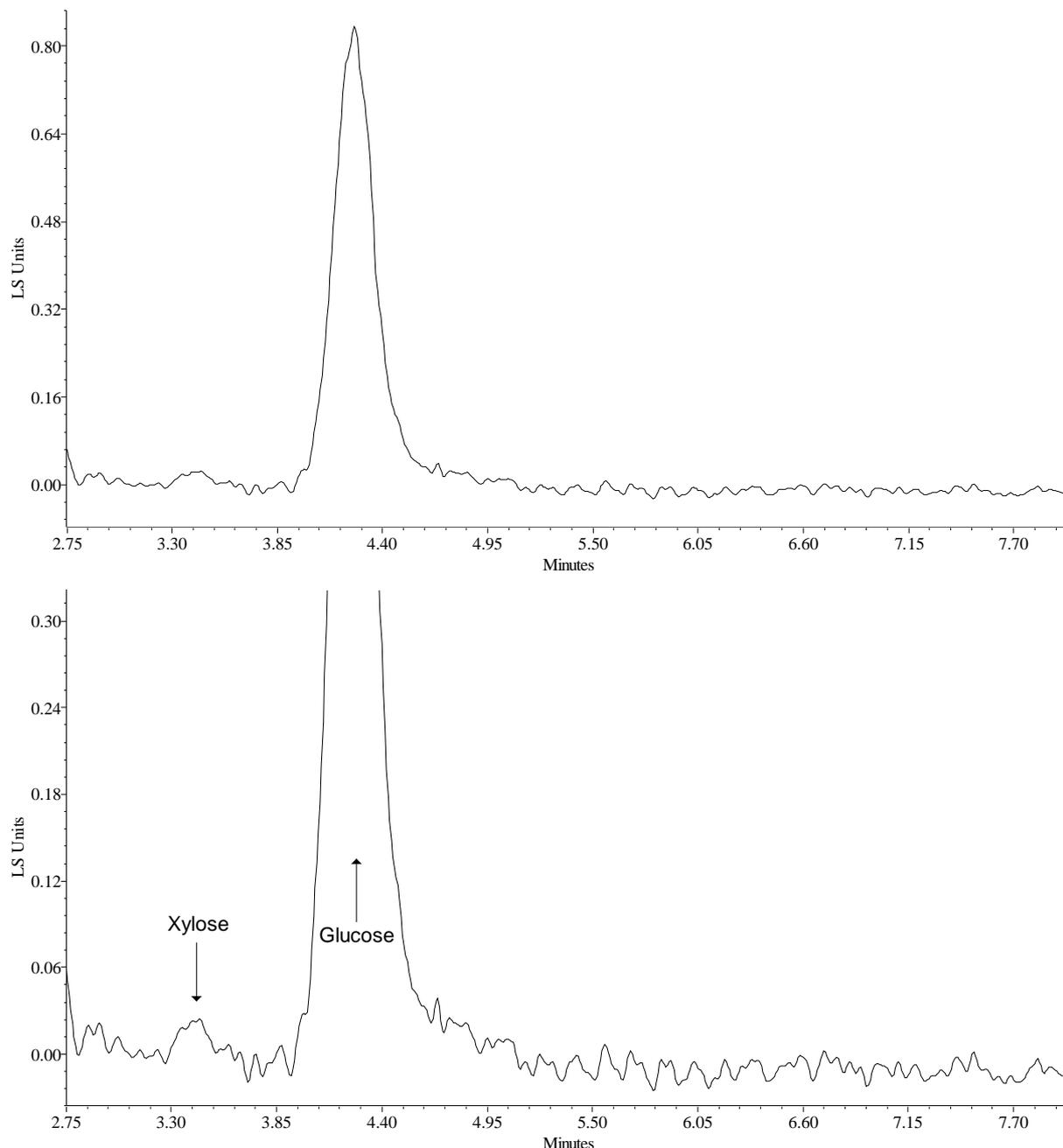


Figure 99 : Chromatogramme montrant la séparation des différents monosaccharides après hydrolyse d'un échantillon de hêtre traité à 240°C pendant 8 heures. Discovery LC-NH₂ (250 mm x 4.6 mm i.d.), 30°C, acétonitrile / eau / méthanol (78/20/2) v/v, 1.5 mL.min⁻¹

La séparation des différents monosaccharides est d'une manière générale assez bonne, à l'exception du glucose et du mannose dont les signaux sont difficiles à séparer. Le mannose reste toutefois un sucre très minoritaire, et l'intégration globale du signal a été assimilée à la quantité de glucose. Dans certains cas, il est également possible de détecter des quantités plus ou moins importantes de cellobiose, qui apparaît pour des temps de rétention supérieurs à

ceux des monosaccharides. La quantité dosée est rajoutée à la quantité de glucose dosée directement. La composition chimique de différents échantillons de hêtre traités à 240°C pendant des durées plus ou moins importantes, est rapportée dans le tableau 14.

Tableau 14 : Composition chimique des échantillons de hêtre traités à 240°C

Temps de traitement (heures)	0	0,75	1,5	5	17,5	30	>30
Pertes de masses(%)	0	6,4	9,7	14,9	20,3	24,8	30,7
Lignine de Klason (%)	23,4	25,8	29,4	35	37,7	40,9	42,1
Holocellulose (%) ¹	76,6	74,2	70,6	65	62,3	59,1	57,9
Glucose (%) ²	47,3	46,9	46,1	44,8	40	38	37,6
Xylose(%)	16,2	14,5	11,2	10,6	1,3	0	0
Galactose(%)	2,7	2,4	1,9	1,2	0,3	0	0
Rhamnose(%)	1	0,6	0,2	0	0	0	0
Arabinose(%)	1,2	0,7	0,3	0	0	0	0
∑ des monosaccharides (%)	68,4	65,1	59,7	56,6	41,6	38	37,6
Monosaccharides / Holocellulose	0,89	0,88	0,84	0,86	0,67	0,64	0,65

¹ obtenu par différence avec le taux de lignine de Klason

² quantité de glucose est légèrement surestimée du fait de la présence de mannose

Au cours du traitement thermique, on observe une diminution du taux d'holocellulose présente dans le bois. Parallèlement, la teneur en lignine de Klason augmente progressivement pour atteindre dans les conditions les plus dures, des valeurs supérieures à 40%. Dans tous les cas, ces variations sont directement liées à la sévérité des conditions de traitement utilisées. Ces observations rejoignent ce qui est habituellement décrit dans la littérature pour des gammes de température comprises entre 180°C et 250°C, dans lesquelles les réactions de dégradation survenant lors du traitement thermique, sont principalement attribuées à la dégradation des hémicelluloses moins stables que la cellulose et la lignine (Kotilainen 2000, 2001 ; Alén et al., 2002 ; Thermo Wood Handbook 2003 ; Boonstra et al., 2006 ; Yildiz et al., 2006). On observe une corrélation assez bonne entre les pertes de masses des échantillons et le taux global d'holocellulose mesuré (figure 100).

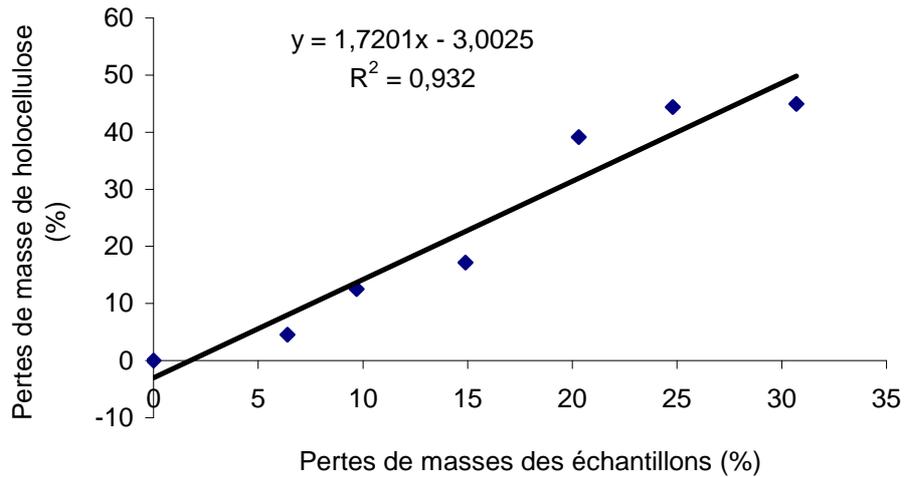


Figure 100 : Evolution des pertes de masses d’holocellulose en fonction des pertes de masses des échantillons durant le traitement thermique à 240°C

Ces résultats traduisent la plus grande instabilité de la fraction polysaccharidique du bois, comparativement à la lignine et corroborent les résultats rapportés par Alén et al. (2002). L’évolution des proportions relatives des différents monosaccharides en fonction des conditions de traitement est rapportée dans la figure 101.

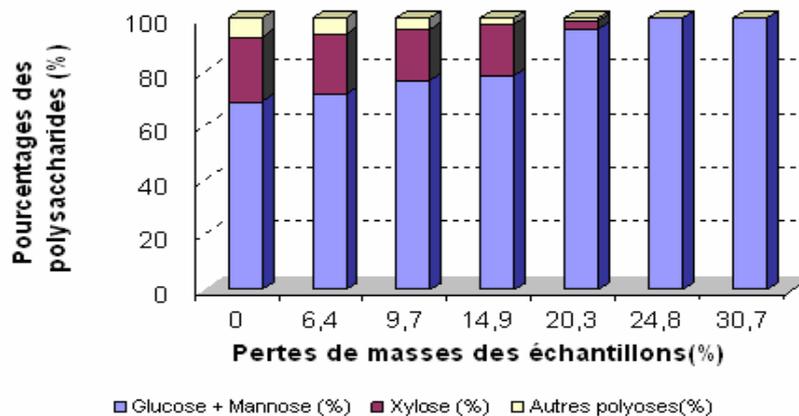


Figure 101 : Evolution des proportions relative de monosaccharides au cours du traitement thermique

Les résultats sont similaires à ceux rapportés par Repellin et Guyonnet (2005) et Windeisen et al. (2007) qui décrivent l'évolution des unités osidiques obtenues après hydrolyse acide de façon relative, sans préciser l'évolution de la quantité absolue de ces constituants. Le traitement thermique conduit à une disparition du xylose et autres monosaccharides constitutifs des hémicelluloses au bénéfice du glucose, qui devient le seul sucre détectable du fait de la plus grande stabilité de la cellulose. Cependant, ces résultats basés sur des comparaisons relatives entre les différentes unités osidiques doivent être interprétés avec précautions. En effet, même si le glucose devient le seul sucre détectable après traitement thermique, traduisant sans contestation possible la plus grande stabilité de la cellulose par rapport aux hémicelluloses, ce type de présentation des résultats ne permet pas de conclure quant à la stabilité réelle de la cellulose lors du traitement thermique. Une analyse plus fine de l'évolution des monosaccharides en fonction du temps, indique la quantité de chacun de ces derniers diminue suite au traitement thermique (figure 102).

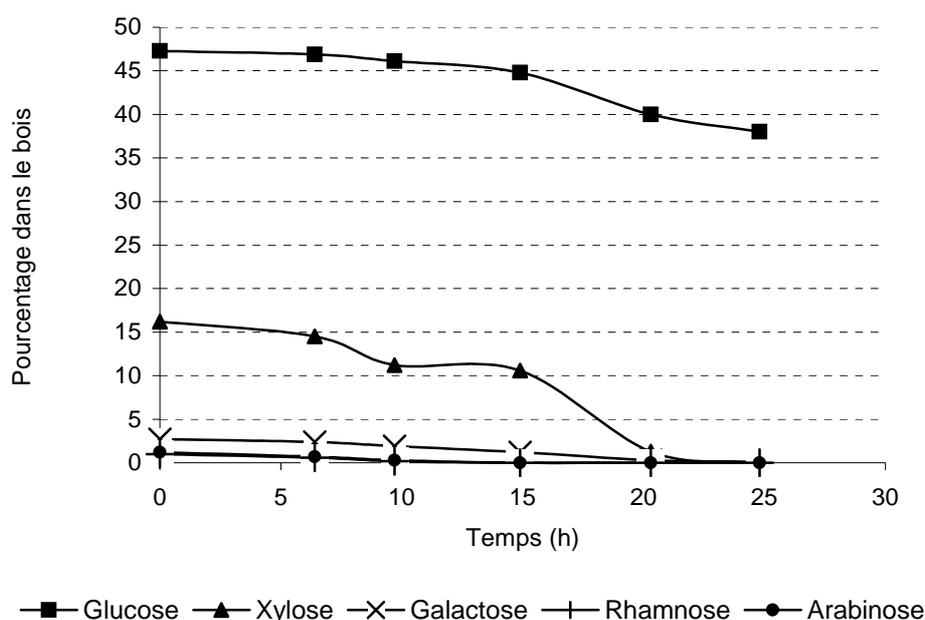


Figure 102 : Evolution du pourcentage des différents monosaccharides en fonction du temps de traitement

Bienqu'il soit généralement décrit et admis que les hémicelluloses soient les constituants les plus sensibles lors du traitement thermique, il apparaît clairement aux vues des courbes précédentes que le taux de cellulose diminue également en fonction du temps de traitement. En effet, même si la diminution des taux de xylose, galactose, arabinose et rhamnose,

principaux constituants des hémicelluloses, semble plus rapide que celle du glucose, la diminution du taux de glucose tout au long du traitement thermique, indique une dégradation progressive de la cellulose dans les conditions opératoires utilisées, même si cette dernière peut être légèrement minimisée due à la présence du mannose sous le pic du glucose. Pour une température de 240°C, il apparaît donc clairement que le temps de traitement joue un rôle beaucoup plus important que prévu sur les propriétés du matériau. Cette dégradation, plus lente que celle des hémicelluloses, est attribuable à la dégradation de la cellulose amorphe, alors que la cellulose cristalline moins réactive que la précédente, serait plus stable dans ces conditions. Ces résultats peuvent expliquer l'augmentation du taux de cristallinité de la cellulose généralement observé suite au traitement thermique (Tjeerdsma et al., 1998 ; Wikberg et Maunu 2004 ; Hakkou et al., 2005). L'évolution du rapport Monosaccharides totaux / Holocellulose, indique qu'une partie de la quantité d'holocellulose estimée dans le bois d'après le taux de lignine de Klason, correspond à des produits de dégradation formés lors du traitement thermique. En effet, ce rapport égal en théorie à 1, est de 0,89 dans le cas du hêtre non traité. Si l'on considère le fait que notre dosage ne tient pas compte des acides uroniques non dosés et des motifs acétyle présents sur les chaînes de xylanes, cette valeur est relativement satisfaisante. Le rapport Monosaccharides totaux / Holocellulose diminue progressivement au cours du traitement thermique pour atteindre une valeur de 0,64 après 30 heures de traitement. Ces résultats indiquent une dégradation importante du matériau au delà de la seule dégradation des hémicelluloses, même si la perte de masse de 25 % observée peut correspondre à la quantité d'hémicelluloses présentes initialement dans le bois. De la même manière, les taux de lignine de Klason mesurés confirment la présence de produits de dégradation ou de recombinaison (réticulation ou polymérisation) dans le bois. En effet, si l'on considère que les pertes de masse sont essentiellement dues à la dégradation des hémicelluloses, le taux de lignine de Klason ne devrait pas excéder 33% (1/3 de lignine pour 2/3 de cellulose). Les taux de lignine supérieurs à 40% mesurés lors de nos essais, ou rapportés dans certains travaux de la littérature indiquent sans ambiguïté la formation de produits de dégradation dans le bois et montrent que cette dégradation des hémicelluloses en sous produits volatils, ne sont pas les seules réactions à prendre en compte lors du traitement thermique du bois par pyrolyse douce.

La figure 103 permet de comparer la composition chimique d'échantillons de hêtre traités à 240 ou 250°C durant une même durée de 5 heures ou pour une même perte de masse de 25%.

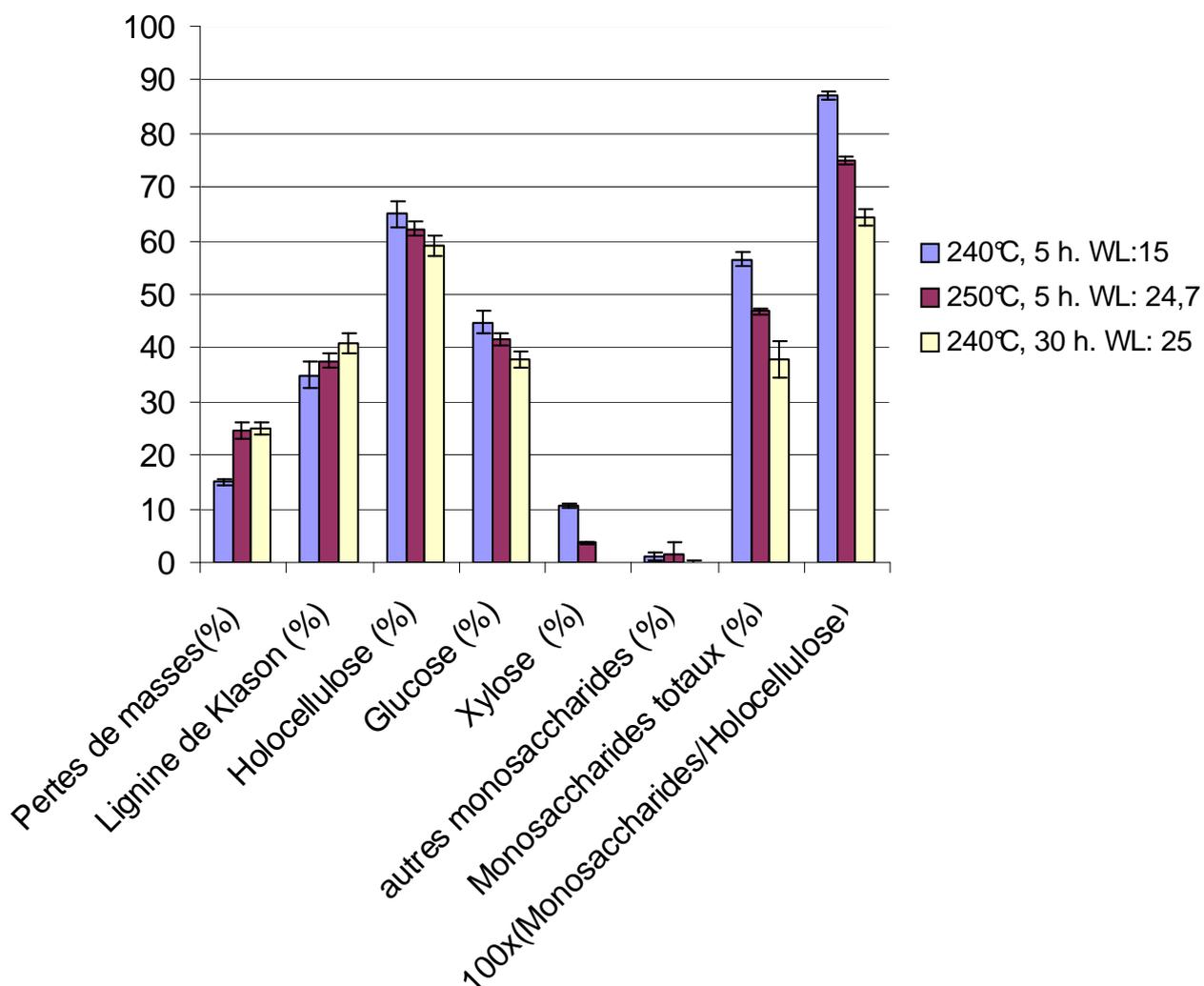


Figure 103 : Comparaison de la composition chimique du bois de hêtre traité à 240 ou 250°C durant une même durée de 5 heures ou pour une même perte de masse de 25%

Pour une durée de traitement identique, les pertes de masse sont considérablement plus élevées à 250°C qu'à 240°C. Le taux de lignine du bois traités à 250°C augmente de 2,5% par rapport à la valeur trouvée à 240°C. La quantité de monosaccharides totaux diminue, et cette baisse est valable pour tout les sucres présents dans le bois.

Pour des pertes de masse équivalentes obtenues pour des temps de traitement différents à 240 ou 250°C, on observe une augmentation importante du taux de lignine pour le traitement

réalisé pendant 30 heures à 240°C. Dans le même temps, on observe une dégradation importante des différents monosaccharides. Le rapport Monosaccharides totaux / Holocellulose proche de 1 dans les échantillons témoins, diminué avec un traitement réalisé à 250°C pendant 5 heures. Mais, cette diminution s'effectue de manière plus intense avec le traitement réalisé à 240°C pendant 30 heures, indiquant une carbonisation importante du bois et ceci, même si la perte de masse de l'échantillon est identique et égale à 25%. Il apparaît donc que la perte de masse d'un échantillon soit un paramètre à utiliser avec précaution en raison des différences de composition chimique pouvant exister entre deux échantillons pour une même perte de masse.

Le même type d'observations peuvent être faites dans le cas d'échantillons traités à 240 et 250°C pour des pertes de masse de 20% (figure 104).

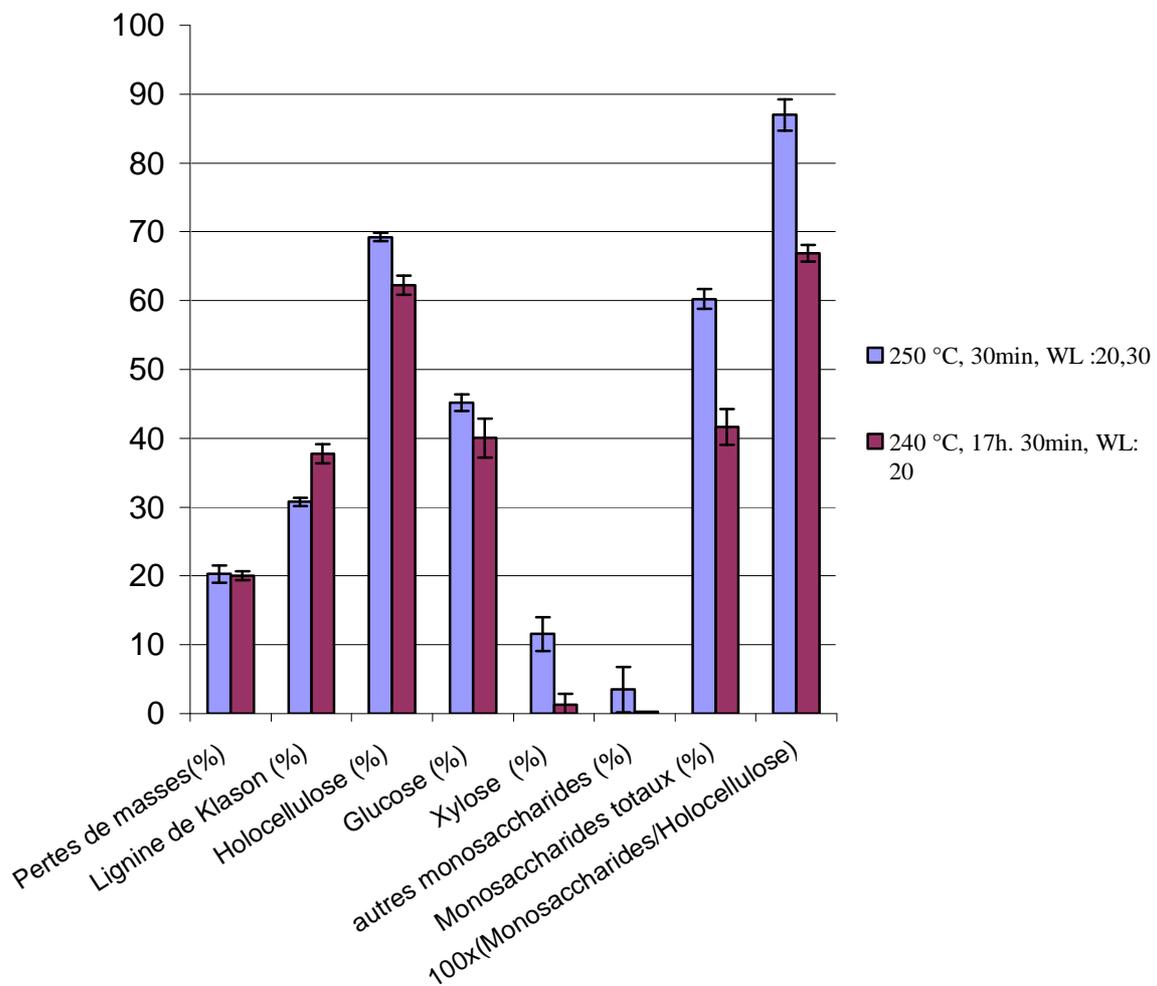


Figure 104 : Comparaison de la composition chimique du bois de hêtre traité à 240 ou 250°C pour une même perte de masse de 20 %

L'utilisation de temps de traitement plus long pour une température moins importante, conduit également à un taux de lignine de Klason plus important associé à une dégradation plus marquée des polysaccharides. Le rapport Monosaccharides totaux / Holocellulose est également plus faible traduisant à nouveau la carbonisation du bois.

4.2.2.3. *Mise en évidence des produits de dégradation par RMN*

L'analyse par RMN du solide de la composition chimique du bois traité thermiquement, a fait l'objet de nombreux travaux (Tjeerdsma et al., 1998 ; Sivonen et al., 2002 ; Wikberg et Maunu 2004 ; Hakkou et al., 2005). Les résultats de ces différentes études mettent en évidence une forte dégradation des hémicelluloses, et des réactions de thermocondensation ou thermoréticulation des lignines, alors que la cellulose ne serait que faiblement affectée. Ces résultats sont corroborés par l'analyse des composés volatils émis lors du traitement indiquant la présence d'acide acétique, de méthanol, de furfural, de 5-methylfurfural et de différents aldéhydes aliphatiques traduisant une dégradation importante des hémicelluloses.

Etant donné, les écarts observés entre les taux de monosaccharides réellement mesurés et ceux estimés d'après les taux d'holocellulose estimés à partir de la mesure de la lignine de Klason, il nous a semblé intéressant de reprendre des études RMN sur la fraction d'holocellulose avant et après traitement thermique. Pour cela, nous avons travaillé sur de la sciure de hêtre, à partir de laquelle nous avons séparé la fraction lignine et la fraction holocellulose, en utilisant respectivement une méthode d'hydrolyse des polysaccharides à l'aide d'acide sulfurique à 72%, ou la méthode d'oxydation de la lignine à l'aide du chlorite de sodium. Chacune de ces fractions a été traitée thermiquement sous azote, dans des conditions similaires aux conditions précédentes puis analysées par RMN du solide. Les résultats obtenus sont rapportés dans les figures 105, 107 et 109.

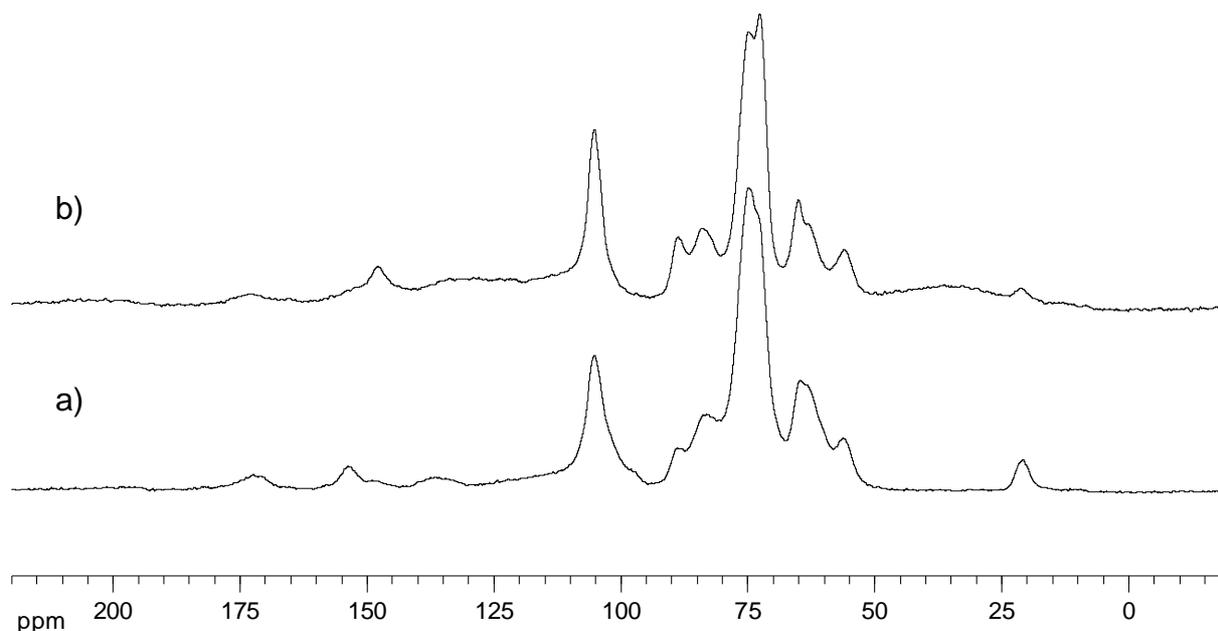


Figure 105 : Spectres RMN ^{13}C CP/MAS de la sciure de hêtre

a) témoin. b) traitée à 240°C pendant 21 heures., perte de masse = 23.6%

La sciure de hêtre témoin, présente les signaux classiquement observés caractéristiques des principaux constituants du bois.

La cellulose apparaît dans la région comprise entre 60 et 105 ppm. Les carbones C2, C3 et C5 de la cellulose apparaissent entre 72 et 75 ppm. Le carbone hémiacétalique C1 présente un signal à 105 ppm. Les signaux à 89 et 84 ppm sont caractéristiques du C4 de la cellulose cristalline et amorphe, respectivement, alors que les signaux à 65 et 62 ppm sont caractéristiques du C6 de la cellulose cristalline et amorphe.

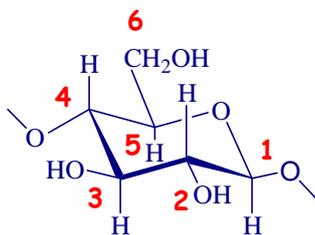


Figure 106 : Numérotation des différents carbones de la cellulose

Les signaux correspondant aux hémicelluloses sont moins visible du fait de leur recouvrement avec ceux de la cellulose largement plus majoritaire dans le bois. On peut toutefois observer un épaulement à 101 ppm, correspondant aux carbones hémiacétaliques des

hémicelluloses et des signaux à 20 et 173 ppm, caractéristiques des groupements acétyle présents sur les glucuronoxyanes.

La lignine apparaît sous la forme de différents signaux assez larges, et peu intenses entre 120 et 160 ppm pour les différents carbones aromatiques, et d'un pic fin assez intense à 56 ppm correspondant aux groupements méthoxyle. Les signaux des carbones aliphatiques des unités phénylpropane, sont difficiles à détecter du fait de leur superposition avec ceux des polysaccharides.

Après traitement thermique, on observe les modifications généralement rapportées dans la littérature. Les signaux des groupements acétyle et l'épaulement à 101 ppm disparaissent, traduisant la dégradation des hémicelluloses. De nouveaux signaux apparaissent dans la zone des carbones aromatiques, et à 35 ppm traduisant les réactions de thermo-réticulation des lignines. L'apparition du signal à 35 ppm, est attribuée à la formation de pont méthylène entre les unités aromatiques de la lignine.

La figure 107 présente l'aspect de la fraction holocellulosique avant et après traitement thermique.

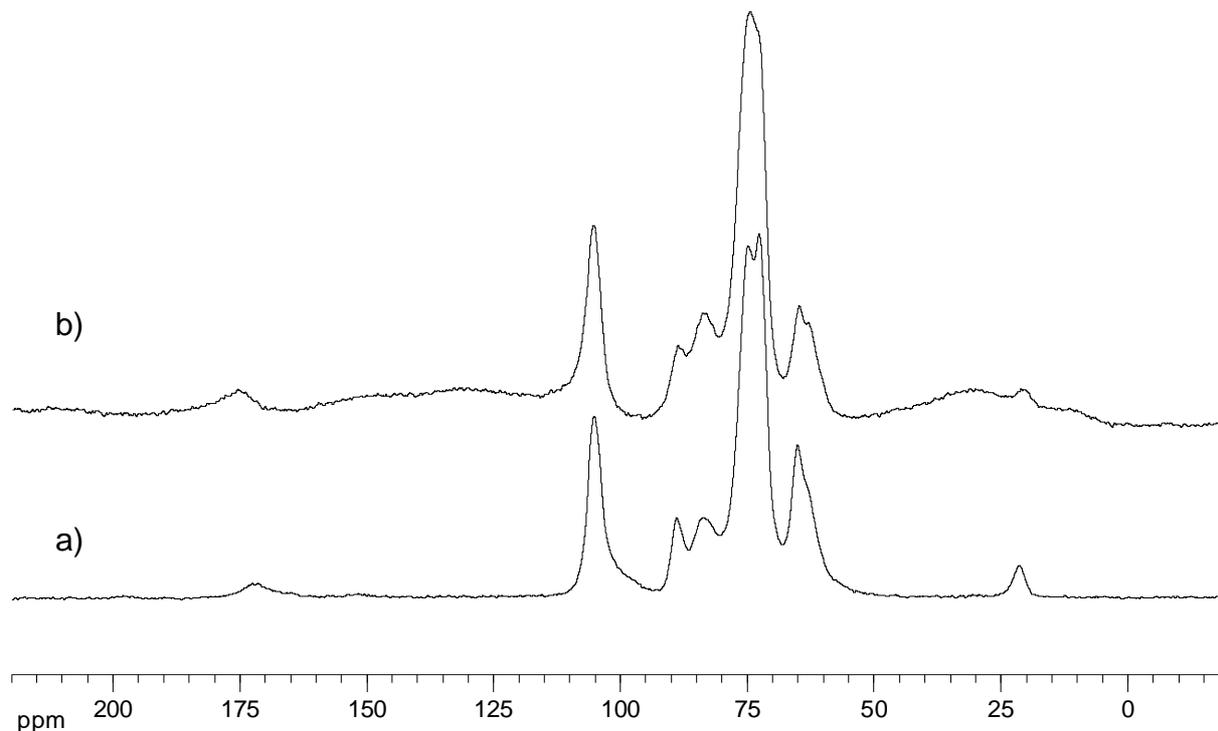


Figure 107 : Spectres RMN ^{13}C CP/MAS de la fraction holocellulose de la sciure de hêtre

a) témoin. b) traitée à 240°C pendant 21 heures., perte de masse = 41%

Avant traitement thermique, on observe les signaux caractéristiques de la cellulose et des hémicelluloses. Les signaux correspondant à lignine, sont totalement absents du spectre de l'échantillon témoin d'holocellulose, indiquant l'efficacité de la méthode de délignification. Après traitement thermique, on observe comme précédemment une diminution des signaux caractéristiques des groupements acétyle des xylanes, ainsi que du signal à 101 ppm caractéristique du carbone hémiacétalique des monosaccharides constitutifs des hémicelluloses. De façon surprenante, le signal à 35 ppm et ceux apparaissant dans la zone des aromatiques attribués jusqu'alors aux réactions de thermo-réticulation des lignines, sont présents dans le spectre de la fraction holocellulose traitée thermiquement. Ces résultats indiquent clairement que des produits de carbonisation se forment dans les conditions de pyrolyse douces utilisées pour traiter le bois thermiquement. Ces nouveaux signaux sont similaires à ceux rapportés par Zawadski et Wisniewski (2002) lors du traitement thermique de la cellulose dans des gammes de températures de 300 à 600°C. Dans les premiers stades de la pyrolyse, ces auteurs rapportent l'apparition de signaux similaires à ceux observés dans notre étude attribués à la formation de carbones aliphatiques, vinyliques et aromatiques. Dans ces conditions, la cellulose subit des réactions de dépolymérisation par transglycosylation, pour conduire après différentes réactions de déshydratation, à des anhydromonosaccharides dont le levoglucosane et la levoglucosenone (figure 108).

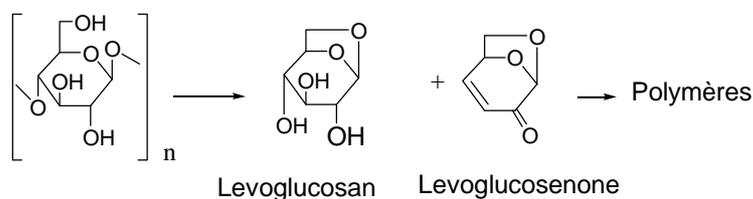


Figure 108 : Dépolymérisation de la cellulose et formation du levoglucosane

Ces produits sont ensuite impliqués dans des réactions de polymérisation ultérieure conduisant à des produits de carbonisation. A ces produits peuvent s'ajouter les produits de dégradation des hémicelluloses comme le furfural. Ces résultats permettent d'expliquer les taux de lignine de Klason très élevés obtenus dans le cas des échantillons de bois traités thermiquement, et les valeurs faibles du rapport Monosaccharides totaux / Holocellulose mesurées.

La figure 109 présente les spectres RMN de la fraction lignine avant et après traitement thermique.

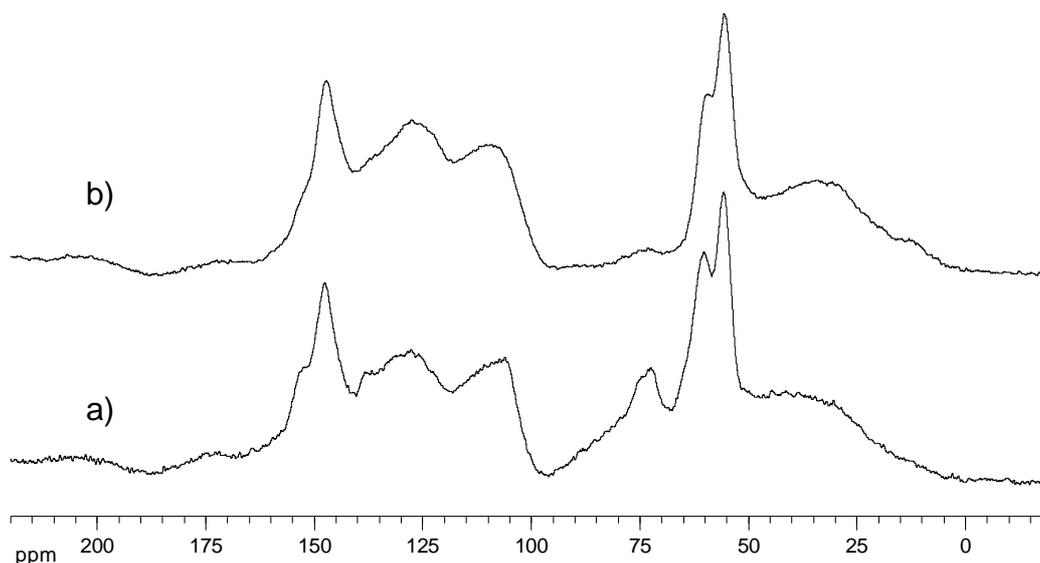


Figure 109 : Spectres RMN ^{13}C CP/MAS de la fraction lignine de la sciure de hêtre

a) témoin. b) traitée à 240°C pendant 21 heures., perte de masse = 17,7%

Le spectre de la fraction lignine avant traitement thermique, présente les signaux caractéristiques de la lignine. Les signaux des différents carbones aromatiques apparaissent entre 160 et 105 ppm. Les carbones aliphatiques des chaînes propane des unités phénylpropane apparaissent entre 15 et 75 ppm, sous forme de différents signaux. Les groupements méthoxyle apparaissent quant à eux à 56 ppm. Après traitement thermique, on observe la disparition du signal à 75 ppm, attribuable à la présence de carbohydrates résiduels liés à la lignine. Les signaux propres à la lignine sont très peu modifiés indiquant sa plus grande stabilité comparativement à la fraction d'holocellulose.

Les différents résultats obtenus par RMN corroborent les résultats précédemment obtenus au laboratoire par des analyses XPS (X ray photo électron spectroscopy) (Nguila et al. 2006). En effet, ces analyses XPS ont montré une diminution importante du rapport O/C durant la pyrolyse douce du bois de hêtre, inexplicable par la seule dégradation des hémicelluloses en produits volatils. La formation de produits de carbonisation malgré les températures relativement basses utilisées lors de la pyrolyse douce du bois, est donc nécessaire pour expliquer l'évolution de la composition chimique du bois et du rapport O/C.

4.2.2.4. Evolution de l'acidité du bois durant la pyrolyse douce

L'analyse HPLC de la composition des monosaccharides du bois en fonction du temps, a permis de mettre en évidence deux phases distinctes au cours du traitement thermique :

- dans un premier temps, on observe une dégradation rapide des hémicelluloses caractérisée par une diminution importante des taux des différents monosaccharides autres que le glucose allant jusqu'à la disparition totale de ces derniers. Pendant cette première phase, on observe une augmentation importante de la perte de masse totale de l'échantillon corrélée à la formation de nombreux produits de dégradation volatils.

- dans un deuxième temps, l'évolution de la perte de masse de l'échantillon est beaucoup moins prononcée, mais continue tout de même à augmenter progressivement. Durant cette phase, on observe une diminution de la quantité de glucose dosée en fonction du temps associée à la formation de produits de carbonisation dans le bois.

Durant ces deux phases, les propriétés macroscopiques du matériau vont subir des modifications importantes. La première phase, pendant laquelle, on observe une dégradation progressive des hémicelluloses, contribuant à l'augmentation de la durabilité du bois vis à vis des agents de pourritures, alors que la seconde phase pendant laquelle les principales modifications du matériau sont liées à la carbonisation du bois, vont avoir des effets néfastes en particulier vis à vis de ses propriétés mécaniques.

Une des caractéristiques des hémicelluloses est de posséder en plus des unités osidiques neutres telles que le xylose, le mannose, l'arabinose ou le galactose, des résidus d'acides uroniques tels que l'acide 4-O-méthylétherglucuronique. La dégradation des hémicelluloses doit de ce fait, induire une diminution du taux d'acidité du bois due à la perte de ces unités acides. L'analyse des unités acides uroniques des hémicelluloses peut également être réalisée par HPLC, mais nécessite l'utilisation de colonnes différentes relativement onéreuses. C'est pourquoi, nous avons envisagé une méthode de dosage par pH-métrie basée sur la titration des fonctions acide carboxylique à la soude. Si l'on considère que la majeure partie des fonctions acide carboxylique du bois sont présentes sur les hémicelluloses, cette méthode devrait permettre de donner assez simplement une idée sur le niveau de dégradation de hémicelluloses. Parallèlement à la titration de l'acidité présente sur le bois, nous avons

également déterminé les taux des différents sucres neutres, et les taux d'holocellulose et de lignine de Klason. Les résultats sont rapportés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Composition chimique et acidité des échantillons de hêtre traités à 250°C

Temps de traitement (heures)	-	-	30 min	1 h	5 h	7 h	15 h
Pertes de masses(%)	0	0	20,3	21,6	24,7	25,7	27,9
Lignine de Klason (%)	23	22,3	30,7	32,6	37,6	38,6	46,1
Holocellulose(%)	77	77,6	69,2	67,3	62,3	61,3	53,9
Glucose + mannose (%)	47,5	49,0	45,1	44,7	41,7	39,3	32,6
Xylose(%)	15,1	15	11,6	9,9	3,7	0,4	0
Galactose(%)	2,2	2,8	1,7	1,2	1,1	0	0
Rhamnose(%)	1,4	1,1	0,9	0,8	0,1	0	0
Arabinose(%)	1,1	0	0,8	0,4	0,2	0	0
Monosaccharides non cellulosiques (%)	19,8	18,9	15	12,3	5,1	0,4	0
Monosaccharides totaux (%)	67,3	67,9	60,1	57	46,8	39,7	32,6
Volume de NaOH (mL) ^a	10,90	10,67 ^b	9,90	9,71	9,36	9,13	9,08
Acidité (méq./g de bois)	0,054	0,0448	0,014	0,0064	0	0	0

^a volume de NaOH 0,01N pour neutraliser 1ml de HCl 0,1N dans 25 mL d'eau distillée = 9,55 mL

^b sciure préalablement lavée à l'eau au soxhlet avant titration

Les mesures réalisées sur la sciure témoin préalablement extraite ou non à l'eau, montrent qu'une bonne partie de l'acidité mesurée est liée à des sites acides greffés sur le bois et non pas à des composés solubles dans l'eau. Le volume de soude nécessaire au titrage, diminue graduellement avec la sévérité du traitement et l'augmentation des pertes de masses, indiquant que la sciure devient progressivement moins acide. Des résultats similaires ont été décrits (Yilgor et al. 2001; Kamdem et al. 2002). Après 7 heures de traitement, on observe une disparition totale des monosaccharides constitutifs des hémicelluloses, correspondant à un taux d'acidité minimum qui ne varie pratiquement plus par la suite. Pendant les 7 premières heures du traitement, on observe par contre une diminution progressive du taux d'acidité corrélée à la diminution des hémicelluloses (figure 110).

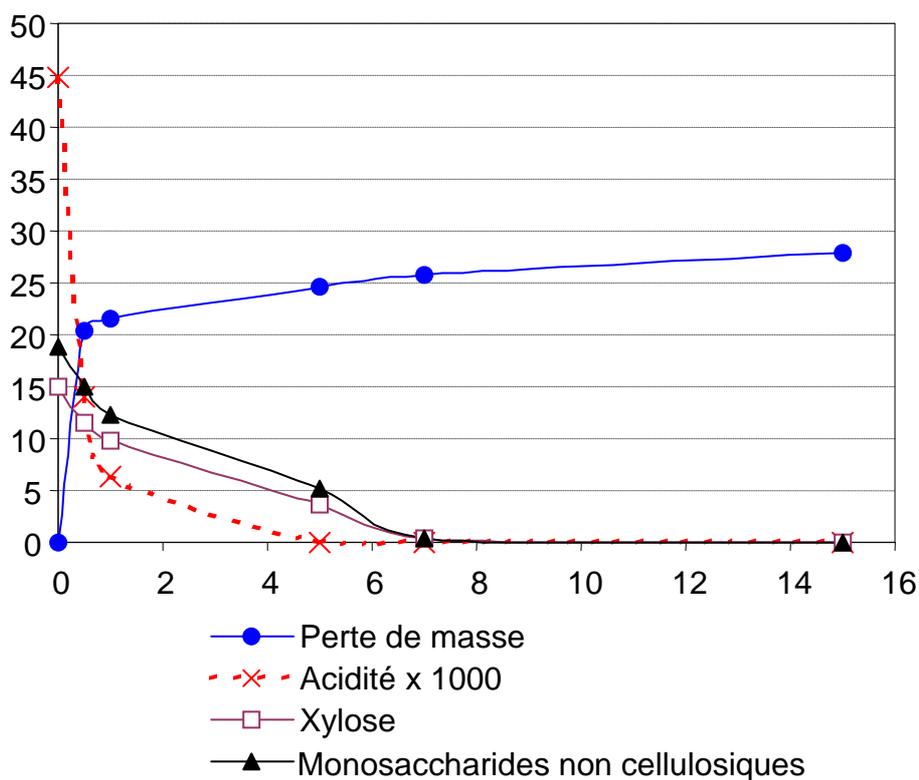


Figure 110 : Corrélations entre la dégradation des hémicelluloses et l'indice d'acidité du bois de hêtre

La mesure du taux d'acidité du bois, semble être une mesure pertinente pour estimer le niveau de dégradation des hémicelluloses comparativement à la perte de masse du bois. Cette corrélation semble être liée, aux relations étroites existant entre l'acidité du bois et les motifs acides uroniques présents dans les hémicelluloses. La corrélation avec la perte de masse est moins bonne, du fait de la diversité des réactions de dégradations intervenant lors du traitement thermique, impliquant pas seulement les hémicelluloses mais aussi la cellulose, comme les réactions de carbonisation mises en évidence précédemment. A partir de 5 heures, le volume de soude nécessaire pour neutraliser l'acidité du bois, est inférieur à la quantité nécessaire pour neutraliser l'acide chlorhydrique utilisé pour effectuer le dosage en retour. Ces résultats indiquent clairement que le bois traité dans des conditions dures, acquiert un caractère basique après traitement thermique.

Dans le but de généraliser ces résultats, les expériences précédentes ont été reproduites sur du pin sylvestre. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Composition chimique et acidité des échantillons de pin traités à 250°C

Temps de traitement (heures)	-	-	0,5	1	5	7	15
Pertes de masses(%)	0	0	17,6	19,1	22,4	25,7	27
Lignine de Klason (%)	27,12	26,94	29,53	30,6	35,32	37,31	43,23
Holocellulose(%)	72,88	73,06	70,47	69,4	64,68	62,69	56,77
Glucose (%)	42,5	43,01	42,44	42,03	40,36	39,17	38
Mannose (%)	9,82	9,23	8,73	7,56	4,9	3,43	1,66
Xylose(%)	5,26	5,54	3,29	1,56	0,21	0	0
Galactose(%)	3,47	3,1	2,8	2,09	1,32	0	0
Rhamnose(%)	1,68	0,61	0,26	0,24	0	0	0
Arabinose(%)	0,48	0,58	0,22	0,18	0	0	0
Monosaccharides non cellulosiques (%)	20,71	19,06	15,3	11,63	6,43	3,43	1,66
Monosaccharides totaux (%)	63,21	62,07	57,74	53,66	46,79	42,6	39,66
Volume de NaOH (mL) ^a	11,6	11,03 ^b	10,98	10,58	10,21	10,03	10,00
Acidité (méq./g de bois)	0,082	0,0592	0,0572	0,0412	0,0264	0,0192	0,018

^a volume de NaOH 0,01N pour neutraliser 1ml de HCl 0,1N dans 25 ml d'eau distillée = 9,55mL

^b sciure préalablement lavée à l'eau au soxhlet avant titration

Dans le cas des bois de résineux, les hémicelluloses sont principalement constituées de galactoglucomannanes (20 à 25%) et d'arabinoglucuronoxylanes (5 à 10%). La quantité de mannose, est donc beaucoup plus importante que dans le cas du bois de hêtre permettant de doser ces dernières. L'acidité du bois de pin est supérieure à celle du hêtre, ce qui correspond à ce qui est généralement rapporté dans la littérature (Rowell et al. 2005). Les titrations réalisées sur la sciure lavée ou non à l'eau, indiquent à nouveau qu'une bonne partie de l'acidité est due à des fonctions acides liés au bois. De la même manière que précédemment, l'acidité du bois diminue avec l'intensité du traitement thermique. Cependant, contrairement au cas du hêtre, la valeur d'acidité finale reste légèrement supérieure à zéro. Cette différence de comportement, peut probablement s'expliquer par la présence d'autres composés possédant

des fonctions acides carboxyliques, comme les acides résiniques présents dans les bois de résineux. L'évolution des taux de monosaccharides non celluloses, et de l'acidité du bois sont présentés dans la figure 111.

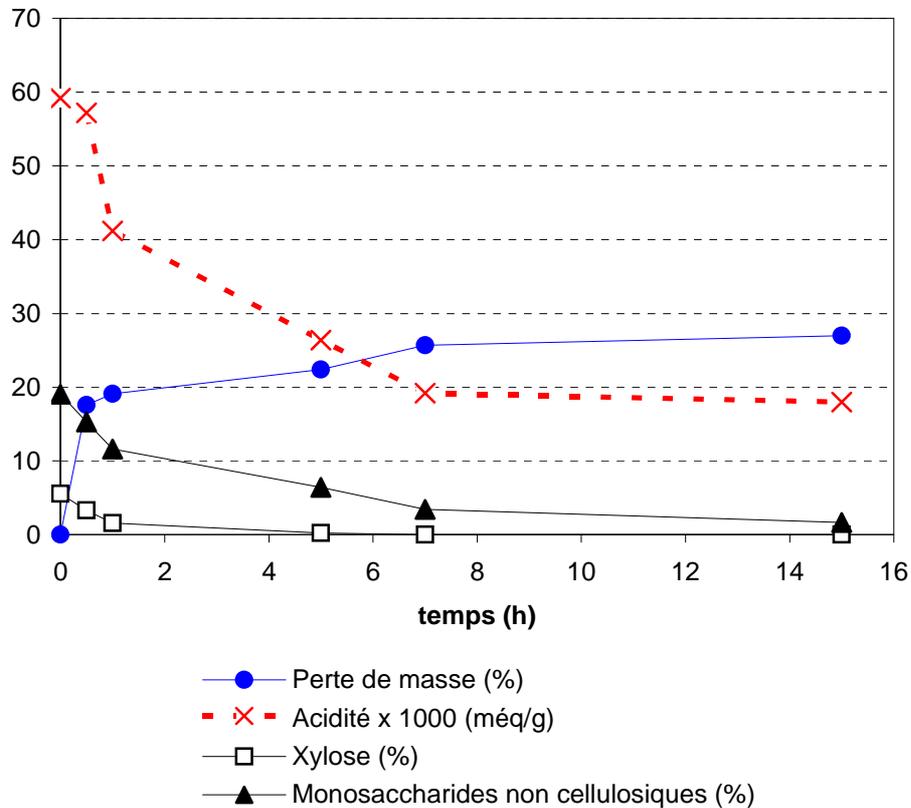


Figure 111 : Corrélations entre la dégradation des hémicelluloses et l'indice d'acidité du bois de pin

Les mêmes conclusions que celles formulées à partir des résultats obtenus dans le cas du hêtre peuvent être faites. On observe une bonne corrélation entre la diminution du taux d'acidité du bois, et la disparition des différents monosaccharides constitutifs des hémicelluloses. Pendant les premières heures de traitement, on observe une diminution du taux d'acidité du bois associée à une forte diminution des taux des différents monosaccharides non celluloses. Après 7 heures de traitement, les hémicelluloses sont pratiquement totalement dégradées, alors que l'acidité du bois tend à se stabiliser.

La mesure du taux d'acidité du bois constitue donc une méthode indirecte intéressante, permettant d'évaluer la dégradation des hémicelluloses. La facilité de mise en œuvre de cette mesure, et le coût relativement faible des équipements qu'elle implique, constitue

incontestablement un point fort de cette technique. Il serait toutefois nécessaire d'affiner ces résultats en effectuant des expérimentations supplémentaires.

4.2.3. Conclusions

De nombreux travaux ont déjà été effectués sur les changements chimiques intervenant durant la pyrolyse douce du bois de feuillus (Thermo Wood Handbook 2003 ; Wikberg et Maunu 2004).

Généralement, les changements physiques intervenant durant le traitement thermique du bois sont la diminution de la variation dimensionnelle et le gonflement, une augmentation de la durabilité vis à vis des champignons et une diminution des propriétés mécaniques. Les modifications chimiques attribuées au traitement thermique du bois à haute température, sont la diminution de la quantité des polysaccharides amorphes, la condensation et la déméthoxylation de la lignine.

La dégradation des hémicelluloses en composés volatiles, et la thermo réticulation de la lignine font partie de grandes modifications habituellement décrites à nos températures d'étude (240°C et 250°C). Les travaux que je viens de présenter dans cette partie de notre étude, ont clairement permis de démontrer la formation de matière carbonée dans la structure du bois de hêtre traité à 240°C durant 21 heures. Les spectres RMN¹³C de la fraction d'holocellulose traité thermiquement, montre l'apparition de nouveaux signaux dans les zones de 35 ppm et 125 à 135 ppm dues à la formation de charbon, ou de précurseurs de formation du charbon. Ces apparitions de signaux dans la fraction d'holocellulose traité thermiquement, s'opposent à ce qui est habituellement décrit dans la littérature à savoir que, les signaux apparaissant dans ces zones après traitement thermique sont dues respectivement à la formation de ponts méthylènes et à la thermo réticulation de la lignine.

La détermination de la quantité de lignine de Klason, et les dosages HPLC des différents monosaccharides contenus dans l'hydrolysat acide, viennent appuyer les analyses RMN¹³C des échantillons traités thermiquement. Ces différentes proportions (monosaccharides et lignine de Klason) indiquent que l'évolution de la composition chimique du bois traité thermiquement, ne peut s'expliquer par la seule dégradation des hémicelluloses en composés volatiles, mais par un début de formation simultanée de charbon. Sur la base de ces résultats et de ceux obtenus précédemment par Nguila et al. (2006), on peut dire que la formation de charbon, ou de précurseurs entrant dans la formation de charbon comme le levoglucosane et le lévomannosane commence à des températures comprises entre 200°C et 240 °C. En

conclusion de ce travail, nous dirons que même si la formation de charbon durant la pyrolyse du bois à hautes températures de 300°C à 450 °C a fait l'œuvre de nombreuses études, cette formation durant le traitement thermique par pyrolyse ménagée n'est pas clairement démontrée. Les modifications apparaissant sur les signaux RMN¹³C, dues à la formation de charbon, sont habituellement interprétées comme dues à la thermo réticulation de la lignine. Ces affirmations doivent maintenant être reconsidérées aux vues de ces résultats. Aussi, la matière carbonée formée durant cette pyrolyse ménagée pourrait être à l'origine de nombreuses et nouvelles propriétés de ce matériau comme sa durabilité.

Conclusions et perspectives

5. Conclusions et perspectives

Les objectifs de ce travail étaient de mettre en évidence des marqueurs chimiques susceptibles de permettre le contrôle de la qualité d'éprouvettes de bois soumises à différents agents de dégradation. Dans ce contexte très vaste, nous nous sommes intéressé à deux voies de recherche.

La première concernait la caractérisation de la nature des extractibles présents dans différentes essences non durables dans le but de suivre l'évolution de ces dernières au cours de la colonisation et de la dégradation du bois par différentes pourritures avec comme objectif final la mise au point d'une méthode de détection précoce de la dégradation du bois.

La seconde concernait, l'étude de la composition chimique de la fraction polysaccharidique du bois traité thermiquement dans le but de mettre en évidence l'effet de ces modifications sur les propriétés du matériau.

Dans les deux cas, une partie importante du travail a consisté en la mise au point des conditions d'analyses les mieux adaptées en fonction des problèmes rencontrés. Ces mises au point ont impliqué un important travail analytique pour déterminer les meilleures conditions de séparation et d'analyse, mais aussi une grande minutie dans la préparation des échantillons de façon à obtenir des résultats reproductibles.

Il a ainsi été montré que les conditions de séchage utilisées pour préparer les échantillons avaient un effet primordial sur la nature des extractibles analysés par HPLC. Ainsi, un séchage à 103°C comme cela est préconisé dans la norme EN113 destinée à tester l'efficacité des propriétés de nouveaux biocides, s'est avéré inadapté pour notre étude du fait de nombreuses réactions de dégradation et de transformation et des extraits conduisant à des chromatogrammes très différents de ceux obtenus pour des extractibles natifs. Même si ce phénomène de dégradation des extractibles est un phénomène connu et que certaines normes, comme la norme EN 350-1. destinée à évaluer la durabilité naturelle de différentes essences sont réalisées sur des éprouvettes non séchées, la difficulté que nous avons rencontré consiste à obtenir un chromatogramme de référence sans dégradation pour suivre l'évolution ultérieure lors de la mise en contact avec le champignon. L'autre difficulté consiste à pouvoir identifier les produits présents dans les différentes essences étudiées. Nous avons ainsi travaillé sur trois bois différents, du hêtre et du pin qui sont deux essences européennes peu durables très fréquemment utilisées dans les essais biologiques en relation avec la préservation du bois et le chêne soyeux, une essence tropicale présentant également une faible durabilité. En fonction

du type d'essences utilisées, différents agents de pourriture ont été envisagés et l'analyse de la composition chimique des extractibles déterminée en fonction du temps. Les extractibles contenus dans ces bois non durables, sont dégradés de manière plus ou moins rapide. L'exposition à des agents de pourriture blanche provoque une diminution de la quantité des substances extractibles présentes dans l'extrait acétonique, tandis que les pourritures brunes, entraînent plutôt une augmentation de la quantité de ces dernières pouvant aller jusqu'à 250% après 30 jours d'incubation dans le cas des échantillons de hêtre. L'identification de la catéchine dans le cas du bois de hêtre a permis de mettre en évidence que ce flavonoïde était rapidement dégradé en présence de *T. versicolor* probablement du fait de mécanismes de détoxification utilisés par le champignon pour coloniser et dégrader le bois (Lekounougou et al., 2007). D'autres extraits comme les alkenyl ou alkyl résorcinols identifiés dans le cas du chêne soyeux sont moins susceptibles à la présence du champignon et subsistent dans le bois alors que la matière ligneuse subit des pertes de masse, relativement conséquentes. Cette différence de comportement, peut être liée à leur présence en grande quantité et à une moindre toxicité de ces extractibles qui ne seraient plus détoxifiés par le champignon comparativement à la catéchine. En présence de biocides comme le Propiconazole ou l'IPBC, la dégradation de la catéchine est ralentie voir inhibée montrant que cette dernière peut être utilisée comme marqueur précoce de la dégradation fongique du bois de hêtre, lors de la dégradation précoce par *T. versicolor*.

Les variations de certains composés restent encore mal comprises et ne permettent pas de les utiliser comme marqueurs précoces de la dégradation fongique du bois

Les résultats obtenus lors de l'analyse concernant l'évolution des polysaccharides suite au traitement thermique, sont globalement en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature, concernant la diminution de la quantité des hémicelluloses et les réactions d'autocondensation des lignines. Toutefois, même si ces tendances générales, semblent respectées, nos résultats mettent en évidence un phénomène plus ou moins important de carbonisation dans nos conditions de traitement réalisé à 240°C remettant en cause certaines interprétations réalisées jusqu'à présent. L'apparition par RMN C¹³ de pics à 35 ppm et dans la zone allant de 125 et 135 ppm, jusqu'à présent attribués à la formation de ponts méthylène entre les unités phénoliques de la lignine, suite à la réaction avec différents aldéhydes provenant de la dégradation des hémicelluloses et aux modifications des signaux aromatiques de la lignine, suite aux réactions précédentes sont fortement remises en cause, même s'il n'est pas totalement possible de les exclure. En effet, ces signaux sont en tous points similaires à ceux observés lors de travaux rapportés dans la littérature concernant la pyrolyse de la

cellulose et attribuables à des produits de déshydratation tel que le levoglucosane à l'origine de la formation ultérieure de goudrons.

L'analyse des monosaccharides constitutifs des hémicelluloses suite au traitement thermique, confirme et conforte la formation des quantités plus ou moins importantes de produits de carbonisation lorsque le traitement thermique est réalisé à 240°C sous azote. En effet, la forte augmentation de la quantité de lignine de Klason, et la diminution des quantités des monosaccharides en fonction de la sévérité du traitement, ne peuvent s'expliquer par la seule dégradation des hémicelluloses en composés volatiles.

Même si la formation de produit de carbonisation est également décrite à plus haute température (300 et 450°C), nos résultats montrent que ces réactions peuvent avoir lieu dans des gammes de températures plus basses, bien que pour l'instant peu d'études l'aient clairement démontré.

Les résultats obtenus lors de ce travail ont d'ores et déjà conduit à la publication de trois articles et d'un proceeding lors de la conférence annuelle de IRG à Tromsø, en Norvège en 2006.

- ❖ Investigation on catechin as a beech wood decay biomarker. **S. Mounguengui**, S. Dumarçay, P. Gérardin. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 60 (4), (2007) 238-244 (annexe 1)
- ❖ Evidence of char formation during wood heat treatment by mild pyrolysis. G. Nguila Inari, **S. Mounguengui**, S. Dumarçay, M. Pétrissans, P. Gérardin. *Polymer Degradation and Stability*. 92 (2007) 997-1002 (annexe 2)
- ❖ Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. S. Lekounougou, **S. Mounguengui**, S. Dumarçay, C. Rose, P. E. Courty, J. Garbaye, P. Gérardin, J. P. Jacquot, E. Gelhaye. à paraître dans *International Biodeterioration and Biodegradation*. 61 (2008) 287–293 (annexe 3)
- ❖ Investigation on a wood Decay Biomarker. **S. Mounguengui**, S. Dumarçay, P. Gérardin. Paper prepared for the 37th Annual Meeting Tromsø, Norway 18-22 June 2006. IRG/WP 06-20336 (annexe 4).

Même si les résultats obtenus pendant ce travail de thèse ont permis de présenter plusieurs articles, beaucoup de travail reste encore à effectuer.

En effet la complexité des phénomènes impliqués lors de la dégradation des extractibles par les champignons justifie à elle seule de poursuivre dans ce sens. Un prolongement à court terme consisterait à compléter les résultats obtenus avec la catéchine. En effet, il semble que la catéchine soit parmi les tout premiers produits à être dégradés par *T. versicolor* probablement en réponse à sa toxicité. Un des problèmes auquel nous avons été confronté concernait les variations relatives de la concentration en catéchine qui s'est révélée être très sensibles aux conditions de préparation des échantillons (origine, stockage, séchage...). Il pourrait être intéressant dans ces conditions d'imprégner des éprouvettes avec une faible quantité de catéchine, ce qui permettrait de maîtriser la concentration de cette dernière dans le bois et de suivre son évolution en présence de *T. versicolor*.

D'autres prolongements de ces travaux concernent l'identification et l'utilisation d'autres marqueurs. En effet il est apparu clairement que certains composés apparaissant puis disparaissant au cours du temps peuvent constituer d'autres marqueurs potentiels de dégradation fongique.

Concernant le traitement thermique, l'analyse de la composition chimique des polymères constitutifs du bois reste un challenge important du fait de la difficulté de trouver des techniques qui rendent totalement compte de la composition initiale du bois sans provoquer d'artefacts dus aux réactions de dégradation utilisées lors du fractionnement du bois. Le taux de carbonisation en fonction du couple temps de traitement /température de traitement constitue vraisemblablement un paramètre important conditionnant les propriétés mécaniques et la durabilité finale du matériau qu'il conviendrait d'étudier plus en détail.

Références bibliographiques

- Ahmed A. S., Nakamura N., Meselhya M. R., Makhboul M. A., El-Emary N., Hattori M (2000).** Phenolic constituents from *Grevillea robusta*. *Photochemistry* **53**, 149-154.
- Alen R., Kotilainen R., Zaman A (2002).** Thermochemical behavior of Norway spruce (*Picea abies*) at 180-225°C. *Wood Science and Technology* **36**, 163-171.
- Amusant N., Beauchene J., Fournier M., Janin G., Thevenon M.-F (2004).** Decay resistance in *Dicorynia guianensis* Amsh.: Analysis of inter-tree and intra-tree variability and relations with wood colour. *Annals of Forest Science* **61** (4), 373-380.
- Ananías R., Haluk J. P., Mougel E., Zoulalian A (2001).** Discoloration du hêtre *Fagus sylvatica* lors d'un séchage convectif basse température. *Les Cahiers Scientifiques du Bois* **2**, 15 - 30.
- Archambault J., Lacki K., Duvnjak Z (1996).** Conversion of catechin and tannic acid by an enzyme preparation from *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters* **7**, 771-774.
- Arima H., Ashida H., Danno G (2002).** Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66** (5), 1009-1014.
- Aro N., Pakula T., Penttila M (2005).** Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**, 719-739.
- Arrabal C., Cortijo M., Fernandez de Simon B., Concepción Garcia-Vallejo M., Cadahia E (2002).** *Pinus pinaster* Oleoresin in Plus Trees. *Holzforschung* **56**, 261-266. **Arramon G., Saucier C., Colombani D., Glories Y (2002).** Identification of triterpene saponins in *Quercus robur* L. *Q. petraea* Liebl. heartwood by LC-ESI/MS and NMR. *Phytochemical Analysis* **13** (6), 305-310.
- Arunachlam M., Mohan Raj M., Mohan N., Mahadevan A (2003).** Biodegradation of Catechin. *Proceedings of the Indian National Science Academy B* **69** No. 4 353-370.
- Baldovini N., Tomi F., Casanova J (2001).** Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by ¹³C-NMR. *Photochemical Analysis* **12** (1), 58-63.
- Barrero A. F., Quilez del Moral J. F., Lucas R., Paya M., Akssira M., Akaad S., Mellouki Fouad (2003).** Diterpenoids from *Tetraclinis articulata* that Inhibit Various Human Leukocyte Functions. *Journal of Natural Products* **66**, 844-850.
- Bergeron C., Livesey J.F., Awang D. V. C., Arnason J. T., Rana J., Baum BR., Letchamo W (2000).** A quantitative HPLC method for the quality assurance of Echinacea products on the North American market. *Phytochemical Analysis* **11**(4), 207-215.
- Bhat Tej K.,Singh Bhupinder., Sharma O. P (1998).** Microbial degradation of tannins - a current perspective. *Biodegradation* **9** (5), 343-357.
- Bhat K. M., Thulasidas P. K., Maria Florence E. J., Jayaraman K (2005).** Wood durability of home-garden teak against brown-rot and white-rot fungi. *Trees* **19**, 654 - 660.
- Bianco J. L (1998).** La Forêt: une chance pour la France. Rapport au Premier Ministre.

- Bjurman J., Nordstrand E., Kristensson J (1997).** Growth-phase-related production of potential volatile-organic tracer compounds by molds on wood. *Indoor Air*, **7** (1), 2-7.
- Blanchette R. A., Obst J. R., Timell T. E (1994).** Biodegradation of Compression Wood and Tension Wood by White and Brown Rot Fungi. *Holzforschung* **48**, 34-42.
- Boué, S. M et Raina, A. K (2003).** Effects of plant flavonoïdes on fecundity, survival, and feeding of the Formosan subterranean termite. *Journal of Chemical Ecology* **29** (11), 2575 - 2584.
- Bourgeois J., Bartholin M.C., Guyonnet R (1989).** Thermal treatment of wood: analysis of obtained product. *Wood Science and Technology* **23**, 303 - 310.
- Boonstra, M. J.; Tjeerdsma, B. F.; Groeneveld, H. A. C. (1998).** Thermal modification of non-durable wood species. Part 1. The Plato technology: thermal modification of wood. International Research Group on Wood Preservation, Document no. IRG/WP 98-40123.
- Boonstra M.J. et Tjeerdsma B (2006).** Chemical analysis of heat treated softwoods. *Holz als Roh- und Werkstoff* **64**, 204–211.
- Boonstra M J., Van Acker J., Kegel E., Stevens M (2007).** Optimisation of two-stage heat treatment process. Durability aspects. *Wood Sciences and Technology* **41** (1) 31-57.
- Boonstra MJ., Van Acker J., Tjeerdsma F., Kegel E (2007).** Strength properties of thermally modified softwoods and its relation to polymeric structural wood constituents. *Annals of Forest Sciences* **64**, 679 - 690.
- Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J (1996).** L'analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13, *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*. Partie 1, **41**, 15-24.
- Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J (1996).** L'analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13, *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*. Partie 2, **41**, 41-50.
- Breza J., Dzurny O., Borowka A., Hanus T., Petrik R., Blane G., Chadha-Boreham H., Autet W (1998).** Efficacy and acceptability of Tadenan (*Pygeum africanum* extract) in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH): A multicentre trial in central Europe. *Current Medical Research and Opinion* **14** (3), 127 - 139.
- Brischke C., Welzbacher C. R., Brandt K., Rapp A. O (2007).** Quality control of thermally modified timber: Interrelationship between heat treatment intensities and CIE L*a*b* color data on homogenized wood samples. *Holzforschung* **61** (1), 19-22.
- Cadahia E., Varea S., Munoz L., Fernandez de Simon B., Garcia -Vallejo M. C (2001).** Evolution of ellagitannins in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (8), 3677 - 3684.
- Caldeira I., Climaco M. C., Bruno de Sousa R., Belchior A. P (2006).** Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *Journal of Food Engineering* **76**, 202–211.

- Cannon J. R., Chow P. W., Fuller M. W., Amilton B. H., Metcalf B. W., Power A. J (1973).** Phenolic constituents of *Grevillea robusta* (Proteaceae). Structure of robustol, a novel macro cyclic phenol. Australian Journal of Chemistry, **26** (10), 2257 - 2275.
- Catalano S., Ferretti M., Marsili A., Morelli I (1984).** New constituents of *Prunus africana* bark extract. Journal of Natural Products, **47** (5) 910.
- Celimene C. C., Micales J. A., Ferge L., Young R. A (1999).** Efficacy of Pinosylvins against White-Rot and Brown-Rot Fungi. Holzforschung **53**, 491–497.
- Chai X. Y, Li S. L, Li P (2005).** Quality evaluation of *Flos Lonicerae* through a simultaneous determination of seven saponins by HPLC with ELSD. Journal of Chromatography A. **1070** (1-2), 43–48.
- Chatonnet P et Denis Dubourdiou D (1998).** Identification of Substances Responsible for the Sawdust. Aroma in Oak Wood. Journal of the Science of Food and Agriculture **76**, 179 - 188.
- Christian V., Shrivastava R., Shukla D., Modi H. A., and Vyas B. R. (2005).** Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. Indian Journal of Experimental Biology **43**:301-312.
- Claassen F. W., Van de Haar C., Van Beek T. A., Dorado J., Martinez-Inigo M. J., Sierra-Alvarez R (2000).** Rapid Analysis of Apolar Low Molecular Weight Constituents in Wood Using High Pressure Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. Phytochemical Analysis **11**, 251–256.
- Clifford M. N et Scalbert A (2000).** Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture **80**, 1118 - 1125.
- Coelho D., Marques G., Gutierrez A., Silvestre A. J. D., del Rio J. C (2007).** Chemical characterization of the lipophilic fraction of giant reed (*Arundo donax*) fibres used for pulp and paper manufacturing. Industrial Crops and Products **26**, 229–236.
- Constantin Emilia (1996).** Spectrométrie de masse, Technique et documentation Lavoisier, Paris, 1-14.
- Cook Steven (2002).** The Bacterial Biotransformation of the Organic Antisapstain Biocide IPBC. Thesis for Ph.D. University of London. 282 pages.
- Corticchiato M., Tomi F., Bernardini A. F., Casanova J (1998).** Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus herba-barona*. Biochemical Systematics and Ecology **26**, 915-932.
- Cristobal N. A., Mario C., Raul R., Gutierrez-Sanchez., Ascencion R. C., Augur C. (2004).** Catechin degradation by several fungal strains isolated from Mexican desert. Journal of Microbiology and Biotechnology. **14**(2), 426-429.
- Curling S. F., Clausen C. A., Winandy J. E (2002).** Experimental method to quantify progressive stages of decay of wood by basidiomycete fungi. International Biodeterioration and Biodegradation **49**, 13 - 19.

Références bibliographiques

- Dawson-Andoh Benjamin (2002).** Ergosterol content as a measure of biomass of potential biological control fungi in liquid cultures. *Holz als Roh- und Werkstoff* **60** (2), 115-117.
- De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V (1999).** Spectrométrie de Masse, 2e édition, Librairie Dunod, Paris.
- Desobry S., Barthelemy E (2006).** Etat des connaissances relatives aux traitements des matériaux en bois au contact du vin et des boissons alcoolisées. Perspectives pour une évaluation des risques. Agence Française de sécurité sanitaire des aliments 49 pages.
- Directive 98/8/CE du parlement européen et du conseil concernant la mise sur le marché des produits biocides(16 février 1998).** Journal officiel des Communautés européennes. L 123/1-L 123/63.
- Dorado J., Beek T.A., Claassen F.W., Lenon G., Wijnberg J. B. P., Sierra-Alvarez R (2000).** Elimination and detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. *Journal of Biotechnology* **80**, 231 - 240.
- Dorado J., Beek T. A., Claassen F. W.,Sierra-Alvarez R (2001).** Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus Sylvestris* by the white-rot fungi *Bjerkandea sp.* and *Trametes versicolor*. *Wood Science and Technology*. **35**, 117 - 125.
- Doussot F., De Jeso B., Quideau S., Pardon P (2002).** Extractives Content in Cooperage Oak Wood during Natural Seasoning and Toasting; Influence of Tree Species, Geographic Location, and Single-Tree Effects. *journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5955-5961.
- Dweck Anthony (2002).** Natural ingredients for colouring and styling. *International Journal of Cosmetic Science* **24**, 287-302.
- D'souza T. M., Boominathan K., Reddy C. A (1996).** Isolation of Laccase Gene-Specific Sequences from White Rot and Brown Rot Fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (10), 3739–3744.
- Edou Engonga P., Schneider R., Gérardin P., Loubinoux B (1999).** Chemical modification of wood with perfluoroalkyl ethanol and 4,4'-diphenylmethane diisocyanate. *Holzforschung* **53** (3), 272 - 276.
- Enoki A., Tanaka H., Fuse G (1988).** Degradation of lignin related compounds, pure cellulose, and wood components by white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung* **42**, 85 - 93
- Evans C. S., Dutton M.V., Guillen F., Veness R G (1994).** Enzymes and small molecular mass agents with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**, 235-240.
- Filippini M-H., Tomi F., Casanova J (2000).** Composition of the leaf oil of *Ferula arrigonii* Bocchieri. *Flavour and Frangrance journal* **15** (3), 195-198.
- Filley T. R., Cody G. D., Goodell B., Jellison J., Noser C., Ostrofsky A. (2002).** Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. *Organic Geochemistry* **33** (2), 111 - 124.
- Fengel D et Wegener G. (1984).** *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions.* De Gruyter, Berlin.

Références bibliographiques

- Fernandez M. P., Watson P. A., Breuil C. (2001).** Gas chromatography – mass spectrometry method for the simultaneous determination of wood extractives compounds in quaking aspen. *Journal of Chromatography A*, **922**: 225–233.
- Fernandez M. P., Breuil C., Watson P. A (2002).** Natural clonal variation of wood extractives in *Populus tremuloides*. *Canadian Journal of Forest Research* **32**, 1192-1199.
- Fourneau C., Hocquemiller R., Cavé, A. (1996).** Triterpenes from *Prunus africana* bark. *Phytochemistry*. **42** (5), 1387-1389.
- Gardner D. J., Schultz T. P., McGinnis G. (1985).** The Pyrolytic Behavior of Selected Lignin Preparations. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **5** (1), 85-110.
- Gérard J., Edi Kouassi A., Daigremont C., Détienne P., Fouquet D., Vernay M. (1998).** Synthèse sur les caractéristiques technologiques de référence des principaux bois commerciaux africains. CIRAD-Forêt.
- Gessner M. O., Schmitt A. L (1996).** Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. **2**, 415–419.
- Glabasnia A et Hofmann T (2006).** Sensory-Directed Identification of Taste-Active Ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European Oak Wood (*Quercus robur* L.) and Quantitative Analysis in Bourbon Whiskey and Oak-Matured Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 3380-3390.
- Gosselink R. J. A., Krosse A. M., Van der Putten J. C., Van der Kolk J. C., De Klerk-Engels B., Van Dam J. E. G (2004).** Wood preservation by low-temperature carbonisation. *Industrial Crops and Products* **19**, 3-12.
- Green III F et Highley T. L (1997).** Mechanism of Brown-Rot Decay: Paradigm or Paradox. *International Biodeterioration and Biodegradation* **39** (2-3) 113-124.
- Guillén F., Martínez A. T., Martínez M. J (1992).** Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* **209**, 603-611.
- Guillén F., Martínez M.J., Muñoz C., Martínez A. T (1997).** Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **339** (1), 190 - 199.
- Gutiérrez A., Caramelo L., Prieto A., Martínez M. J., Martínez A. T (1994).** Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1783- 1788.
- Gutiérrez A., J. C. Del Rio., Martínez M. J., Martínez A. T (1999).** Fungal Degradation of Lipophilic Extractives in *Eucalyptus globulus* Wood. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (4). 1367-137.

- Hakkou M., Pétrissans M., Zoulalian A., Gérardin P (2005).** Investigation of wood wettability changes during heat treatment on the basis of chemical analysis. *Polymer Degradation and Stability* **89**, 1-5.
- Hakkou M., Petrisans M., Gérardin P., Zoulalian A (2006).** Investigations of the reasons for fungal durability of heat-treated beech wood. *Polymer Degradation and Stability* **91**, 393-397.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V., Nielsen J. B. (2006).** A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology*. **44**, 616–625.
- Han Dong Hao et Li Ren He (2004).** Mechanisms of Cardiovascular Protection by Resveratrol. *Journal of Medicinal Food* **7** (3), 290 - 298.
- Heinze, Thomas Editor (2005).** Polysaccharides I : Structure , Characterization and Use. *Advances in Polymer Science*, 186. 281 pages.
- Hernes P. J et Hedges J. I (2004).** Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68** (6), 1293 - 1307.
- Higuchi Takayoshi (2004).** Microbial degradation of lignin : Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences* **80** (5), 204 - 214.
- Hoffmann Laurent (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinatate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de L'université Louis Pasteur, 167 pages.
- Holmbom B., Eckerman C., Eklund P., Hemming J., Nisula L., Reunanen M., Sjöholm R., Sundberg A., Sundberg K., Willför S (2003).** Knots in trees - A new rich source of lignans. *Photochemistry Reviews*. **2**, 331 - 340.
- Hooper L et Cassidy A (2006).** A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 1805-1813.
- Hu, Z., Yeh, T.-F., Chang, H.-m., Matsumoto, Y., Kadla J. F (2006).** Elucidation of the structure of cellulolytic enzyme lignin. *Holzforschung* **60**, 389–397.
- Hundt K., Jonas U., Hammer E., Schauer F (1999).** Transformation of diphenyl ethers by *Trametes versicolor* and characterization of ring cleavage products. *Biodégradation* **10**, 279 -286.
- Irbe, I., Andersons, B., Chirkova, J., Kallavus, U., Andersone, I., Faix, O (2006).** On the changes of pinewood (*Pinus sylvestris* L.) Chemical composition and ultrastructure during the attack by brown-rot fungi *Postia placenta* and *Coniophora puteana*. *International Biodeterioration and Biodegradation* **57** (2) 99-106.
- Jensen Jr, K. A., Jr., Z. C. Ryan, A. Vanden Wymelenberg, D. Cullen, and K. E. Hammel (2002).** An NADH:quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:2699–2703.

- Jin L., Schultz T.P., Nicolas D. D (1990a).** Structural characterization of brown-rotted lignin. *Holzforschung* **44** 133-138.
- Jodin Philippe (1994).** Le bois matériau d'ingénierie. Association pour la recherche sur le bois en Lorraine, 433 pages.
- Juergensen L., Busnarda J., Caux P. Y., Kent R (1999).** Fate, behavior, and aquatic toxicity of the fungicide IPBC in the Canadian environment. *Environmental Toxicology* **15** (3) 201 – 213.
- Kaar W. E., Cool L.G., Merriman M. M (1991).** Complete analysis of wood polysaccharides using HPLC. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **11** (4), 447-463.
- Kamaya Y., Fukaya Y., Suzuki K (2005).** Acute toxicity of benzoic acids to the crustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere* **59** (2), 255-261.
- Kamdern D P., Pizzi A., Jermannaud A. (2002).** Durability of heat-treated wood. *Holz als Roh und Werkstoff* **60**, 1-6.
- Kawai S., Iwatsuki M., Nakagawa M., Inagaki M., Hamabe A., Ohashi H (2004).** An alternative β -ether cleavage pathway for a non-phenolic β -O-4 lignin model dimer catalyzed by a laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 154–160.
- Kawamura F., Ohara S., Nishida A (2004).** Antifungal activity of constituents from the heartwood of *Gmelina arborea*: Part 1. Sensitive antifungal assay against Basidiomycetes. *Holzforschung*. **58**, 189–192.
- Kennedy J. F., Philipp G. O., Williams P. A (1990).** “Cellulose and exploitation, industrial utilisation, biotechnology, and physical – chemical properties”, Horwood limited publisher, London.
- Kerem, Z., K. A. Jensen, and K. E. Hammel (1999).** Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *FEBS Letters* **446**:49–54.
- Kersten Philippe (1990).** Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**, 2936-294.
- Kim D.Y., Yochiharu N., Masahisa W., Shigenori K., Takeshi O (2001).** Thermal decomposition of cellulose crystallites in wood. *Holzforschung* **55**, 521-524.
- Kinjo J., Uemura H., Nohara T (1995).** Novel Yellow Pigment from *Pterocarpus santalinus* : Biogenetic Hypothesis for Santalin Analogs. *Tetrahedron Letters*, **36** (31), 5599-5602.
- Kirk K. T et Cullen Dan (1998).** *Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi*. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, edited by Raymond A 273- 307.
- Kleinhentz M., Jactel H., Menassieu P (1999).** Terpene attractant candidates of *Dioryctria sylvestrella* in maritime pine (*Pinus pinaster*) oleoresin, needles, liber and headspace samples. *Journal of Chemical Ecology* **25**, 2741-2756.
- Koch G., Puls J., Bauch J (2003).** Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beech wood (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung* **57** (4), 339-345.

- Kok L. D. S., Wong Y. P., Wu T. W., Chan H. C., Kwok T. T., Fung K. P (2000).** Morin hydrate A potential antioxidant in minimizing the free-radicals-mediated damage to cardiovascular cells by anti-tumor drugs. *Life Sciences* **67**(1), 91-99.
- Kokutse A. D., Stokes A., Bailleres H., Kokou K., Baudasse C (2006).** Decay resistance of Togolese teak (*Tectona grandis* L.f) heartwood and relationship with colour. *Trees* **20**, 219–223.
- Korkut Suleyman (2008).** The effects of heat treatment on some technological properties in Ulugdag fir (*Abies bornmuelleriana* Mattf.) wood. *Building and Environment* **43** (4) 422-428.
- Korkut S., Akgul M., Dundar T (2008).** The effects of heat treatment on some technological properties of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) wood. *Bioresource technology* **99**(6), 1861-1868.
- Kotilainen R. A., Toivanen T. J., Alén R. J (2000).** FTIR monitoring of chemical changes in softwood during heating. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **20** (3), 307-320.
- Kotilainen R., Alén R., Toivanen T. J (2001).** Chemical changes in black alder (*Alnus glutinosa*) and European aspen (*Populus tremula*) during heating at 150–220°C under a nitrogen atmosphere. *Cellulose Chemistry and Technology* **35**, 275–284.
- Krasutsky Pavel (2006).** Birch bark research and development. *Natural product reports* **23**, 919-942.
- Lacki K et Duvnjak Z (1998).** Transformation of 3,5-dimethoxy-4- hydroxycinnamic acid by polyphenol oxidase from the fungus *Trametes versicolor*: product elucidation studies. *Biotechnology and Bioengineering* **6**, 694–703.
- Laitinen M.-L., Julkunen-Tiitto R., Yamaji K., Heinonen J., Roussi M (2004).** Variation in birch bark secondary chemistry between and within clones: Implications for herbivory by hares. *Oikos* **104** (2), 316-326.
- Larsen T. O et Frisvad J. C (1995).** Comparison of different methods for collection of volatile chemical markers from fungi. *Journal of Microbiological Methods* **24** (2), 135-44.
- Laura S. Z et Ming T (1997).** The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *Journal of Biotechnology* (**53**) 93–102.
- Lavoie Jean-Michel et Stevanovic Tatjana (2005).** Variation of Chemical Composition of the Lipophilic Extracts from Yellow Birch (*Betula alleghaniensis*) Foliage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4747-4756.
- Lee K. H., Wi S. G., Adya P., Kim S. Y. S (2004).** Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Journal of Wood Sciences* **50**, 281–284.
- Lee S. K., Lee H. J., Min H. Y., Park E. J., Lee K. M., Ahn Y. H., Cho Y. J., Pyee J. H (2005).** Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia* **76**(2), 258-260.
- Lee W.S., Baek Y. I., Kim J. R., Cho K. H., Sok D. E., Jeong T. S (2004).** Antioxidant activities of a new lignan and a neolignan from *Saururus chinensis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **14**, 5623–5628.

Références bibliographiques

- Leontievsky A. A., Myasoedova N. M., Baskunov B. P., Evans C. S., Golovleva L. A. (2000).** Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation* **11**, 331–340.
- Lindahl B. D et Finlay R. D (2006).** Activities of chitinolytic enzymes during primary and Secondary colonization of wood by basidiomycetous fungi. *New Phytologist* **169**, 389–397.
- Liu Jie (2005).** Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 92–94.
- Macheix J. J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. Collection Biologie 192 pages.
- Mammela Pirjo (2001).** Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *The Analyst* **126** (9), 1535-1538.
- Mammela P., Tuomainen A., Savolainen H., Kangas J., Vartiainen T., Lindroos L. (2001).** Determination of gallic acid in wood dust as an indicator of oak content. *Journal of environmental monitoring*. **3** (5), 509-511.
- Mammela P., Tuomainen A., Vartiainen T., Lindroos L., Kangas J., Savolainen H. (2002).** Biological monitoring of wood dust exposure in nasal lavage by high-performance liquid chromatography. *Journal of environmental monitoring* **4** (2), 187-189.
- Marchetti Véronique (1998).** Méthodologie de transformation chimique du bois: Etude des propriétés des nouveaux matériaux modifiés. Doctorat de l'université Henri Poincaré Nancy 1, spécialité sciences du bois.
- Maunu Sirkka Liisa (2002).** NMR studies of wood and wood products. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **40** (2), 151-174.
- Mariotti J. P., Costa J., Bianchini A., Bernardini A. F., Casanova, J. (1997).** Composition and variability of the essential oil of *Stachys glutinosa* L. from Corsica (France). *Flavour and Fragrance Journal* **12** (3), 205-209.
- Marques de Souza C. G., Tychaniwicz G. K., Farani de souza D., Peralta R. M (2004).** Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* **44** (2), 129–136.
- Martínez A. T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M. J., Gutiérrez A., Río, del J. C. (2005).** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, **8**, 195-204.
- Martínez-Iñigo M. J., Immerzeel P., Gutierrez A., Río, del J.C., Sierra-Alvarez R (1999).** Biodegradability of Extractives in Sapwood and Heartwood from Scots Pine by Sapstain and White Rot Fungi. *Holzforschung*. **53**, 247–252.

Références bibliographiques

- Martínez M.J., Barrasa J.M., Gutiérrez A., Río, del J.C., Martínez A. T (1999).** Fungal screening for biological removal of extractives from *Eucalyptus globulus* wood. *Canadian Journal of Botany* **77**, 1513–1522.
- Mburu Francis (2007).** Study and valorization of different Kenyan wood species. Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-1, spécialité Sciences du Bois. 140 pages.
- Mburu F., Dumarçay S., Bocquet J. F., Pétrissans M., Gérardin P (2008).** Effect of chemical modifications caused by heat treatment on mechanical properties of *Grevillea robusta* wood. *Polymer Degradation and Stability* **93**, 401-405.
- McDonald M., Mila I., Scalbert A (1996).** Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 599-606.
- Merilainen P., Lahdelma I., Oikari L., Hyotylainen T, Oikari A (2006).** Dissolution of resin acids, terpenes and wood sterols from contaminated lake sediments. *Chemosphere*. **65** 840–846.
- Messner K., Koller K., Wall M. B., Akhtar M., Scott G. M (1998).** Fungal Treatment of Wood Chips for Chemical Pulping. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, edited by Raymond A. Young and Masood Akhtar. 385-419.
- Mila I., Scalbert A., Expert D (1996).** Iron With holding by plant polyphénols and resistance to pathogens and rots. *Photochemistry* **42** (6), 1551-1555.
- Militz Holger (2002).** Thermal treatment of wood: European processes and their background. The International Research Group on Wood Preservation. IRG/WP 02-40241.
- Mille-Lindblom C., Von Wachenfeldt E., Tranvik L. J (2004).** Ergosterol as a measure of living fungal biomass: Persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* **59** (2), 253-262.
- Mohebbi Behbood (2005).** Attenuated total reflection infrared spectroscopy of white-rot decayed beech wood. *International Biodeterioration and Biodegradation* **55** (4), 247-251.
- Mouras S., Girard P., Rousset P., Permadi P., Dirol D., Labat G (2002).** Propriétés physiques de bois peu durables soumis à un traitement de pyrolyse ménagée. *Annals of Forest Sciences*. **59**, 317-326.
- Mualla Balaban (2004).** Identification of the Main Phenolic Compounds in Wood of *Ceratonia siliqua* by GC-MS. *Phytochemical Analysis* **15**, 385–388.
- Mueller D. S., Jeffers S. N., Buck J. W. (2004).** Effect of Timing of Fungicide Applications on Development of Rusts on Daylily, Geranium, and Sunflower. *Plant Disease* **88** (6) 657-661.
- Murkies A. L., Wilcox G., Davis S. R (1998).** Phytoestrogens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** (2), 297-303.
- Neve Jean (2002).** Optimization of dietary intake of anti-oxidants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **16** (4) 292-300.

- Nguila Inari G., Petrissans M., Lambert J., Ehrhardt J. J., Gérardin P (2006).** XPS characterization of wood chemical composition after heat-treatment. *Surface and Interface Analysis* **38** (10), 1336-1342.
- Nilsson K et Bjurman J (1998).** Chitin as an indicator of the biomass of two wood-decay fungi in relation to temperature, incubation time, and media composition. *Canadian Journal of Microbiology* **6**, 575–581.
- Ohmura W., Doi S., Aoyama M., Ohara S. (2000).** Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal of Wood Science* **46** (2), 149-153.
- Ossipov V., Haukioja E., Ossipova S., Hanhimaki S., Pihlaja K (2001).** Phenolic and phenolic-related factors as determinants of suitability of mountain birch leaves to an herbivorous insect. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**, 223-240.
- Ossipova S., Ossipov V., Haukioja E., Loponen J., Pihlaja K (2001).** Proanthocyanidins of Mountain Birch Leaves: Quantification and Properties. *Phytochemical. Analysis.* **12**, 128-133.
- Pandey K. K et Pitman A. J (2003).** FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation.* **52** (3), 151-160.
- Pandey K. K et Pitman A. J. (2004).** Examination of the lignin content in a softwood and a hardwood decayed by a brown-rot fungus with the acetyl bromide method and Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **42** (10), 2340-2346.
- Patzelt M., Stingl R., Teischinger A., (2002).** Termische Modifikation von Holz und deren Einfluß auf ausgewählte Holzeigenschaften, In: *Modifiziertes Holz Eigenschaften und Märkte, Lignovisionen* Band 3, pp. 101–149.
- Pensado L., Casais C., Mejuto C., Cela R (2000).** Optimization of the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from wood samples by the use of microwave energy. *Journal of Chromatography A* **869** 1-2, 505–513.
- Petrie G. A (1995).** Effects of chemicals on ascospore production by *Leptosphaeria maculans* on blackleg-infected canola stubble in Saskatchewan. *Canadian Plant Disease Survey* **75** (1), 45-50.
- Pétrissans M., Gérardin P., El Bakali I., Serraj M. (2003).** Wettability of heat-treated wood. *Holzforschung* **57** (3):301-307.
- Pétrissans M., Pétrissans A., Gérardin P (2007).** Contrôler la durabilité du bois de hêtre thermiquement. *Tracés. technologie du bois.* numero 17, pages 12- 16.
- Petterson Roger (1984).** The Chemical Composition of Wood. In: Rowell, Roger M., ed. *The chemistry of solid wood.* Advances in chemistry series 207 Washington,: DC American Chemical society chap 2.
- Prida A et Puech J. L (2006).** Influence of Geographical Origin and Botanical Species on the Content of Extractives in American, French, and East European Oak Woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8115-8126.

Références bibliographiques

- Rabinovich M. L., Bolobova A. V., Vasil'chenko L. G (2004).** Fungal decomposition of natural aromatic structure and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **40** (1), 1-17.
- Rapp A.O., Brischke C., Welzbacher C. R. (2006).** Interrelationship between the severity of heat treatments and sieve fractions after impact ball milling: a mechanical test for quality control of thermally modified wood. *Holzforschung* **60**, 64-70.
- Raven P., Ray F. E., Susan E. E. (2000).** *Biologie végétale*. Editions De Boeck Université. 944 Pages.
- Rémond Romain (2004).** Approche déterministe du séchage des avivés de résineux de fortes épaisseurs pour proposer des conduites industrielles adaptées. Thèse de l'université de Nancy 1, Spécialité: Sciences forestières et du bois, 205 pages.
- Repellin V et Guyonnet R (2005).** Evaluation of heat-treated wood swelling by differential scanning calorimetry in relation to chemical composition. *Holzforschung*. **59** (1), 28-34.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G (1997).** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* **2** (4), 152 -159.
- Richardson M. D et Logendra S. (1997).** Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3903-3907.
- Ridley D. D., Ritchie E., Taylor W. C (1968).** Chemical studies of the Protaceae II. Constituents of *Grevillea robusta*; the synthesis of (n-tridecylresorcinol (grevillol) and related substances, *Australian Journal of Chemistry* **21**(12), 2979-2988.
- Rio, del J. C., Romero J., Gutierrez A (2000).** Analysis of pitch deposits produced in Kraft pulp mills using a totally chlorine free bleaching sequence. *Journal of Chromatography A* **874**, 235 - 245.
- Rio, del J. C., Gutierrez A., Martinez M. J., Martinez A T (2001).** Py - GC / MS study of *Eucalyptus globulus* wood treated with different fungi. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **58-59**, 441-452.
- Rio, del J. C., Speranza M., Gutierrez A., Martinez M. J., Martinez A. T (2002).** Lignin attack during eucalypt wood decay by selected Basidiomycetes: A Py-GC/MS study. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **64** (2), 421-431.
- Ritchie E., Taylor W.C., Vautin S. Protaceae I. (1965).** *Grevillea robusta* and *Orites excelsa*, *Australian Journal of Chemistry* **18**(12), 2015-2020.
- Ritschkoff Anne-Christine (1996).** Decay mechanisms of brown rot-fungi. Ph D of Faculty of science of Helsinki university.
- Roberts A. F (1970).** Kinetic behaviour of intermediate compounds during the pyrolysis of cellulose. *Journal of Applied Polymer Science* **14** (1), 244-247.
- Ropp Julien (2007).** Traitement thermique du bois par conduction. Tracés. technologie du bois numero 17, 8 -10.

Références bibliographiques

- Rousset Patrick (2004).** Choix et validation expérimentale d'un modèle de pyrolyse pour le bois traité par haute température : de la micro-particule au bois massif. thèse de l'ENGREF Spécialité: Sciences forestières et du bois. 182 pages.
- Rowell R. M., Pettersen R., Han J. S., Rowell J. S., Tshabalala M. A (2005).** Cell Wall Chemistry. Handbook of wood chemistry and wood composites / edited by Roger M. Rowell.
- Salgueiro L., Vila R., Tomas X., Tomi F., Canigueral S., Casanova J., Proenca da Cunha A., Adzet, T (1995).** Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. Photochemistry **38** (2), 391-396.
- Salgueiro L. R., Proença Da Cunha A., Tomas X., Canigueral S., Adzet T., Vila R (1997).** The essential oil of *Thymus villosus* L. ssp. *villosus* and its chemical polymorphism. Flavour and Fragrance Journal **12** (2), 117-122.
- Santos-Buelga C et Scalbert A (2000).** Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture **80**, 1094-1117.
- Santos J. A (2000).** Mechanical behaviour of Eucalyptus wood modified by heat. Wood Sciences and Technology **34**:39-43.
- Scalbert A., Monties B., Janin G (1989).** Tannins in Wood: Comparison of Different Estimation Methods. J. Agric. Food Chem. **37** (5), 1324-1329.
- Schofield P., Mbugua D. M., Pell A. N. (2001).** Analysis of condensed tannins : a review. Animal Feed Science and Technology. **91** (1-2), 21-40.
- Sethuraman A., Akin D. E., Eisele J. G., Eriksson K. E. L (1998).** Effect of aromatic compounds on growth and ligninolytic enzyme production of two white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. Canadian Journal of Microbiology **44** 872–885.
- Sinn G., Reiterer A., Stanzel-Tschegg S. E. (2001).** Surface analysis of different wood species using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Journal of Materials Science **36**, 4673–4686.
- Sivonen H., Maunu S L., Sundholm F., Jämsä S., Viitaniemi P (2002).** Magnetic Resonance Studies of Thermally Modified Wood. Holzforschung **56**, 648–654.
- Sjostrom Eero (1993).** Wood Chemistry – Fundamentals and Applications. 2. Ed., pp 51–108. San Diego, USA, Academic Press.
- Solár R., Kurjatko S., Mamon M., Košíková B., Neuschlová E., Vybohová E., Hudec J (2007).** Selected properties of beech wood degraded by brown-rot fungus *Coniophora puteana*. Drvna Industrija. **58** (1), 3-11.
- Surowiec I., Nowik W., Trojanowicz M. (2004).** Identification of “insoluble” red dyewoods by high performance liquid chromatography–photodiode array detection (HPLC-PDA) finger printing. Journal of separation science **27**, 209–216.

- Sundqvist B., Karlsson O., Westermark U (2006).** Determination of formic-acid and acetic acid concentrations formed during hydrothermal treatment of birch wood and its relation to colour, strength and hardness. *Wood Sciences and Technology* **40**, 549–561.
- Sutherland G. R. J et Aust S. D (1998).** Degradation of polymers and phenols by white rot fungi. INRA editions, Paris. *Polyphénols* **96**,151–163.
- TAPPI method T 222 om-83 (1999).** Acid-insoluble lignin in wood and pulp. In: *Test Methods 1998–1999*. TAPPI Press, Atlanta, USA.
- Tenkanen M., Buchert J., Viikari L (1995).** Binding of hemicellulases on isolated polysaccharide substrates. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 499-505.
- Thermo Wood® Handbook (2003).** www.thermowood.fi
- Thulasidas P. K et Bhat K. M (2007).** Chemical extractive compounds determining the brown-rot decay resistance of teak wood. *Holz als Roh- und Werkstoff* **65** (2), 121-124.
- Tjeerdsma B. F., Boonstra M., Pizzi A., Tekely P., Militz H (1998).** Characterisation of thermally modified wood: Molecular reasons for wood performance improvement. *Holz als Roh- und Werkst* **56**, 149–153.
- Toure O., Chahal P.S., Ishaque M., Chahal D. S (1997).** Biodegradation of phenol with two basidiomycetous white-rot fungi. *Studies in environmental science. Global Environmental Biotechnology* **66**, 649–663.
- Tsujiyama Sho Ichi (2003).** Effect of vanillin on the production of wood-decomposing enzymes from a wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*. *Mycoscience* **44** (4), 345-350.
- Unsal O et Ayrimis N (2005).** Variations in compression strength and surface roughness of heat treated Turkish river gum (*Eucalyptus camaldulensis*) wood. *Journal of Wood Sciences* **51**, 405-409.
- Veluri R., Weir T. L., Bais H. P., Stermitz F. R., Vivanco J. M (2004).** Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** (5), 1077-1082.
- Venalainen M., Anni M., Saranpa H. P., Kainulainen P., Tiitta M., Velling P. (2004).** The concentration of phenolics in brown-rot decay resistant and susceptible Scots pine heartwood. *Wood Sciences and Technology*. **38**, 109–118.
- Verscheure M., Lognay G., Marlier M (2002).** Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **6** (3), 131-142.
- Von Eggelkrau-Gottanka S. G., Abu Abed S., Muller W., Schmidt, P. C (2002).** Quantitative analysis of the active components and the By products of eight dry extracts of *Hypericum perforatum* L. (St John's Wort). *Phytochemical Analysis* **13** (3), 170-176.
- Wang Y., Lee K W., Chan F.L., Chen S., Leung L. K. (2006).** The Red Wine Polyphenol Resveratrol Displays Bi-level Inhibition on Aromatase in Breast Cancer Cells. *Toxicological Sciences*. **92** (1), 71-77.

- Weiland J. J.; Guyonnet, R (2001).** Physicochemical study of a thermal treatment of wood. Récents Progrès en Genie des Procèdes **15** (88, Elaboration et Traitement des Matériaux), 195-202.
- Weiland J.J et Guyonnet R (2003).** Study of chemical modifications and fungi degradation of thermally modified wood using DRIFT spectroscopy. Holz Roh- Werkst **61**, 216-220.
- Wikberg H et Maunu S. L (2004).** Characterisation of thermally modified hard- and soft woods by ¹³C CPMAS NMR. Carbohydrate Polymers **58**, 461–466.
- Williams F. C et Hale M. D (1999).** The Resistance of Wood Chemically Modified with Isocyanates. Holzforschung **53**, 230–236.
- Willfor S., Hemming J., Reunanen M., Eckerman C., Holmbom B (2003).** Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stem wood. Holzforschung **57** (1), 27-36.
- Willfor S., Nisula L., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B (2004).** Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stem wood of different spruce species. Holzforschung **58** (4), 335-344.
- Windeisen E., Strobel C., Wegener G (2007).** Chemical changes during the production of thermo-treated beech wood, Wood Sciences and Technology **41**, 523–536.
- Wu Y. O., Tsuchikawa S., Hayashi K (2005).** Application of near infrared spectroscopy to assessments of colour change in plantation-grown *Eucalyptus grandis* wood subjected to heat and steaming treatments. Journal of Near Infrared Spectroscopy **13** (5), 371-376.
- Xiao Y et Kreber B (1999).** Effect of IPBC / DDAC on spore germination and hyphal growth of the sap staining fungus *Ophiostoma piceae*. Holzforschung **53** (3), 237-243.
- Yildiz Sibel (2002).** Effects of heat treatment on water repellence and anti-swelling efficiency of beech wood. International Research Group on wood preservation. Document n° IRG/WP 02-40223.
- Yildiz S., Gezer E. D., Yildiz U. C (2006).** Mechanical and chemical behaviour of spruce wood modified by heat. Building and Environment **41**, 1762-1766.
- Yildiz, S., Gumuskaya, E (2007).** The effects of thermal modification on crystalline structure of cellulose in soft and hardwood. Building and Environment **42** (1), 62-67.
- Yilgor Nural., Unsal Oner., Kartal S Nami (2001).** Mechanical, and chemical properties of steamed beech wood.(Fundamental disciplines). Forest Product Journal **51** (11–12), 89-93.
- Zawadzki J et Wisniewski M (2002).** ¹³C NMR study of cellulose thermal treatment. J. Anal. Appl Pyrolysis. **62**,111-121.
- Zule J et Moze A (2003).** GC analysis of extractive compounds in beech wood. Journal of Séparation Science **26** (14), 1292-1294.

Annexes

Annexe 1: Investigation on catechin as a beech wood decay biomarker

Investigation on catechin as a beech wood decay biomarker

Steeve MOUNGUENGUI, Stéphane DUMARÇAY*, Philippe GÉRARDIN

Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR_A 1093, Nancy Universités, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandœuvre-les-Nancy, France

Received 22 November 2006; received in revised form 26 March 2007; accepted 27 March 2007
Available online 25 May 2007

Abstract

A high-performance liquid chromatography (HPLC) method based on the evolution of wood extractives was developed to follow the first stages of fungal degradation of beech wood exposed to *Coriolus versicolor*. The nature and the quantity of the extracts initially present in wood depended on the extraction conditions and also on the wood-drying conditions (time and temperature). The most interesting fraction was Soxhlet extracted with acetone at 56 °C for 6 h. The best conditions to avoid extractives degradation consisted of a moderate drying at 55 °C for 48 h allowing identification of catechin as potential tracer. After 2 weeks of wood blocks exposure to *C. versicolor*, analysis of their acetonic extractives showed that catechin signal initially detected in beech wood, had totally disappeared. Treatment of wood with an appropriate fungicide such as propiconazole before exposure to *C. versicolor*, prevents the catechin amount from any variation. The comparison of these results with the classical weight loss (WL) measurements obtained after long-time experiments on treated and untreated wood blocks shows that the catechin amount evolution, monitored during 2 weeks, correlates with the wood resistance evaluated during 16 weeks, allowing the use of this flavonoid as a valuable biomarker of wood decay.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Beech; Biomarker; Catechin; *Coriolus versicolor*; HPLC; Wood decay

1. Introduction

Evaluation of the effects of chemical or physico-chemical treatments on wood durability to fungi involves generally long-duration experiments based on degradation of wood macromolecules. In Europe, these studies have to be carried out following standardized procedures like the EN 113 for the white or brown rots or ENV 807 for the soft rots. More generally, different procedures derived from the preceding standards have been developed and used in numerous studies. A very inconvenient point of all these procedures lies in the important culture's delays before measuring the weight loss (WL) of the wood samples, which is the most useful variable allowing to quantify the influence of a treatment on the fungal decay. Depending on the rot type and wood species targeted in the standard, the

experiment time extends for 16 weeks. In some cases, this time can appear as excessive when the purpose of the experiment is simply to validate rapidly the efficiency of new fungicide or to check a scientific idea or the validity of a new theory.

Therefore, it seemed highly suitable to develop fast and reliable methods able to indicate the trend of treatment effects, providing earlier stage feedback informations thus confirming a good investigations direction or, at the opposite, forcing a strategy change for the further experiments. Among the different wood species used to evaluate the efficiency of wood preservatives against wood destroying fungi, beech is commonly used to evaluate the influence of white rot due to its low natural durability and its high treatability justifying the choice of this species for the present study.

The high-performance liquid chromatography (HPLC) detection and titration of specific biomolecules characteristics of wood fungal colonization or degradation could be a convenient approach to follow early stages of wood degradation. Actually, three main categories of fungal

*Corresponding author. Tel.: +33 03 83 68 48 40;
fax: +33 03 83 68 48 34.

E-mail address: Stephane.Dumarçay@lermab.uhp-nancy.fr
(S. Dumarçay).

biomarkers have been described in the literature. The first category concerns investigations on biomarkers characteristics of the fungal cellular growth. Thus, the chitin from brown rot and soft rot fungi has been determined through glucosamine titration. Constituting the main component of the cell walls of fungi, its measurement has been correlated with the fungal biomass production and therefore with the decaying activity (Nilsson and Bjurman, 1998). Due to its important occurrence in the membrane of various kinds of mycetes, ergosterol has also been used as a valuable indicator of a plant tissue colonization. Moreover, a good correlation has been observed between the measured concentration and the instantaneous fungal growth rate (Gessner and Schmitt, 1996). The second approach concerns the detection of generation of wood polymer derivatives due to the decaying processes. The degradation mechanisms of wood macromolecules have been extensively studied, particularly in the case of lignin because of the potential industrial applications of degradation. On one hand, enzymatic degradation of lignin could lead to an interesting enhancement of kraft pulp bleaching (Buchert et al., 2002) or could even act as depolluting agents against xenobiotics, most of them having an halogenated aromatic structure (Rabinovich et al., 2004; Toure et al., 1997). It has been demonstrated that several types of extracellular enzymes are generally involved in the lignin degradation processes (the peroxidases like lignin or manganese peroxidases and oxidases like laccases). Despite important investigations, no lignin specific degradation products have been clearly identified. On the other hand, the effects of lignolytic enzymes on lower molecular weight compounds are better known. These smaller molecules can be easily extracted from wood with various solvents, depending mainly on their polarity and, therefore, they are called extractives. They are constituted by a wide range of precursors, intermediates and by-products of the wood metabolism including several classes of organic compounds like sugars, flavonoids, tannins, terpenes, fats or waxes. Action of lignolytic enzymes on phenolic extractives can produce some characteristic compounds like the 2,6-dimethoxy-*para*-benzoquinone and dehydrodisinapic acid dilactone obtained by the sinapic acid oxidation (Lacki and Duvnjak, 1998), or veratrole resulting either from phenylalanine deamination and metabolisation or from alternative sources including phenylpropanoid derivatives like matairesinol (Rabinovich et al., 2004). The third category takes advantage of the need of enzymatic systems of mediators to perform oxidation reactions. Such mediators can be considered as specific messengers of the enzymatic decaying activity. The veratryl alcohol, involved in numerous reactions of lignin degradation (Sutherland and Aust, 1998), could be a good candidate and it is easily characterised in extractives because of its aromatic structure.

Among all these possibilities, catechin, a well-known extractive of beech wood, generally used for evaluating the fungicidal activity of preservation treatments, has been

selected with the aim of correlating its abundance with the wood durability exposed to a white-rot fungus attack. This choice presented several advantages: catechin is known to be degraded by numerous fungal strains (Aguilar et al., 2004) and particularly by an enzyme preparation from *C. versicolor* (Archambault et al., 1996) and it is easily separated and detected by liquid chromatography using UV detection as reported in numerous publications (Bronner and Beecher, 1998; Rodriguez-Delgado et al., 2001).

2. Experimental

2.1. Chemicals

Acetone from LPCR (Schiltigheim, France) was distilled with KMnO₄ before using. Trifluoroacetic acid (TFA) 99% and agar powder for biochemistry were obtained from Acros Organics (Halluin, France). Methanol Classic CLHP grade was purchased from Carlo Erba Réactifs-SDS (Val de Reuil, France). (+)-catechin 98% was obtained from Fluka. Malt extract was purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Water was distilled then deionised with Milli-Q Plus ultra-pure water system (Millipore, Saint Quentin-en Yvelines, France).

Protocatechuic acid, vanillic acid, vanillin, syringic acid, coniferaldehyde, synapic acid, 2,6-dimethoxybenzoquinone, 3,5-dimethoxybenzaldehyde were kindly provided by Crittbois (Epinal-France).

2.2. Decay studies

Decay resistance was studied using a malt agar plate decay test that is a modification of the standardised EN 113 test. The white-rot basidiomycete *C. versicolor* was used in this study. Sterile culture medium (20 mL), prepared from malt (30 g) and agar (40 g) in distilled water (1.0 L), were placed on 9.0 cm Petri dishes, inoculated with fungus and incubated for 1 week at 22 °C and relative humidity (RH) of 70% to allow colonization of the medium by the mycelium.

Beech (*Fagus sylvatica*) heartwood was used for this study. Blocks of 15 × 5 × 25 mm in radial, tangential and longitudinal directions, respectively, were dried at 55 °C for 48 h and weighed (m_0). Dried blocks (70 replicates) were placed in a 500 mL beaker inside a dessicator equipped with a two-way tap and subjected to a 5 mbar vacuum for 20 min. Blocks were then impregnated by suction either with 350 mL of a 10⁻² M (3.42 g L⁻¹, 23.3 mN m⁻¹) propiconazole solution in ethanol or with ethanol (23.4 mN m⁻¹) in the case of controls. The weight gain observed after impregnation, corresponding to the fungicide retention was of 0.35%. Superficial tensions were measured at 25 °C with a K12 tensiometer (Krüss, Hamburg, Germany). After 2 h of soaking, the blocks were removed and dried at room temperature overnight. Five UV-sterilized wood blocks (treated or untreated) were then placed in each Petri dish under sterile conditions. Incubation was carried out at 22 °C and 70% RH for 4 weeks. Every 5 days, two Petri dishes were taken off, wood blocks scrapped free of mycelium, dried at 55 °C for 48 h and weighed (m_1). The WL due to fungal attack was expressed according to the following formula:

$$WL(\%) = [(m_0 - m_1)/m_0] \times 100,$$

where m_0 is the initial dried mass and m_1 is the dried mass after exposure to *C. versicolor*.

2.3. Extraction

After the different times of exposure to fungus, each series of blocks were grounded and sawdust (3 g) was Soxhlet extracted with acetone for 6 h. The solvent was evaporated under vacuum and the extracts were weighed.

Table 1
Evolution of the mobil phase composition with the time

Time (min)	A ^a	B ^b
0	100	0
5	95	5
45	70	30
60	30	70
65	0	100
70	100	0
80	100	0

^aA = H₂O with 0.05% TFA.

^bB = MeOH with 0.05% TFA.

2.4. Analysis

The analyses were performed on a Waters liquid chromatograph (Waters SAS, Saint Quentin-en Yvelines, France) equipped with a system controller 600E, a manual injector system with a 20 μ L loop and a Waters 2996 photo diode array detector. Data were recorded through the Empower software on a 200–400 nm range, the presented chromatograms being extractions at 280 nm of the whole collected data. The analytical measurements were obtained on a Supelco (Sigma-Aldrich Chimie sarl, Saint Quentin Fallavier, France) Discovery C18 column (250 mm \times 4,6 mm i.d.) kept at 30 °C with a mobil phase flow rate of 1 mL min⁻¹.

The calibration curve was constructed with solutions of commercially available catechin containing 10, 25, 50 and 100 μ g mL⁻¹. The samples

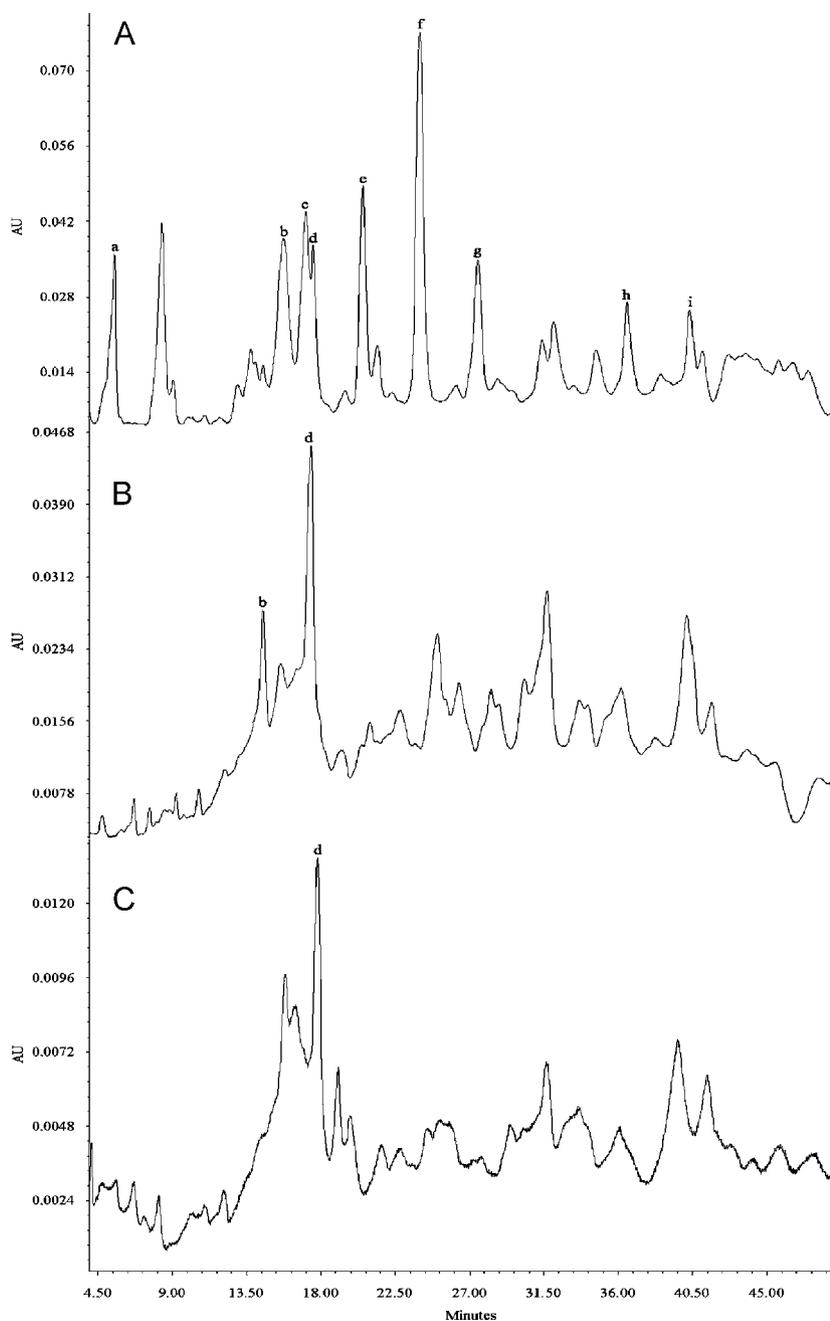


Fig. 1. Acetonetic extractives chromatograms at 280nm of wood beech dried at 103 °C (A), undried (B) and dried at 55 °C (C) Peak identities: a = protocatechuic acid, b = 2,6-dimethoxybenzoquinone, c = vanillic acid, d = catechin, e = vanillin, f = syringic acid, g = 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde, h = coniferaldehyde, i = synapic acid.

were prepared to get an extractives concentration of 2 mg mL^{-1} in methyl alcohol.

The chromatographic separation was carried out using mobile phase water containing 0.05% of TFA as solvent A and methanol containing 0.05% of TFA as solvent B with the following gradient programme (Table 1).

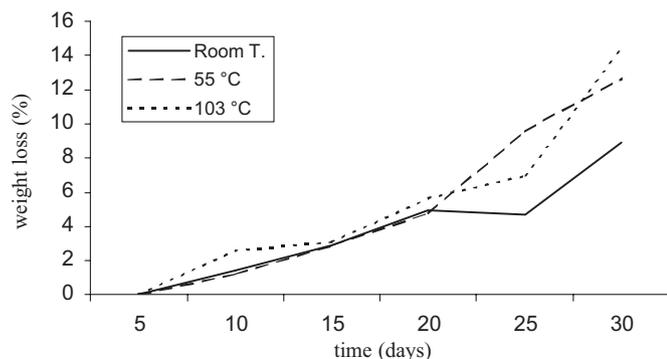


Fig. 2. Influence of the blocks drying temperature on the beech durability versus *C. versicolor*.

3. Results and discussion

3.1. Definition of drying conditions

The first step of this study was to define precisely the optimal experimental conditions to perform extractives analysis. It is generally accepted that the wood-drying temperature is crucial for wood extractives characteristics. However, in spite of the thermal instability of some extracts, drying temperature of $103 \text{ }^{\circ}\text{C}$ was generally used to ensure complete removal of water and mass measurements. It was, therefore, crucial to define the mildest conditions possible to avoid any source of extractives amount variation due to the experimental manipulations. For this purpose, extractives obtained with and without drying at $103 \text{ }^{\circ}\text{C}$ were analyzed. Fig. 1 presents the typical chromatograms at 280 nm obtained for dried (A) and undried (B) samples.

A very clear difference is observed between these two chromatograms. Many of the compounds detected in the chromatogram of extractives obtained after wood drying at

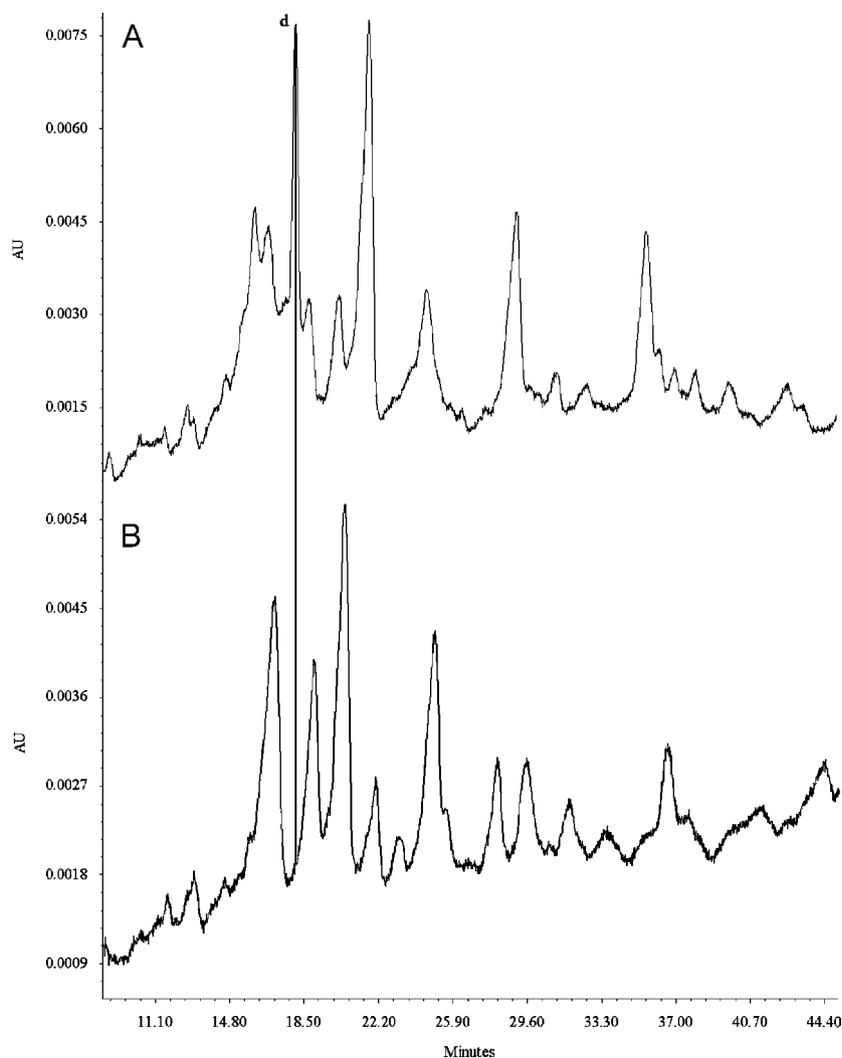


Fig. 3. Acetic extractives chromatograms of unprotected beech blocks after the fifth (A) and 30th (B) day on *C. versicolor* culture at 280 nm .

103 °C have been identified (Fig. 1(A)). However, the most were absent in the extractives obtained without drying (Fig. 1(B)). Concerning 2,6-dimethoxybenzoquinone (b) and catechin (d), two products determined in both cases, the measured concentrations were highly different. Moreover, catechin peak (d) was partly hidden in the first case due to the presence of other products with similar retention times disturbing the titration efficiency. These results clearly show the influence of drying conditions on the characteristics and nature of compounds present in extractives confirming the importance of the experiment on extractive analysis. Several attempts have been made to find the optimal temperature and time of drying, allowing simultaneously to reach the usual dehydration level, considered as equivalent to the WL without degrading the extractives. Beech blocks dried at 55 °C for 48 h, achieved WL similar to the conventional drying at 103 °C with an extractives contents relatively close to that of undried beech (Fig. 1(C)).

Although, there was no perfectly identical profile with the reference chromatogram of undried beech, the chromatogram of the extractives subjected to milder drying conditions, exhibited similar appearance meaning that the new conditions did not affect the characteristics of extracts. The catechin signal seemed to be unaltered and remained one of the most important components in terms of amount, allowing a relatively intense response with UV detection.

To validate definitely these new drying conditions and the possible effect of the extractives modification on durability, experiments were carried out to compare the durability of the blocks treated in these conditions and those dried at 103 °C (Fig. 2).

The comparison of these three curves showed that extractive analysis of the mild dried blocks compared with the results obtained from wood dried at room temperature. Important similarities were observed for the three curves though some small differences appeared after the 21st days of the experiments. According to these results, it was

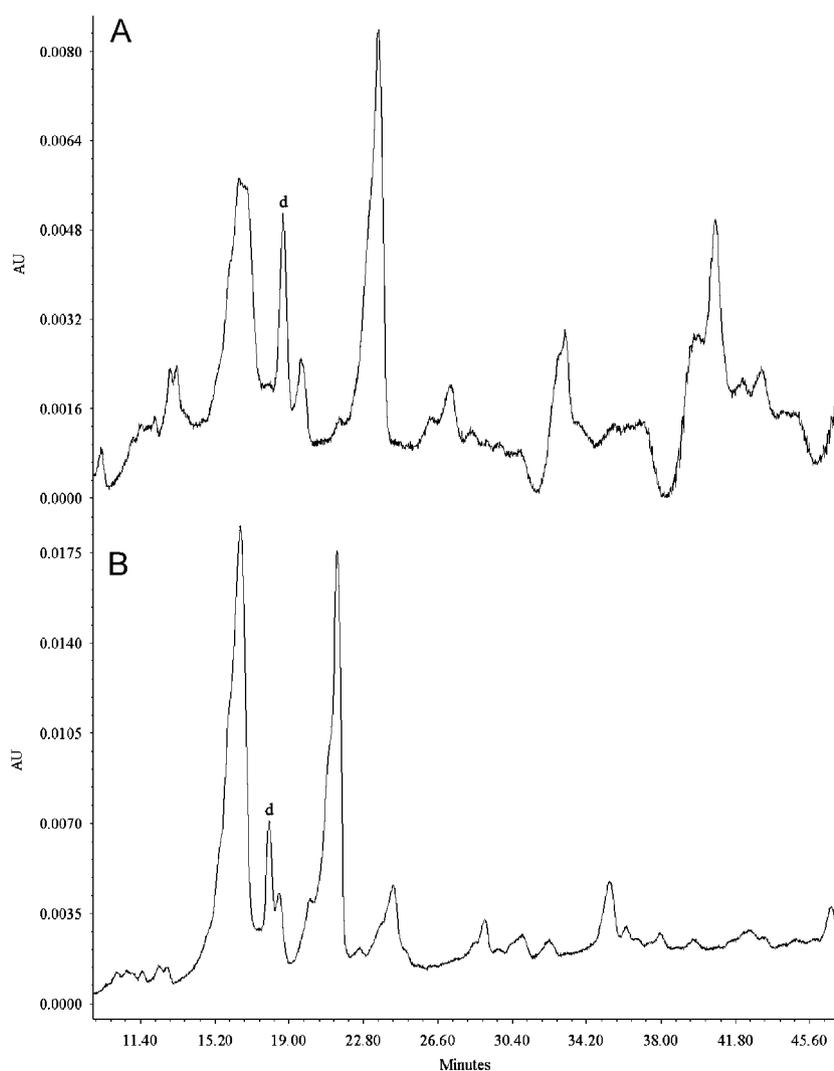


Fig. 4. Acetonic extractives chromatograms of propiconazole impregnated beech blocks after the fifth (A) and 30th (B) day on *C. versicolor* culture at 280 nm.

decided to retain the temperature of 55 °C for 48 h as the best drying conditions.

3.2. Extractives evolution under fungal action

Two series of beech blocks were then exposed to *C. versicolor* for a maximum duration of 30 days. These blocks were differently prepared with only one cycle of vacuum/pressure impregnation: one half was impregnated with a 10⁻² M solution of propiconazole in ethanol, a powerful fungicide, while the other half was impregnated with ethanol. In this case, it was expected that the extractives of untreated blocks were subjected to fungal degradation, while those of propiconazole protected blocks remained unchanged. Evolution of the extractives content was investigated every 5 days for both blocks series. The fifth and 30th day chromatograms are presented below (Figs. 3 and 4).

A direct interpretation is difficult because of the difference between the chromatographic profile of each analysis. However, in the case of the propiconazole-protected blocks (Fig. 4), it was possible to recognize the original catechin signal with new additional peaks increasing with the experiment time. Quantification of the catechin signal indicated a constant adsorption value despite a slight shift of its retention time.

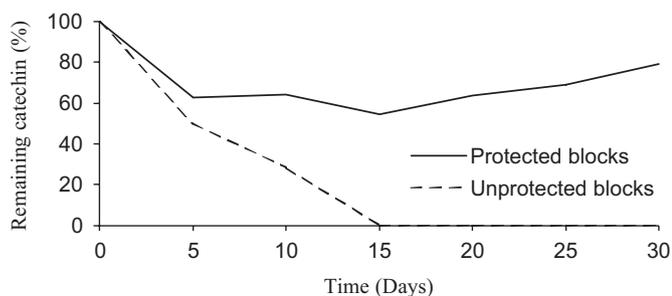


Fig. 5. Catechin concentration evolution for control and propiconazole protected blocks exposed to *C. versicolor*.

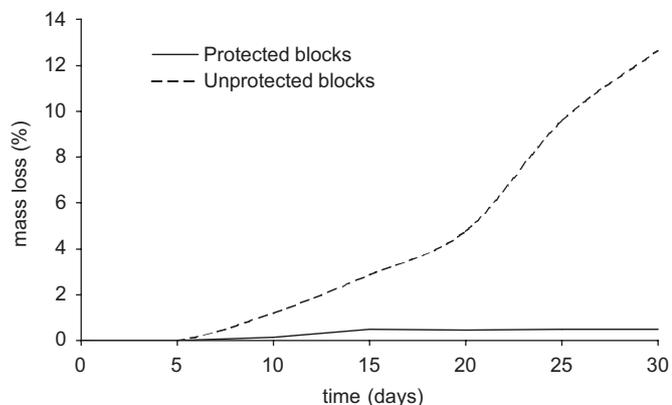


Fig. 6. Mass loss measurements for control and propiconazole protected blocks exposed to *C. versicolor*.

Nevertheless, the signal of catechin totally disappeared after 30 days on the chromatogram of unprotected blocks (Fig. 3). The catechin concentration decreased with time as determined by its titration (Fig. 5). A small decrease of the catechin concentration was observed during the first 5 days, probably as the results of the attempts of wood colonization by the fungus. After this period, catechin concentration remained constant due to the inhibition of fungal activity by propiconazole. These results clearly demonstrated that *C. versicolor* degraded or modified catechin rapidly, during the first stage of fungal colonization and wood degradation, while the latter remained unchanged in presence of fungicide protection.

Comparison of the general aspect of catechin concentration curves with the mass loss measurement curves obtained with the same blocks (Fig. 6) indicated a quite opposite behaviour of these two parameters for the untreated wood. The same comparison performed in the case of propiconazole-protected blocks indicated a similar behaviour of the two preceding parameters, which remained practically constant with time. These results confirmed the statement of a possible earlier wood decay detection using catechin as marker.

4. Conclusion

The present work demonstrated clearly that qualitatively, there is correlation between the amount of catechin present in the extractives of beech wood and the WL due to fungal decay caused by *C. versicolor*. The presence of catechin in the extracts after one month of exposure to white-rot fungus is a good indicator of the effectiveness of fungicidal treatment realized with propiconazole known for its fungicidal properties. Due to the simplicity of separation and quantification of catechin by HPLC, this method could be considered as a fast and reliable tool to quantify the influence of any treatment aiming to improve wood durability. Further studies are, however, necessary to generalize this methodology using different fungicides.

References

- Aguilar, C.N., Cruz, M., Rodriguez, R., Gutierrez-Sanchez, G., Ramirez-Coronel, A., Augur, C., 2004. Catechin degradation by several strains isolated from mexican desert. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 426–429.
- Archambault, J., Lacki, K., Duvnjak, Z., 1996. Conversion of catechin and tannic acid by an enzyme preparation from *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters* 7, 771–774.
- Bronner, W.E., Beecher, G.R., 1998. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 805, 137–142.
- Buchert, J., Mustranta, A., Tamminen, T., Spetz, P., 2002. Modification of spruce lignans with *Trametes hirsuta* laccase. *Holzforchung* 6, 579–584.
- Gessner, M.O., Schmitt, A.L., 1996. Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 2, 415–419.

- Lacki, K., Duvnjak, Z., 1998. Transformation of 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid by polyphenol oxidase from the fungus *Trametes versicolor*: product elucidation studies. *Biotechnology and Bioengineering* 6, 694–703.
- Nilsson, K., Bjurman, J., 1998. Chitin as an indicator of the biomass of two wood-decay fungi in relation to temperature, incubation time, and media composition. *Canadian Journal of Microbiology* 6, 575–581.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasilchenko, L.G., 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 1, 1–17.
- Rodriguez-Delgado, M.A., Malovana, S., Perez, J.P., Borges, T., Garcia Montelongo, F.J., 2001. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography, A* 912, 249–257.
- Sutherland, G.R.J., Aust, S.D., 1998. Degradation of polymers and phenols by white rot fungi. INRA editions, Paris. *Polyphenols* 96, 151–163.
- Toure, O., Chahal, P.S., Ishaque, M., Chahal, D.S., 1997. Biodegradation of phenol with two basidiomycetous white-rot fungi. *Studies in environmental science. Global Environmental Biotechnology* 66, 649–663.

Annexe 2: Evidence of char formation during wood heat treatment by mild pyrolysis

Evidence of char formation during wood heat treatment by mild pyrolysis

Gildas Nguila Inari, Steeve MOUNGUENGUI, Stéphane DUMARÇAY,
Mathieu PÉTRISSANS, Philippe GÉRARDIN*

*Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR_A 1093, Nancy Universités, Faculté des Sciences et Techniques,
BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

Received 30 January 2007; accepted 5 March 2007

Available online 16 March 2007

Abstract

The behaviour of wood polymers during heat treatment carried out under inert atmosphere at 240 °C has been reinvestigated to understand the important decrease of the O/C ratio observed in a previous study using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Heat treatment was performed not only on beech sawdust but also on its lignin and holocellulose fractions obtained after acidic hydrolysis of polysaccharides or delignification with sodium chlorite. CP/MAS ¹³C NMR spectra indicate as previously reported an important degradation of hemicelluloses after thermal treatment. However, assignments of the signals appearing in the range of 125–135 ppm and 35 ppm attributed up to now to thermal crosslinking of lignin and formation of methylene bridges should be reconsidered. Indeed, heat treatment of the holocellulose fraction indicates quite similar signals showing that these latter are not due to lignin modification. According to the literature, these new signals have been attributed to the beginning of char formation. Determination of Klason lignin and HPLC analysis of the sugars contained in the hydrolysate support the hypothesis of formation of carbonaceous materials within the wood structure during heat treatment by mild pyrolysis.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Char; ¹³C NMR; Heat treatment; Holocellulose; Lignin; Wood

1. Introduction

Increased environmental pressures over the last few years in many European countries resulted in an important development of thermally modified wood, as a non-biocidal alternative to classical preservation techniques [1,2]. Heat treated wood possesses new properties like improved decay resistance and higher dimensional stability while its strength is considerably reduced [3–10]. Heat treated wood also exhibits lower affinity to water and a strongly modified wettability [11,12]. Chemical modifications occurring during heat treatment are believed to be in great part responsible for the new properties of the material and have been widely investigated using

different spectroscopic methods. Among these, CP/MAS ¹³C NMR has been intensively used to characterize wood polymer modifications before and after heat treatments [3,5,9,13]. The main conclusions of these studies reveal an important degradation of less ordered carbohydrates (i.e. hemicelluloses and amorphous cellulose) resulting in an increase of cellulose crystallinity in heat treated wood, while lignin presents smaller modifications. Acid degradation catalysed by formation of acetic acid during hemicellulose degradation results in the formation of furfural, aldehydes and other volatile by-products as well as some lignin modifications due to β-O-4 ether linkage cleavage and aromatic nuclei demethoxylation followed by auto-condensation reactions with formation of methylene bridges. XPS analysis of heat treated wood performed recently in our laboratory indicates an important decrease of the O/C ratio after heat treatment [14] which cannot be explained by the sole evolution of wood polymers previously described in

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)3 83 68 48 40; fax: +33 (0)3 83 68 48 51.
E-mail address: philippe.gerardin@lermab.uhp-nancy.fr (P. Gérardin).

the literature (i.e. degradation of hemicelluloses to volatile by-products and thermal crosslinking of lignin). This study shows that O/C ratios measured for beech wood are in reasonable agreement with the O/C ratio calculated from the well-established chemical composition reported in the literature. Even if the analyzed area of the sample is relatively small (0.25 mm², up to 10 nm depth), analysis of different spots taken on a same sample and on different samples of a same plank indicates quite similar results demonstrating reliability and reproducibility of the XPS method. The aim of the present paper is to reinvestigate not only chemical modifications occurring during heat treatment using wood, but also its lignin and holocellulose fractions obtained after acidic hydrolysis of polysaccharides or delignification with sodium chlorite.

2. Materials and methods

Beech (*Fagus sylvatica* L.) heartwood was ground and passed through different sieves to obtain a granulometry between 0.2 and 0.5 mm. The sawdust thus obtained was washed in a Soxhlet extractor with a toluene/ethanol (2:1, v/v) mixture (6 h) and with ethanol (6 h) and then dried at 103 °C for 48 h.

2.1. Separation of lignin and holocellulose

2.1.1. Delignification

Sawdust of 500 mg was placed in a 100 ml flask containing 30 ml of distilled water and heated at 75 °C. A solution of 15% aqueous sodium chlorite (2 ml) and acetic acid (0.1 ml) was then added each hour for 7 h. The mixture was filtered on a Büchner funnel and the residue washed with water, Soxhlet extracted for 2 h with ethanol and dried at 103 °C to a constant mass.

2.1.2. Hydrolysis of holocellulose

Sawdust of 500 mg was mixed with 72% H₂SO₄ (10 ml) for 4 h at room temperature. The mixture was then diluted with 240 ml of distilled water, heated under reflux for 4 h and filtered. The residue was washed with hot water and dried at 103 °C to a constant mass.

2.2. Heat treatment

Heat treatment was performed on sawdust or on its lignin or holocellulose fractions previously dried at 103 °C for 48 h. The sample was placed in a reactor under nitrogen and heated at 240 °C in an oven for different times. The oven temperature was increased by 20 °C min⁻¹ from ambient to final temperature. Weight loss of the sample due to chemical degradation during heat treatment was calculated according to the formula:

$$WL(\%) = 100(m_0 - m_1)/m_0$$

where m_0 is the initial oven dried mass of the sample before heat treatment and m_1 the oven dried mass of the same sample after heat treatment. The different treatments are summarized in Fig. 1.

2.3. CP/MAS ¹³C NMR analysis

Solid state CP/MAS (cross-polarisation/magic angle spinning) ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker MSL 300 spectrometer at a frequency of 75.47 MHz. Acquisition time was 0.026 s with number of transients of about 1200. All the spectra were run with a relaxation delay of 5 s, CP time of 1 ms and spectral width of 20,000 Hz. Spinning rates were 5 KHz. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm).

2.4. Hydrolytic method for analysis of carbohydrates

Dried, extractive-free sawdust of 350 mg was mixed with 4 ml of 72% sulphuric acid and stirred at room temperature for 1 h. After this period, 60 ml of distilled water was added and the mixture heated under reflux for different time (1, 2, 3, 4 or 5 h). The insoluble residue was removed from the hydrolysate by filtration on a Büchner funnel, washed with 100 ml of distilled water, dried at 103 °C and weighed. The filtrate was quantitatively transformed into a 250 ml volumetric flask and the volume was completed to 250 ml with distilled water.

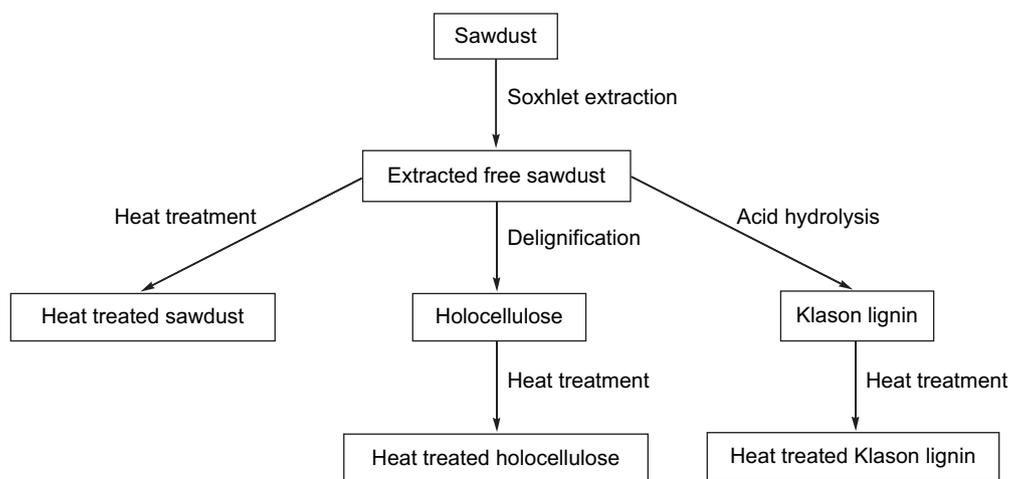


Fig. 1. Description of the different treatments performed on sawdust.

Previous solution (20 ml) was placed in a 50 ml Erlenmeyer flask and neutralized to pH = 5 with a saturated Ba(OH)₂ solution. The mixture was centrifuged, and the clear supernatant transferred into a 50 ml round bottomed flask, and evaporated to dryness under vacuum using a rotary evaporator. The residue was re-dissolved in 2 ml of water, filtered through a Millipore Millex-HA 0.45 µm filter and analyzed by HPLC. Each hydrolysis was triplicated.

2.5. HPLC analysis

The analyses were performed on a Waters liquid chromatograph (Waters SAS, Saint Quentin-en Yvelines, France) equipped with a system controller 600E, a manual injector system with a 20 µl loop and a Waters 2420 Evaporative Light Scattering (ELS) detector (gain = 1, evaporator tube temperature = 60 °C and nebulizer gas pressure = 50 psi). The data were recorded with the Empower software. The analytical measurements were obtained on a Supelco (Sigma–Aldrich Chimie sarl, Saint Quentin Fallavier, France) Discovery LC-NH₂ column (250 mm × 4.6 mm i.d) at 30 °C with an acetonitrile (78%)/water (20%)/methanol (2%) mixture as mobile phase and a flow rate of 1.5 ml min⁻¹. Each sugar hydrolysate was analyzed 3 times and the values averaged. Glucose content (%) was determined on the basis of glucose and cellobiose contents.

3. Results and discussion

CP/MAS ¹³C NMR spectra of untreated and thermally modified beech sawdusts are presented in Fig. 2. Untreated sawdust shows classical signals ascribable to main wood polymer components. Cellulose appears in the region between 60 and 105 ppm. The signals comprised between 72–75 ppm are assigned to C-2, 3, 5 carbons, while the signal at 105 ppm is ascribable to C-1 hemiacetalic carbon. C-4 and

C-6 signals are duplicated due to the presence of amorphous and crystalline cellulose. The signals at 89 and 84 ppm are assigned to the C-4 of crystalline and amorphous cellulose, respectively. Similar observations are made with signals at 65 and 62 ppm characteristic of the C-6 carbon of ordered and disordered cellulose. Signals of hemicelluloses are less obvious due to their overlapping with those of cellulose. The shoulder at 102 ppm on the C-1 signal of cellulose is assigned to hemiacetal carbon of hemicelluloses, while acetyl groups are detected at 20 and 173 ppm. Methoxyl groups of syringyl and guaiacyl units of lignin appear at 56 ppm, while aromatic carbons appear between 120 and 160 ppm. Aliphatic carbons of phenylpropane units of lignin are partially masked by polysaccharide signals. Evolution of NMR spectra of heat treated sawdust is in good agreement with observation reported on blocks [3,5,9,13]. Deterioration of hemicelluloses is particularly obvious. The shoulder at 102 ppm on the C-1 signal of cellulose at 105 ppm strongly decreases after heat treatment, indicating degradation. The signals of the methyl at 20 ppm and carbonyl at 173 ppm of the acetyl groups also decrease after heat treatment. Changes in the lignin signals are less significant indicating its higher stability. The appearance of signals between 125 and 135 ppm could be ascribable to thermal cross-linking of lignin as reported previously by us and by others in the literature [3,5,9,13]. At the same time, the appearance of a new signal at 35 ppm has been assigned to the formation of methylene bridges. The behaviour of holocellulose fraction after heat treatment is reported in Fig. 3. NMR spectra of untreated holocellulose fraction indicate characteristic signals of wood polysaccharide components. Similar to observations made for thermally modified sawdust, heat treatment of holocellulose fraction results in an important degradation of hemicelluloses characterized by the decrease of the signal at 102 ppm characteristic of C-1 carbon of hemicelluloses and of signals at 20 and 173 ppm characteristic of acetyl groups. More surprisingly, signals previously attributed to

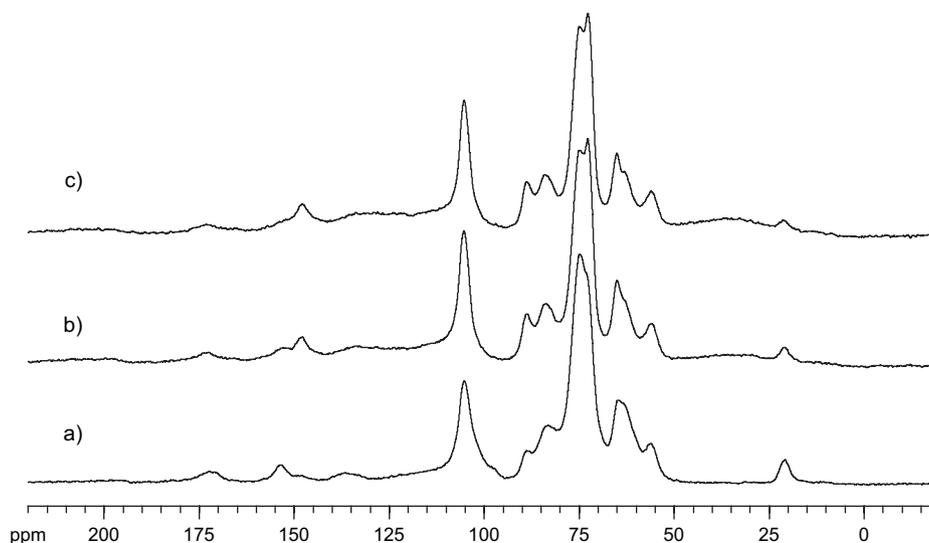


Fig. 2. CP/MAS ¹³C NMR spectra of thermally modified or not beech sawdust: (a) unmodified sawdust; (b) heat treated at 240 °C during 5 h 30 min, WL = 17.7%; (c) heat treated at 240 °C during 21 h, WL = 23.6%.

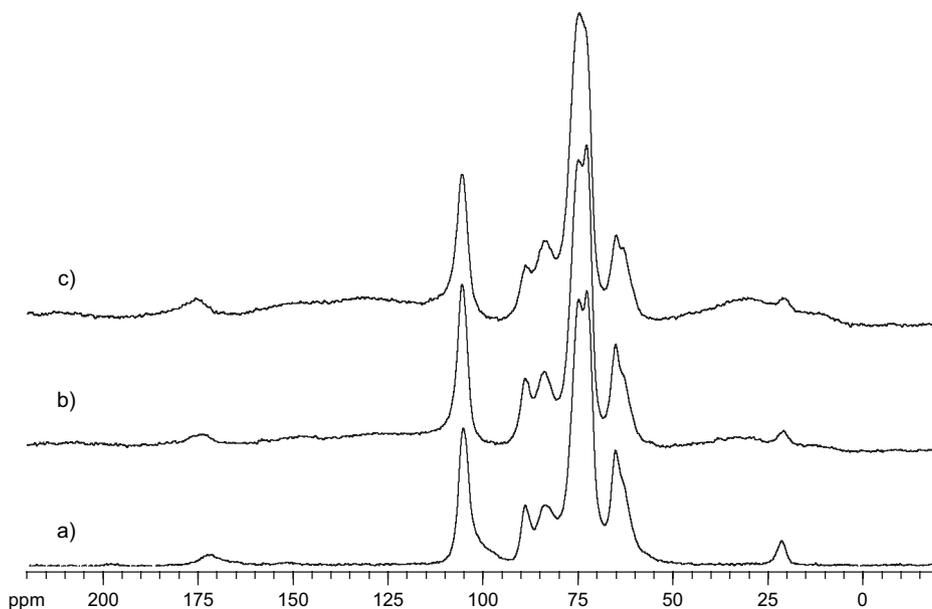


Fig. 3. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of thermally modified or not beech holocellulose fraction: (a) unmodified holocellulose fraction; (b) heat treated at $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 5 h 30 min, WL = 37%; (c) heat treated at $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 21 h, WL = 41%.

lignin thermal crosslinking are still obvious on holocellulose fraction. These results clearly show that new signals appearing between 125 and 135 ppm and 35 ppm on NMR spectra of heat treated wood are not due to lignin modification, but due to degradation of holocellulose. Assignment of these new signals could probably be attributed to the beginning of formation of carbonaceous material within the wood polymers. Indeed, ^{13}C NMR studies reported during cellulose thermal treatment performed in the range of temperature from 300 to $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ indicate quite similar observations for samples treated at $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ [15]. Thermal degradation of cellulose leads initially to the appearance of new signals ascribable to aliphatic carbons (10–50 ppm), aromatic or alkene carbons (110–160 ppm) and carbonyl groups (205 ppm). At this temperature, cellulose is reported to undergo depolymerization by transglycosylation to form, after dehydration reactions, anhydromonosaccharides like 1,6-anhydro- β -D-glucopyranose (levoglucosan) and 1,6-anhydro- β -D-glucofuranose. These products are involved in subsequent reactions leading to char formation [16]. These types of structural changes have also been reported by others [17]. Fig. 4 reports the evolution of lignin fraction. The untreated sample presents characteristic Klason lignin signals indicating the efficiency of the polysaccharide hydrolysis procedure. The main difference after heat treatment concerns the disappearance of the broad signal at 75 ppm attributed to residual saccharide units linked through ether linkages. At the same time, a small decrease of the signal at 58 ppm corresponding to ether carbon was also noted. Methoxyl groups of lignin (56 ppm) are still obvious after heat treatment, while no noticeable modifications are observed in the aliphatic carbons (10–50 ppm) and aromatic or alkene carbon (110–160 ppm) regions. Even if it is well known that chemical composition of Klason lignin obtained after acidic hydrolysis of polysaccharides is different from that of lignin initially

present in wood, it is obvious from this study that new signals observed in heat treated wood and attributed up to now to thermal crosslinking of lignin are rather due to polysaccharide degradation leading to char formation.

These observations corroborate XPS analysis reported in the introduction [14]. Indeed, XPS analysis indicated an important decrease of the O/C ratio unexplainable solely by hemicellulose degradation to volatile by-products. Formation of carbonaceous material is therefore necessary to explain chemical composition evolution of heat treated wood. Similar results have also been reported in a study dealing with the contribution of incomplete combustion of vegetation on the carbon content of soil. ^{13}C NMR study of thermally altered red pine wood in a range of temperatures comprised between 70 and $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ indicates quite similar observation for samples treated at $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ [18].

To confirm these results, wood chemical composition was investigated using classical Klason lignin determination and HPLC analysis of the sugars present in the hydrolysate. Table 1 reports the results obtained using different experimental conditions for hydrolysis. According to the literature, beech wood contains approximately 24% lignin, 49% cellulose, 25% hemicelluloses and 1% extractives [19]. If degradations occurring during heat treatment are mainly associated with hemicelluloses degradation to volatile by-products, it should be possible to calculate *a priori* the theoretical composition of beech wood after treatment. In the case of weight losses between 20 and 25%, composition of thermally modified beech wood should be approximately one-third of lignin and two-third of cellulose. In all cases, Klason lignin determination leads to values definitely higher than expected ones indicating the formation of chars in the wood. Analysis of the sugars in the hydrolysate confirms the higher susceptibility of hemicelluloses to thermal degradation as demonstrated by the lower xylose content detected after

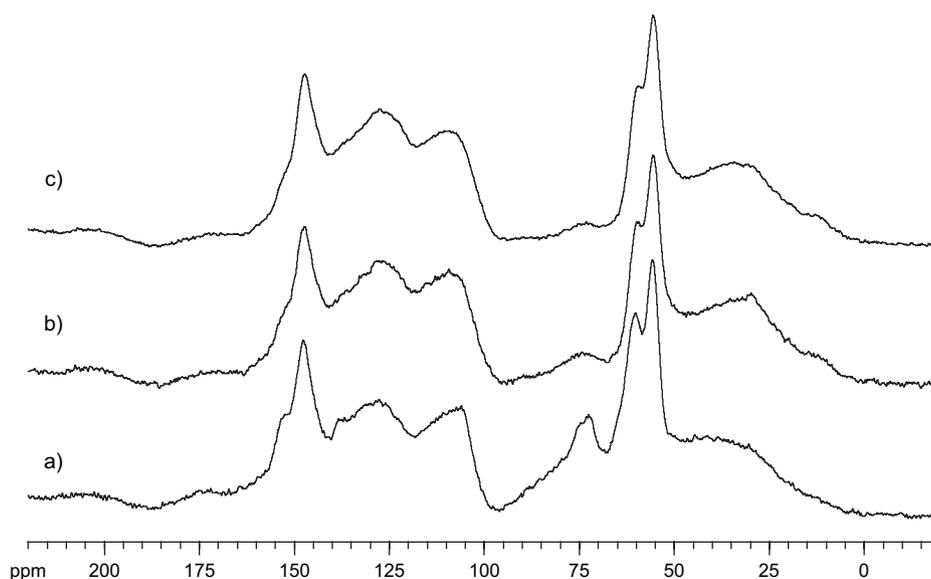


Fig. 4. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of thermally modified or not beech lignin fraction: (a) unmodified lignin fraction; (b) heat treated at $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 5 h30, WL = 16.9%; (c) heat treated at $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 21 h, WL = 17.7%.

treatment. Hydrolysis conditions are strongly influenced by the time and are optimal after 4 h. In these conditions, glucose percentage measured for untreated beech is relatively close from theoretical value (compare 44% to 49%), while that measured after thermal treatment is lower than expected value (compare 35.5% to approximately 66% in the case of degradation of hemicelluloses to volatile by-products). According to these results, it appears that a part of cellulose is degraded during thermal treatment explaining the lower glucose percentage measured after treatment.

4. Conclusions

This study clearly shows the formation of carbonaceous materials within the wood structure. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of heat treated holocellulose fraction indicate that new signals appearing in the range of 125–135 ppm and 35 ppm are

due to a beginning of char formation rather than to thermal crosslinking of lignin and formation of methylene bridges as previously reported in the literature. Determination of Klason lignin content and analysis of sugars present in the hydrolysate support NMR analysis indicating that evolution of wood chemical composition during heat treatment cannot be explained solely as degradation of hemicelluloses to volatile by-products. On the basis of these results and of previously reported XPS analysis, it is postulated that char formation begins in the range of temperatures between 200 and $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ used for wood thermal treatment. Even if char formation during wood pyrolysis at higher temperatures from 300 to $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ is well documented, their formation during heat treatment by mild pyrolysis has not been yet clearly demonstrated. Modifications of NMR signals due to char formation have been interpreted up to now in terms of lignin modification which should be reconsidered according to our results. Such carbonaceous materials could be at the origin of some of the new properties of the material.

Table 1
Klason lignin, glucose and xylose contents of untreated and heat treated wood ($240\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 h)

Sample	Hydrolysis condition ^b	Klason lignin (%)	Glucose (%)	Xylose (%)
Untreated	r.t., 1 h/reflux, 1 h	22.9 ± 0.5	17.5 ± 0.3	9.7 ± 0.3
Untreated	r.t., 1 h/reflux, 2 h	23.0 ± 0.4	24.7 ± 0.1	13.4 ± 0.1
Untreated	r.t., 1 h/reflux, 3 h	22.5 ± 0.5	31.5 ± 0.6	14.9 ± 1.1
Untreated	r.t., 1 h/reflux, 4 h	22.7 ± 0.4	44.0 ± 0.4	14.2 ± 0.3
HT ^a	r.t., 1 h/reflux, 1 h	38.0 ± 0.9	14.9 ± 1.1	6.0 ± 0.7
HT ^a	r.t., 1 h/reflux, 2 h	38.7 ± 2.2	16.7 ± 0.5	5.7 ± 0.3
HT ^a	r.t., 1 h/reflux, 3 h	38.9 ± 0.8	34.7 ± 1.0	5.8 ± 0.0
HT ^a	r.t., 1 h/reflux, 4 h	38.0 ± 2.0	35.5 ± 0.6	5.5 ± 0.1
HT ^a	r.t., 1 h/reflux, 5 h	36.2 ± 0.7	28.6 ± 1.3	4.1 ± 0.1
Cellulose	r.t., 1 h/reflux, 2 h	—	55.5 ± 0.4	—
Cellulose	r.t., 1 h/reflux, 3 h	—	74.8 ± 0.5	—
Cellulose	r.t., 1 h/reflux, 4 h	—	82 ± 1.1	—
Cellulose	r.t., 1 h/reflux, 5 h	—	55.5 ± 0.6	—

^a HT = heat treated, WL = 21%.

^b r.t. = room temperature.

References

- [1] Patzelt M, Stingl R, Teischinger A. Termische Modifikation von Holz und deren Einfluss auf ausgewählte Holzeigenschaften. Modifiziertes Holz Eigenschaften und Märkte. Lignovisionen Band 3; 2002. p. 101–49. ISSN 1681-2808.
- [2] Militz H. Thermal treatment of wood: European processes and their background. The International Research Group on Wood Preservation; 2002. IRG/WP 02–40241.
- [3] Tjeerdsma BF, Boonstra M, Pizzi A, Tekely P, Militz H. Characterisation of thermally modified wood: molecular reasons for wood performance improvement. Holz Roh Werkst 1998;56:149–53.
- [4] Santos JA. Mechanical behaviour of eucalyptus wood modified by heat. Wood Sci Technol 2000;34:39–43.
- [5] Sivonen H, Maunu SL, Sundholm F, Jämsä S, Viitaniemi P. Magnetic resonance studies of thermally modified wood. Holzforschung 2002;56: 648–54.
- [6] Kamdem DP, Pizzi A, Jermannaud A. Durability of heat-treated wood. Holz Roh Werkst 2002;60:1–6.

- [7] Weiland JJ, Guyonnet R. Study of chemical modifications and fungi degradation of thermally modified wood using DRIFT spectroscopy. *Holz Roh Werkst* 2003;61:216–20.
- [8] Gosselink RJA, Krosse AM, van der Putten JC, van der Kolk JC, de Klerk-Engels B, van Dam JEG. Wood preservation by low-temperature carbonisation. *Ind Crops Prod* 2004;19:3–12.
- [9] Hakkou M, Pétrissans M, Zoulalian A, Gérardin P. Investigation of wood wettability changes during heat treatment on the basis of chemical analysis. *Polym Degrad Stab* 2005;89:1–5.
- [10] Yildiz S, Gezer ED, Yildiz UC. Mechanical and chemical behaviour of spruce wood modified by heat. *Build Environ* 2006;41:1762–6.
- [11] Pétrissans M, Gérardin P, Elbakali D, Serraj M. Wettability of heat-treated wood. *Holzforschung* 2003;57:301–7.
- [12] Metsä-Kortelainen S, Antikainen T, Vittaniemi P. The water absorption of sapwood and heartwood of Scots pine and Norway spruce heat-treated at 170 °C, 190 °C, 210 °C and 230 °C. *Holz Roh Werkst* 2006; 64:192–7.
- [13] Wikberg H, Maunu SL. Characterization of thermally modified hard- and softwoods by CP/MAS ¹³C NMR. *Carbohydr Polym* 2004;58:461–6.
- [14] Nguila Inari G, Pétrissans M, Lambert J, Ehrhardt JJ, Gérardin P. XPS characterization of wood chemical composition after heat-treatment. *Surf Interface Anal* 2006;38:1336–42.
- [15] Zawadzki J, Wisniewski M. ¹³C NMR study of cellulose thermal treatment. *J Anal Appl Pyrolysis* 2002;62:111–21.
- [16] Rowell RM, Le Van-Green SL. Thermal properties, *Handbook of wood chemistry and wood composites*. Taylor & Francis; 2005. p. 121–138.
- [17] Plaisantin H, Pailler R, Guette A, Birot M, Pillot JP, Daude G, et al. Excellent carbon fibres with improved mechanical properties. *J Mater Sci* 2006;41:1959–64.
- [18] Baldock JA, Smernik RJ. Chemical composition and bioavailability of thermally altered *Pinus resinosa* (red pine) wood. *Org Geochem* 2002;33:1093–109.
- [19] Fengel D, Wegener G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*; 1984. p. 27–65.

Annexe 3: Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization

Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization

S. Lekounougou^{a,b}, S. MOUNGUENGUI^b, S. DUMARÇAY^b, C. ROSE^c, P.E. COURTY^a, J. GARBAYE^a, P. GÉRARDIN^b, J.P. JACQUOT^a, E. GELHAYE^{a,*}

^aIFR 110, UMR INRA 1136, Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences, BP 239, Nancy Université, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^bLaboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR INRA 1093, Faculté des Sciences, BP 239, Nancy Université, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^cIFR 110, UMR INRA 1137, INRA Centre De Nancy, 54280 Champenoux, France

Received 6 November 2006; received in revised form 5 March 2007; accepted 30 June 2007

Available online 8 November 2007

Abstract

The initial stages of wood colonization and degradation by the white-rot *Trametes versicolor* have been investigated. *T. versicolor* was grown on *Fagus sylvatica* wood chips under solid-state fermentation in the presence of malt agar. The beginning of the colonization process was not associated with peroxidases production or hydrolytic activity. In contrast, a sharp induction of laccase expression was observed during the first colonization days. This induction is not due solely to fungal growth on wood chips since similar data were obtained in the presence of biocide (propiconazole)-treated wood, suggesting that enzyme production is due at least in part to the mycelium surrounding wood chips using nutrients from malt agar medium. Laccase production correlated with wood acetone extractives degradation, in particular with the oxidation of catechin, a major compound of beech extracts. In complementary experiments, wood-extracted laccases were shown to be active with wood acetone extracts and pure catechin. Furthermore, wood extractives induced laccase expression. Taken together, these data suggest that the initial stages of wood colonization on malt agar by *T. versicolor* correlate with wood extractives degradation requiring laccase activity, whereas the other wood-degrading systems (peroxidases and polysaccharides hydrolases) are still repressed.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Trametes versicolor*; Wood decay; Solid-state; Laccase; Colonization; Wood extracts

1. Introduction

White-rot fungi are among the best degraders of lignocellulose and the only known microorganisms that can completely break down lignin to carbon dioxide and water (Ten Have and Teunissen, 2001). However, lignin degradation does not provide carbon and energy, since this process also enables fungi to gain access to cellulose and hemicellulose. The degradation of these polymers is mainly due to extracellular enzymes. Cellulases and hemicellulases are involved in polysaccharide degradation, whereas peroxidases and laccases are mainly devoted to lignin breakdown, the production of these extracellular enzymes

being regulated essentially at the transcriptional level. Numerous studies on enzyme production by wood-rot fungi have been conducted using chemically defined liquid media (Karahanian et al., 1998; Brown et al., 1991; Aro et al., 2005). However, in natural environments, these fungi grow on woody substrates under quite different conditions, and consequently the patterns of enzyme production are different (Datta et al., 1991; Dawson-Andoh and Morrel, 1992; Daniel et al., 1994; Zhao et al., 1996; Machuca and Ferraz, 2001). For instance, solid-state cultivation of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* on wood results in a peroxidase isoform pattern that differs from those described in liquid cultures (Lobos et al., 1994; Janse et al., 1998). Since some of the enzymes are clearly expressed only under solid-state conditions, it is important to study enzyme production on wood chips in

*Corresponding author. Tel.: +33 83684228

E-mail address: gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr (E. Gelhaye).

order to elucidate the role of different enzymes during wood colonization and degradation. Furthermore, the decomposition of wood extractives by white-rot fungi has been well studied (Gutierrez et al., 2001; Teris et al., 2007), mainly to control pitch in paper pulp manufacturing. Wood extractives have a major impact on wood properties; they are low-molecular-weight lipophilic and phenolic substances such as fatty acids, terpenes, and phenolic compounds (tannins). Extractives give wood its color, odor, and physical properties, and they also play a protective role (Dorado et al., 2001).

Among the enzymes involved in wood degradation, laccases catalyze the oxidation of a broad range of phenolic compounds reducing oxygen to water (Baldrian, 2006). Laccases belong to the group of blue multicopper oxidases and have been shown to be able to oxidize wood extractives as the polyphenolic catechin, one of a major compound of beech extracts (Tagger et al., 1998). Besides their role in lignin degradation, the fungal laccases participate in the synthesis of melanin and other pigments (Langfelder et al., 1998), the formation of fruiting bodies (Kües and Liu, 2000), and conidiation, sporulation, and plant pathogenesis (Thurston, 1994; Mayer and Staples, 2002).

The aim of this study was to investigate the initial stages of wood colonization by *Trametes versicolor*. Chemical analyzes and microscopical findings have shown that *T. versicolor* is a non-selective or simultaneous type fungus and that it degrades lignin, hemicelluloses, and cellulose (Faix et al., 1993; Mohebbi, 2005). Nevertheless, for *T. versicolor*, as for other wood-decay fungi, data about the wood colonization process are scarce, although they are very important in understanding the key stages of the process. In the wood protection field, the main laboratory test is based on the EN 113 method using malt agar medium. As a derivative of this one, we have developed a method using small wood chips in order to follow wood colonization, with emphasis on the initial stages of this process.

2. Materials and methods

2.1. Fungus

The white-rot *T. versicolor* (L:Fr.) Pilat (CTB 863A) was used in this study. Cultures were grown on plates with malt-agar slants stored at 4 °C.

2.2. Solid-state cultures on wood

Beech wood (*Fagus sylvatica*) blocks (1.5 cm × 0.5 cm × 3.5 cm) in radial, tangential, and longitudinal directions, respectively, were dried at 80 °C and weighed (m_0). Treatment of wood blocks with the biocide propiconazol was performed as described previously (Mabicka et al., 2004). Sterile culture medium (20 ml), containing 20 ml of culture medium prepared from malt extract (40 g) and agar (30 g) in distilled water (1 L), was placed on petri dishes (diameter 9.0 cm), inoculated with the fungus, and incubated for 2 weeks at 22 °C and 70% RH to allow colonization by the mycelium.

Five UV-sterilized blocks (treated or untreated) were placed in each petri dish under sterile conditions. Incubation was carried out at 22 °C

under controlled humidity conditions of 70% RH in a climatic chamber WTB BINDER TYP KBF 115.

2.3. Wood weight loss

Wood decay was measured as the percentage loss of wood weight after the fungal test. Measurements were done after drying of each sample. At different incubation times, colonized wood blocks were carefully removed, dried at 80 °C, and weighed. Mycelia were then removed and the blocks were dried at 80 °C and weighed (m_1). Weight loss (WL) was expressed as a percentage of the initial oven-dried weight of the sample (m_0) according to the formula

$$WL(\%) = ((m_0 - m_1) - m_0) \times 100.$$

2.4. Wood extractives

Wood chips were harvested at different incubation times, ground, and dried. The sawdusts were then extracted with 200 mL of acetone for 6 h in a Soxhlet apparatus.

2.5. Pumice-stone impregnation

Beech wood extractives (20 mg) were solubilized in 30 mL water by sonication (Decon ultrasonics FS 100). Pumice stones were impregnated with extractives for 2 h. After drying, pumice stones were incubated in the presence of *T. versicolor* (six pumice stones in petri dishes).

2.6. HPLC analysis

High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed on a Waters system equipped with a system controller 600E, a manual injector system, and a Waters 2996 photo diode array (PDA) detector. All injections were 20 μ L in volume. The column used was a Supelco Discovery C18 column (250 × 4.6 mm i.d.) at 30 °C. The separation was performed over a period of 60 min using water containing 0.05% TFA (100–0%) and methanol containing 0.05% TFA (0–100%), the flow rate being 1 mL/min.

2.7. Enzyme assays

2.7.1. Enzymatic activities using fluorogenic assays

Colonized wood blocks were removed carefully from agar plates, the mycelium surrounding wood chips being excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 1 mL of 50 mM phosphate buffer at pH 6.0. Then, mycelia were separated from the wood in order to facilitate enzyme extraction and the samples were incubated for 1 h at room temperature. The samples were then centrifuged (10,000 × *g* for 15 min) and the supernatant was collected and tested for different activities.

Six enzyme substrates based on 4-methylumbelliferone (MU) or 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) were studied: MU-phosphate (MU-P) for the detection of the acid phosphatase (EC 3.1.3.2), MU- β -D-glucopyranoside (MU-G) for β -glucosidase (EC 3.2.1.3), MU-N-acetyl- β -D-glucosaminide (MU-NAG) for chitinase (EC 3.2.1.14), MU- β -D-glucuronide hydrate (MU-GU) for glucuronidase (EC 3.2.1.31), MU- β -D-cellobioside (MU-C) for cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), and L-leucine-AMC (Leu-AMC) for leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1) activities. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (Lyon, France).

The experimental conditions for fluorescence assays, incubation buffers, and substrate concentrations were as described previously (Courty et al., 2005). Briefly, 50 μ L of samples were mixed with 50 μ L substrate solution, and 50 μ L incubation buffer according to Courty et al. (2005). Incubation lasted 1 h in black 96-well microtitration plates, fluorescence emission being recorded every 5 min with a fluorescence spectrophotometer (Wallac Perkin-Elmer life sciences, Villebon-sur-Yvette, France)

with an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 450 nm.

2.7.2. Enzyme extraction

Nineteen wood chips were harvested after 4 incubation days and mixed during 2 h with 200 mL of 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Wood chips were removed and incubated again with 200 mL of 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Extraction solutions were pooled and centrifuged and the resulting supernatant was concentrated by ultrafiltration.

During experiments using pumice stones, the surrounding colonized malt agar (from 20 plates) were mixed twice during 2 h with 500 mL of 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Extraction solutions were pooled and centrifuged and the resulting supernatant was concentrated by ultrafiltration.

2.7.3. Laccase and peroxidase assays on wood chips

Colonized wood blocks were carefully removed from agar plates and the mycelia surrounding wood chips excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 900 μ L of 50 mM phosphate buffer pH 6.0. The mycelia were separated from the wood in order to facilitate substrate diffusion and 50 μ L of 100 mM 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) were added to detect laccase activity. In order to maintain substrate saturation, incubation times were varied (typically from 5 min to 1 h). The samples were then centrifuged (10,000 $\times g$; 1 min) before measuring the 420 nm absorbance of the supernatant ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using a Varian Cary 50 spectrophotometer.

To detect peroxidase activities, wood chips were placed into a test tube containing either 900 μ L of 50 mM of selected buffer (either acetate buffer pH 4.5, or phosphate buffer pH 7.0, or succinate buffer pH 3.0) and reactions were started by the addition of hydrogen peroxide. LiP activity was measured according to the method of Tien and Kirk (1988) following the oxidation of veratryl alcohol to veratryl aldehyde. MnP activity was measured as described by Kuwahara et al. (1984) with phenol red as the substrate.

For induction experiments, a similar procedure was used. In this case, 0.5 cm² of malt-agar surrounding the pumice stone was cut and incubated with 980 μ L of 50 mM acetate buffer pH 5.0 and 20 μ L of 100 mM 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS).

The oxidation of catechin was performed as follows: 0.35 mM of catechin was added to enzymes extracted in 50 mM acetate buffer pH 5.0 (see Section 2.7.3) and absorption spectra were recorded every 3 min.

2.7.4. Oxygen consumption

To test laccase activity, oxygen consumption was measured with a Clark-type O₂ electrode (Rank Brothers, Cambridge, UK). One hundred μ L of wood-extracted enzymes (see Section 2.7.2) were incubated in 900 μ L of acetate buffer 50 mM (pH 5.0) and various concentrations of beech wood extractives or ABTS were added.

2.8. Electronic microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) observations were performed using a Zeiss (Leo) 1450VP scanning microscope equipped with an ultracool Peltier stage system. Images of the wood and fungi were directly obtained with a back-scattered secondary electron detector (QBSD) at 20 KV of accelerating voltage, 600 pA electron beam intensity in VP mode (30 Pa of pressure in chamber), and sample temperature kept at -50°C .

3. Results

3.1. Wood colonization

To follow fungal development, SEM observations were performed during the initial stages of beech-wood colonization by *T. versicolor*. After 4 days of incubation, the

wood surface was slightly colonized (Fig. 1A) but not the wood structure (Fig. 1B), whereas wood chips were fully, deeply colonized after 20 days (Fig. 1C). The mycelia

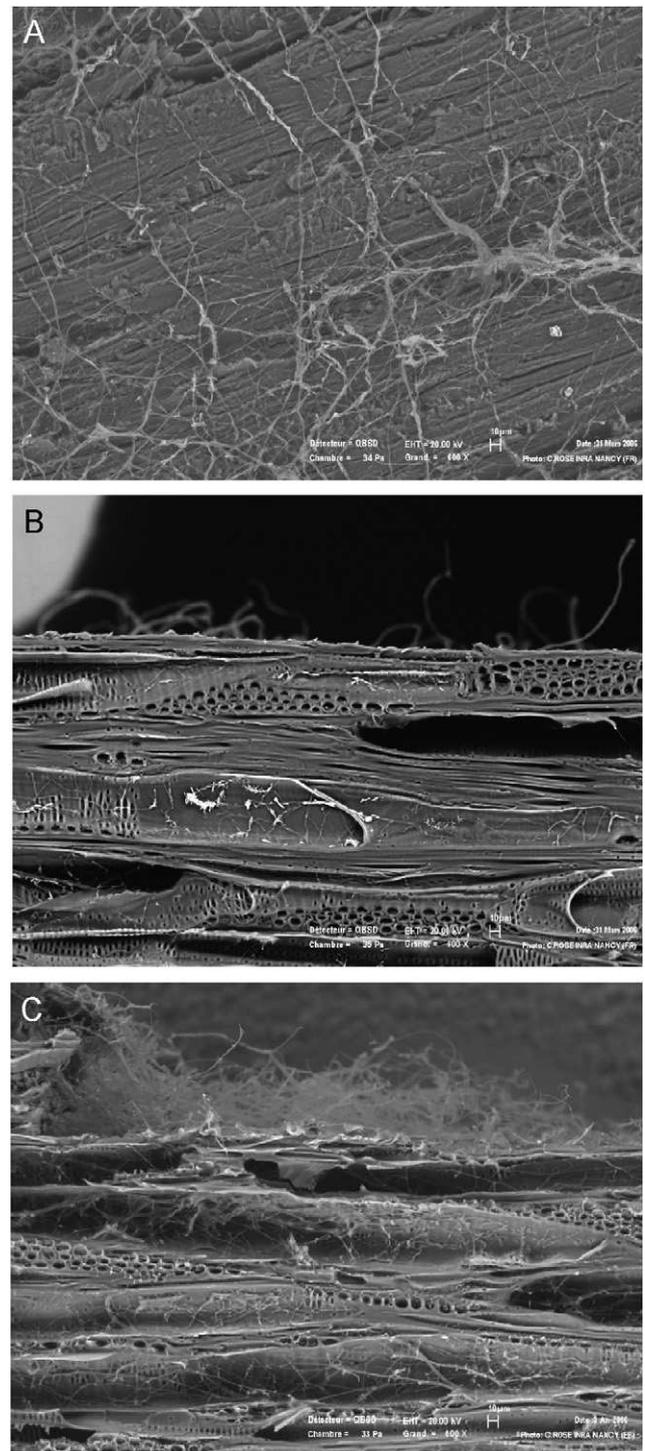


Fig. 1. Wood (*Fagus sylvatica*) colonization by *T. versicolor* after 4 incubation days (A, B) and 20 incubation days (C). SEM observations (backscattered electron imaging in VP mode) at the surface of the wood (block of beech): (A) mycelium development at the beginning of colonization by fungi; (B) SEM images (backscattered electron imaging in VP mode) of cross-section of woodblocks at 4 days of incubation (B) and 20 days of incubation (C) by fungi. Observations of mantle development and mycelium colonization in wood vessels.

surrounding wood chips appeared to represent a large part of the whole fungal biomass found in wood chips.

Weight losses of samples exposed to *T. versicolor* for different exposure periods were measured. After 10 days, no significant mass loss (<5%) could be observed. After 90 days of incubation, around 45% of wood weight loss was measured, confirming the efficiency of *T. versicolor* in the beech degradation in these laboratory conditions.

Treatments of wood chips with propiconazole have been performed. The concentrations of biocide used (10^{-4} and 5×10^{-4} M) were chosen in order to limit but not eliminate the decay process. In these conditions, the fungal growth on wood chip surfaces was altered. Fungal growth was detected on wood chips only after around 15 and 35 incubation days for 10^{-4} and 5×10^{-4} M biocide treatments, respectively (data not shown). Wood chip weight losses were significantly reduced in the presence of biocide, reaching around 30% and 35% for 5×10^{-4} and 10^{-4} M treatments, respectively, after 90 incubation days.

3.2. Enzyme production

During the initial stage of wood colonization (0–10 days), hydrolytic, i.e., acid phosphatase, β -glucosidase, chitinase, glucuronidase, cellobiohydrolase, and leucine aminopeptidase, activities were not detected on wood chips using fluorescent substrates. Nevertheless, a strong chitinase activity was detected during the initial stage of propiconazole-treated wood, showing the sensitivity of the method (Fig. 2).

During this initial stage, lignin peroxidase activity was not detected whatever the pH used during the enzymatic test (pH 3.0, 5.0, and 7.0). Similar results were obtained when manganese peroxidase activity was tested, suggesting that at this colonization stage, peroxidases were not produced by the fungus.

In contrast, strong laccase activity could be detected during the first 10 days of incubation. A sharp increase in activity was observed, reaching about $70 \mu\text{UI}/\text{mg}$ of wood

chips after 4 days. A similar pattern of activity was observed during the first incubation days using propiconazole-treated wood chips (Fig. 3).

3.3. Wood extractives

Acetone extracts of wood were analyzed after 5 and 10 days of incubation in the presence of *T. versicolor* (Fig. 4). The pattern of acetone wood extractives analyzed by HPLC is dramatically altered in the presence of *T. versicolor*. The amount of catechin, a major beech acetone wood extractive, decreased, especially during the first days of incubation. Similar decreases have also been observed for other major components of beech-wood extractives.

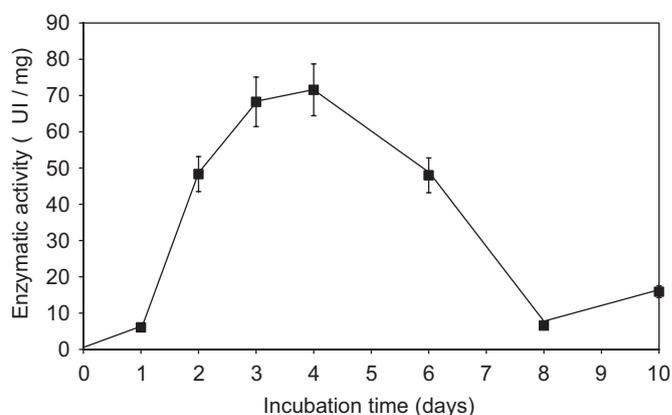


Fig. 3. ABTS oxidizing activity produced during wood chip colonization by *T. versicolor*. Each point is the mean \pm standard deviation of nine different experiments.

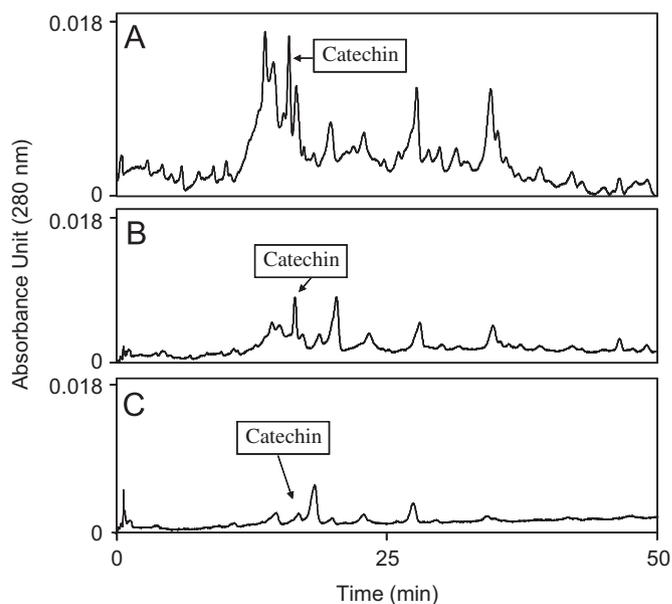


Fig. 4. Wood extractives (*Fagus sylvatica*) degradation by *T. versicolor*. Acetone extraction was performed on wood chips incubated 0 days (A), 5 days (B), and 10 days (C) in the presence of *T. versicolor*.

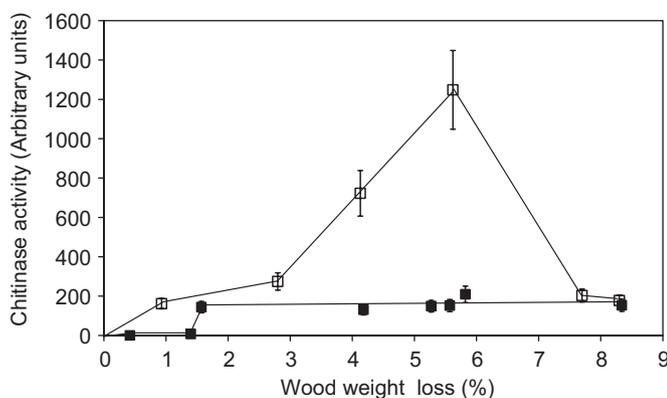


Fig. 2. Chitinase activity produced during propiconazole-treated (10^{-4} M, \square) and untreated (\blacksquare) wood chip degradation by *T. versicolor*. Each point is the mean \pm standard deviation of four different experiments.

3.4. Wood extractives and laccases

Activity from 4 days colonized wood chips have been extracted as described in the Section 2. The presence of laccase activity has been confirmed by measuring oxygen consumption both in the presence of ABTS or beech extractives. Interestingly, oxygen consumption rates by laccases were shown to be related to beech extractives concentrations, reaching a value of 14.6 nmol/min in the presence of 0.8 mg/mL of beech extracts. Beech extractives modification by laccases was also confirmed by HPLC analysis, which showed a strong alteration of beech extractives after incubation in the presence of extracted laccases (data not shown).

The direct oxidation of catechin by extracted enzymes has also been demonstrated. In the presence of extracted enzymes, a strong modification of the catechin absorption spectrum was observed. A large increase of the detected absorbance was measured in the 250–450 nm region (maximum at 400 nm and an absorbance shoulder peak at 450 nm), suggesting the oxidation of polyphenolic compounds to the corresponding quinones. When the incubation was performed in the absence of either extracted enzymes or catechin, modifications of the absorption spectrum were not detected (data not shown).

3.5. Induction of laccase expression

To test laccase induction, pumice stones were impregnated with beech-acetone extracts and ABTS oxidizing activities were measured in solid medium surrounding stones. Control experiments were performed using pumice stones impregnated with buffer only (Fig. 5). Laccase activity was clearly induced by the presence of acetone-beech extractives (around 50 μ UI/cm² after 75 incubation hours).

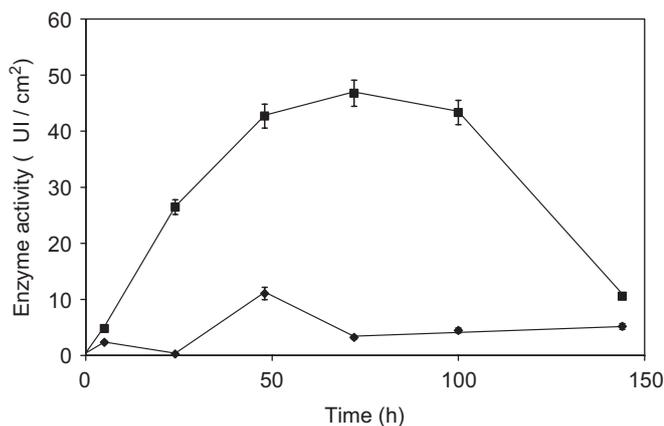


Fig. 5. Induction of laccases by *Fagus sylvatica* wood extractives. Pumice stones were used as inert support and were impregnated with (◆) 50 mM acetate buffer (pH 5.0) or (■) 0.6 mg/mL of beech extractives solubilized in 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Each point is the mean \pm standard deviation of three different experiments.

4. Discussion

Understanding the mechanisms used by white-rot fungi for wood decay could be useful for designing new wood preservative targets. We report in this paper that in solid-state conditions, the initial stages of wood colonization by *T. versicolor*, namely the first 10 days of incubation, are associated with considerable laccase production and wood extractives degradation. Analysis of enzyme production revealed that in these conditions, peroxidases are not involved in this first colonization stage. Peroxidase gene expression in white-rot fungi is usually triggered by the depletion of nutrient nitrogen, carbon, or sulfur, and the expression of most of the ligninolytic genes is regarded as a stress response to nutrient depletion (Keyser et al., 1978; Tien and Kirk, 1988). At the beginning of the colonization process, fungal growth probably occurs using nutrients providing by the surrounding malt agar, preventing nutrient depletion, and thus explaining the absence of peroxidase activities.

In a similar way, hydrolytic activities have not been detected during this initial stage. In filamentous fungi, a majority of the genes involved in polymer breakdown are repressed by the presence of easily available carbon sources, such as glucose, and induced in the presence of the substrate polymers (Aro et al., 2005). Glucose repression also takes place very efficiently, and typically overrides the induction of the genes. Again, the fungal development from surrounding malt agar could explain these low hydrolytic activities.

Interestingly, strong chitinase activity has been observed in the presence of propiconazole-treated wood. Like other triazol biocides, propiconazole is known to alter fungal sterol synthesis, these sterols maintaining optimal fluidity and structural integrity of membranes (Joseph-Horne and Hollomon, 1997). The detected chitinase activity is linked to enzymes involved in fungal cell wall synthesis (Rast et al., 2003), which are probably over-expressed by the fungus in order to limit the propiconazole effects. The data obtained revealed the expected sensitivity of fluorescent substrates used to detect hydrolytic activities (Courty et al., 2005).

The initial stage of wood colonization by *T. versicolor* is associated with a sharp induction of laccase production; this induction is not correlated with the colonization process, since the same phenomenon was observed in propiconazole-treated wood. These data suggest that enzyme production is due at least in part to the mycelia surrounding wood chips in malt agar. In *T. versicolor*, laccases are encoded by at least four genes (Necochea et al., 2005). Pumice stones have been used to test the effects of wood extractives on laccase gene expression. Clearly, wood extractives are able to induce the expression of laccase activities in *T. versicolor* and laccases are able to degrade beech-wood extractives. It has been previously shown that transcription of laccase genes in *T. versicolor* is enhanced in response to aromatic compounds such as xylydine (Bollag

and Leonowicz, 1984; Couto et al., 2002), veratryl alcohol (Mansur et al., 1998), and pyrogallol (Osiađacz et al., 1999). The decay resistance of heartwood of naturally durable wood species is expected to be mainly due to the amount and type of extractives, especially of polyphenols, terpenoids, tropolones, and tannins (Dorado et al., 2001). Tannins have antimicrobial properties and have been shown to inhibit the growth of decay fungi, and several monomeric aromatic compounds have also been shown to inhibit growth of white-rot and brown-rot fungi (Highley and Micales, 1990; Buswell and Eriksson, 1994). The induction of laccases observed during the initial stage of wood colonization by *T. versicolor* could also be explained by the presence of aromatic compounds in beech-wood extractives, suggesting a detoxification function for laccases.

Wood degradation by white-rot fungi is a complex phenomenon involving a complex set of extracellular enzymes (Martinez, 2002; Rabinovich et al., 2004). The role of different enzymes in this process is only partially understood. In this study, we have shown that the initial stage of wood colonization on malt agar starts with wood extractives degradation. This degradation is mediated at least partially by laccases and not by peroxidases. In particular, we demonstrate that the polyphenolic catechin, one of a major compound of beech extracts, is a substrate of laccases. Further experiments are required to investigate the role of various laccase isoenzymes in wood-extractives degradation and to understand the complex regulation of these extracellular enzymes involved in wood degradation.

Acknowledgments

The authors thank J. Gérard for her technical assistance. S. Mounquengui was supported by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. This research was supported by a grant of Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (No. 0201035).

References

- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 59–65.
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 215–242.
- Bollag, J.-M., Leonowicz, A., 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 849–854.
- Brown, J.A., Alic, M., Gold, M.H., 1991. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 172, 3125–3130.
- Buswell, J.A., Eriksson, K.E.L., 1994. Effect of lignin-related phenols and their methylated derivatives on the growth of eight white-rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 169–174.
- Courty, P.E., Pritsch, K., Schloter, M., Hartmann, A., Garbaye, J., 2005. Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. *New Phytologist* 167, 309–319.
- Couto, S.R., Gundín, M., Lorenzo, M., Sanromán, M.A., 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry* 38, 249–255.
- Daniel, G., Volc, J., Kubatova, E., 1994. Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2524–2532.
- Datta, A., Bettermann, A., Kirk, T.K., 1991. Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1453–1460.
- Dawson-Andoh, B.E., Morrel, J.J., 1992. Extraction of proteins from wood colonized by decay fungi. *Holzforshung* 46, 117–120.
- Dorado, J., Van Beek, T.A., Classen, F.W., Sierra-Alvarez, R., 2001. Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus sylvestris* by the white-rot fungi *Bjerkandera* sp. and *Trametes versicolor*. *Wood Sciences and Technology* 35, 117–125.
- Faix, O., Bremer, J., Schmidtt, O., Stevanovic, T., 1993. Monitoring of chemical changes in white-rot degraded beech wood by pyrolysis-gas chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Analytical and Applied Pyrolyse* 2, 147–162.
- Gutierrez, A., del Rio, J.C., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 2001. The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends in Biotechnology* 19, 340–348.
- Highley, T.L., Micales, J.A., 1990. Effect of aromatic monomers on production of carbohydrate-degrading enzymes by white-rot and brown-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 66, 15–22.
- Janse, B.J.H., Gaskell, J., Akhtar, M., Cullen, D., 1998. Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases and glyoxal oxidases in wood. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3536–3548.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., 1997. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiology Letters* 149, 141–149.
- Karahanian, E., Corsini, G., Lobos, S., Vicuna, R., 1998. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochimica Biophysica Acta* 1443, 65–74.
- Keyser, P., Kirk, T.K., Zeikus, J.G., 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of Bacteriology* 135, 790–797.
- Kües, U., Liu, Y., 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 141–152.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H., 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependant oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169, 247–250.
- Langfelder, K., Jahn, B., Gehringer, H., Schmidt, A., Wanner, G., Brakhage, A.A., 1998. Identification of a polyketide synthase gene (pksP) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Medical Microbiology and Immunology* 187, 79–89.
- Lobos, S., Larra, J., Cullen, D., Vicuna, R., 1994. Isoenzymes of manganese-dependant peroxidase and laccase produced by the lignin degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology* 140, 2691–2708.
- Mabicka, A., Dumarçay, S., Gelhaye, E., Gérardin, P., 2004. Inhibition of fungal degradation of wood by 2-hydroxypyridine-*N*-oxide. *Holzforshung* 58, 566–568.
- Machuca, A., Ferraz, A., 2001. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme and Microbial Technology* 29, 386–391.
- Mansur, M., Suárez, T., González, A.E., 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology* 64, 771–774.
- Martinez, A.T., 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 425–444.
- Mayer, A.M., Staples, R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551–565.
- Mohebbi, B., 2005. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of white-rot decayed beech. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55, 247–251.

- Necochea, R., Valderrama, B., Díaz-Sandoval, S., Folch-Mallol, J.L., Vázquez-Duhalt, R., Iturriaga, G., 2005. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. FEMS Microbiology Letters 2, 235–241.
- Osiadacz, J., Al-Adhami, A.J.H., Bajraszewska, D., Fischer, P., Peczyńska-Czoch, W., 1999. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. Journal of Biotechnology 72, 141–149.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasil'chenko, L.G., 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. Applied and Biochemical Microbiology 40, 1–17.
- Rast, D.M., Baumgartner, D., Mayer, C., Hollenstein, G.O., 2003. Cell wall-associated enzymes in fungi. Phytochemistry 64, 339–366.
- Tagger, S., Périssol, C., Gil, G., Vogt, G., Le Petit, J., 1998. Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). Enzyme and Microbial Technology 23, 372–379.
- Ten Have, R., Teunissen, J.M., 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. Chemical Review 10, 3397–3413.
- Teris, A., van Beeka, B., Kustera, F., Claassena, W., Tienvierib, T., Bertaud, F., Lenon, G., Petit-Conil, M., Sierra-Alvarez, R., 2007. Fungal bio-treatment of spruce wood with *Trametes versicolor* for pitch control: influence on extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity. Bioresource Technology 98, 302–311.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140, 19–26.
- Tien, M., Kirk, K.T., 1988. Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology 161, 238–249.
- Zhao, J., De Kober, T.H., Janse, B.J.H., 1996. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependant peroxidases produced by selected white-rot fungi in solid media. FEMS Microbiology Letters 145, 393–399.

Annexe 4: Investigation on a Wood Decay Biomarker

THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION

Section 2

Test methodology and assessment

Investigation on a Wood Decay Biomarker

Steeve Mounquengui, Stéphane Dumarçay, Philippe Gérardin

Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR _A 1093
Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239,
54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Paper prepared for the 37th Annual Meeting
Tromsø, Norway
18-22 June 2006

IRG SECRETARIAT
SE-100 44 Stockholm
Sweden
www.irg-wp.com

Investigation on a Wood Decay Biomarker

Steeve MOUNGUENGUI, Stéphane DUMARÇAY, Philippe GÉRARDIN

Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR _A 1093
Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239,
54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

ABSTRACT

HPLC evolution of beech wood extractives was investigated with or without exposure to *Coriolus versicolor* during one month. The nature and the quantity of extracts depends on the extraction conditions, but were also strongly influenced by the wood drying temperature and time leading to an important modification for higher drying temperature. After two weeks of exposure to *Coriolus versicolor*, results showed that catechin initially present in beech wood, was totally degraded, while other new products appeared. Impregnation of propiconazole before exposure to *Coriolus versicolor* results in total inhibition of catechin degradation allowing its use as tracer of wood degradation.

Keywords: Catechin, HPLC, Biomarker, Fungal wood decay.

1. INTRODUCTION

One of the main fields of investigation of our laboratory deals with wood preservation, particularly by chemical or physico-chemical treatments versus rotting fungi. This kind of research always involves *in vitro* evaluations of the processes biological efficiency which have to be carried out following standard procedures described in the serie of European Norms like the EN 113 for the white or brown rots and ENV 807 for the soft rots. A very inconvenient point of these norms lies in the cultures long time duration before measuring the weight loss of wood samples, the only parameter allowing to quantify the influence of a treatment on the fungal decay. Depending on the rot type and wood species targeted in the norm, the experiment time can be extended to 16 weeks. In some cases, this time can appear as excessive when the purpose of an experiment is not to get a big amount of quite reliable results but only to check rapidly a scientific idea or theory validity.

Therefore, it seemed highly suitable to develop a method able to indicate rapidly the trend of treatment effects, providing early stage feedback informations thus confirming a good investigations direction or, at the opposite, forcing a strategy change for the further experiments.

The High-Performance Liquid Chromatography detection and titration of specific biomolecules could be a convenient answer to the criteria exposed before and in this area, several possibilities had to be considered. Actually, two main approaches were reported in previous studies.

In a first category, biomarkers of the fungal cellular growth were investigated. Thus, the chitin from brown rot and soft rot fungi has been determined through glucosamine titration. Since this polymer is the cell wall main component for every fungi, its measurement has been then correlated with the fungal biomass production and thereby with the decaying activity (Nilsson and Bjurman 1998).

Because of its important occurrence in the membrane of various kinds of mycetes, ergosterol could also be used as a good indicator of a plant tissue colonization. Moreover, it seems possible to relate the measured concentration to an instantaneous fungal growth rate (Gessner and Schmitt 1996).

A second and apparently obvious approach would be to monitor the generation of wood polymers derivatives due to the decaying processes. The degradation mechanisms of wood lignin and polysaccharides have been extensively studied, particularly in the case of the polyaromatic compounds because of the potent industrial applications of their destruction. For example, these enzymatic reactions could lead to an interesting enhancement of kraft pulp bleaching (Buchert *et al.* 2002) or could even act as depolluting agents against xenobiotics, most of them having an halogenated aromatic structure (Toure *et al.* 1997, Rabinovitch *et al.* 2004). It has been demonstrated that several types of extracellular enzymes are generally involved in the lignin degradation process : the peroxidases (ligninase, manganese peroxidase) and oxidases (laccases) but, despite all these studies and knowledges, no lignin specific degradation product has been clearly identified. On the other hand, the effects of lignolytic enzymes on smaller molecules than the real wood biopolymer are better known. These smaller molecules are not covalently bound to the polymeric shape of the wood and can be collected by extraction with various solvents, depending mainly on their polarity. They are therefore called wood extractives and are constituted by a wide range of precursors, intermediates and by-products of the wood metabolism. Action of lignolytic enzymes on the extractives can produce some characteristic compounds like the 2,6-dimethoxy-para-benzoquinone and dehydrodisinapic acid dilactone obtained by the sinnapic acid oxidation (Lacki and Duvnjak 1997), veratrole formation which seems to be trivial either by phenylalanine deamination and metabolisation or from alternative sources including phenylpropanoid derivatives (Rabinovitch *et al.* 2004) like matairesinol. The enzymatic systems can also need some mediators to extend the range of chemicals oxidized and the rate of oxidation. Such mediators could play the marker role as specific messengers of the enzymatic decaying activity. The veratryl alcohol, involved in numerous reactions of lignin degradation process (Sutherland and Aust 1996), could be a good candidate and should be found in the common extraction fraction because of its aromatic structure.

Among all these possibilities, catechin, a quite known extractive has been selected for this study with the aim of correlating its abundance to the wood durability versus a white rot fungus attack. This choice was presenting several advantages : catechin is frequently found in numerous wood species, owns UV absorbance properties allowing a convenient detection by classical liquid chromatographic chains and finally, is known to be degraded by enzyme preparation from *Coriolus versicolor* (Archambault *et al.* 1996).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Organism

The white-rot basidiomycete used in this study was *Coriolus versicolor* . Cultures were grown on plates with malt-agar slant stored at 4°C.

2.2. Chemicals

Methanol (HPLC grade), TFA (trifluoroacetic acid) and catechin were purchased from Sigma. Water was distilled then deionised with Ultra – Pure water system. Acetone was distilled with KMnO₄ before use.

Protocatechuic acid, vanillic acid, catechin, vanillin, syringic acid, coniferaldehyde, synapic acid, 2,6-dimethoxybenzoquinone, 3,5-dimethoxybenzaldehyde were kindly provided by Crittbois, Epinal-FRANCE

2.3. Solid state cultures on wood

Beech wood (*Fagus sylvatica*) blocks (15 x 5 x 25mm) in radial, tangential and longitudinal directions respectively were dried at 55°C for 48h and weighed. Sterile culture medium (20ml), prepared from malt (40g) and agar (30g) in distilled water (1.0 L), were placed on 9.0 cm Petri dishes, inoculated with fungus and incubated for 1 weeks at 22°C and 70% HR to allow colonization of medium by the mycelium.

Five U.V. sterilized blocks (treated or untreated) were placed in each Petri dish under sterile conditions. Incubation was carried out at 22°C under controlled humidity conditions of 70%

2.4. Extraction

After the time of exposure, the blocks were grown and the sawdust (3 g) were Soxhlet extracted with acetone for 6 h. The solvent was evaporated to dryness and the extracts were weighed.

2.5. Decay tests

Five wood block replicates were put in the Petri dish. Decay resistance was studied using a malt agar plate decay test which is a modification of the standardised EN 113 test. The wood blocks were dried at 55°C for 48 h, weighed and impregnated by vacuum with a propiconazole (10^{-2} M) in ethanol. The wood specimens were treated with ethanol as a control. These wood blocks were placed on a pure culture of a white-rot fungus, *Coriolus versicolor*. The incubation time was 4 weeks, every five day the wood blocks were cleaned of fungal residue, dried at 55°C for 48 h and re-weighed. The weight loss of the wood blocks during the incubation was expressed in relative mass loss [(loss in mass/initial dry mass) × 100%].

2.6. Chromatographic apparatus and conditions

High-performance liquid chromatography (HPLC) were performed on a Waters system equipped with a system controller 600E, a manual injector system and a Waters 2996 photo diode array (PDA) detector. Data were recorded on a 200nm to 400nm range, the presented chromatograms being extraction at 280 nm of the whole data collected. All injections were 20µl in volume. The measurements were obtained on a Supelco Discovery C18 column(250X4,6mm i.d) at 30°C. The solvents used for this separation were solvent A (water containing 0,05% of trifluoroacetic acid) and solvent B (Methanol containing 0,05% of TFA), the flow is 1ml/min. Elution was achieved with gradient of solvents A and B as described below (Table 1):

Table 1 : eluent composition

Time [min]	Water +0.05 % TFA	Methanol +0.05 % TFA
0	100	0
5	95	5
45	70	30
60	30	70
65	0	100
70	100	0
80	100	0

3. RESULTS

3.1. Definition of drying conditions

The first step of this study was to define precisely the best sampling method. Indeed, despite the commonly admitted fact that the wood samples drying temperature is a crucial parameter for the extractives integrity, the usual norms are indicating 103°C during 18 until 24 hours to insure a complete water removal and in this manner, reproducible mass loss measurements. However, with the aim of detecting and titrating natural and thermal sensitive chemicals, it seemed to be interesting to define the mildest conditions possible to avoid any source of marker amount variation due to the experimental manipulations.

The extractives obtained from the wood beech with and without drying step at 103 °C have been injected in the chromatographic system to provide the following chromatograms at 280 nm (Fig. 1 and 2).

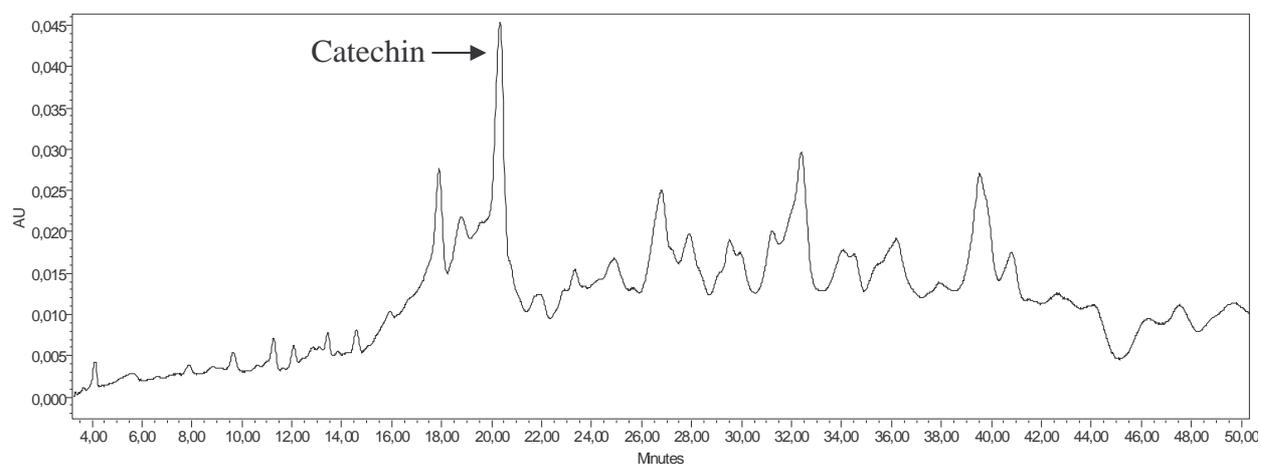


Figure 1: Chromatogram at 280nm of undried wood beech acetic extractives

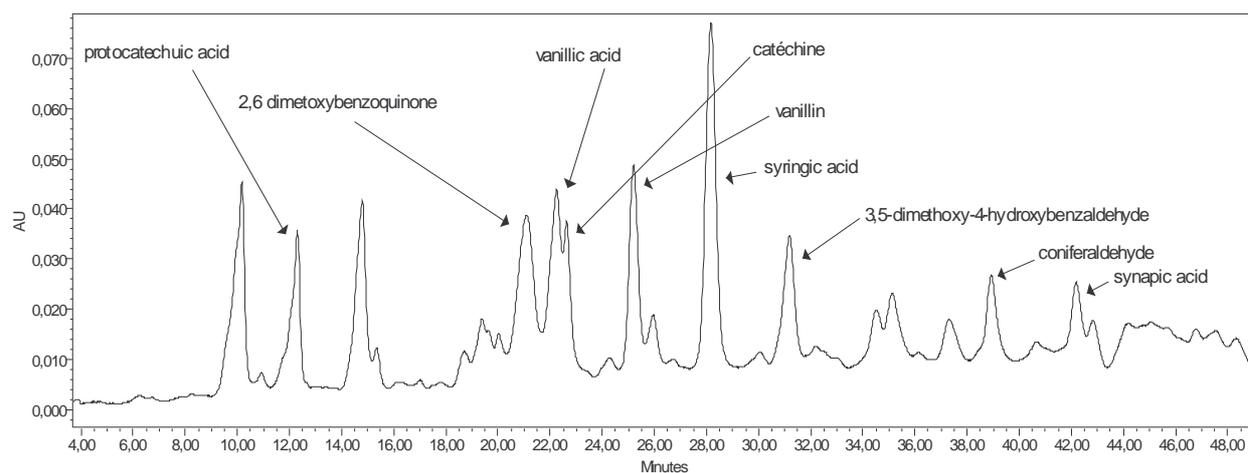


Figure 2: Acetic extractives chromatogram at 280nm of wood beech dried at 103°C

A very clear difference has been observed between these two analysis. Even many of the compounds detected in the chromatogram 2 have been identified, most of them were not present in the extractives obtained without drying the wood (fig. 1) and concerning the products determined in both cases, 2,6-dimethoxybenzoquinone and catechin, the measured concentrations were highly different.

Several attempts have been then carried out to find the optimal temperature and time of drying process allowing simultaneously to reach the usual dehydration level without degrading the extractives. Beech blocks dried at 55°C during 48 hours have showed a water weight loss similar to the one usually obtained with the heating at 103°. Their acetonic extractives have led to the following chromatogram (fig. 3).

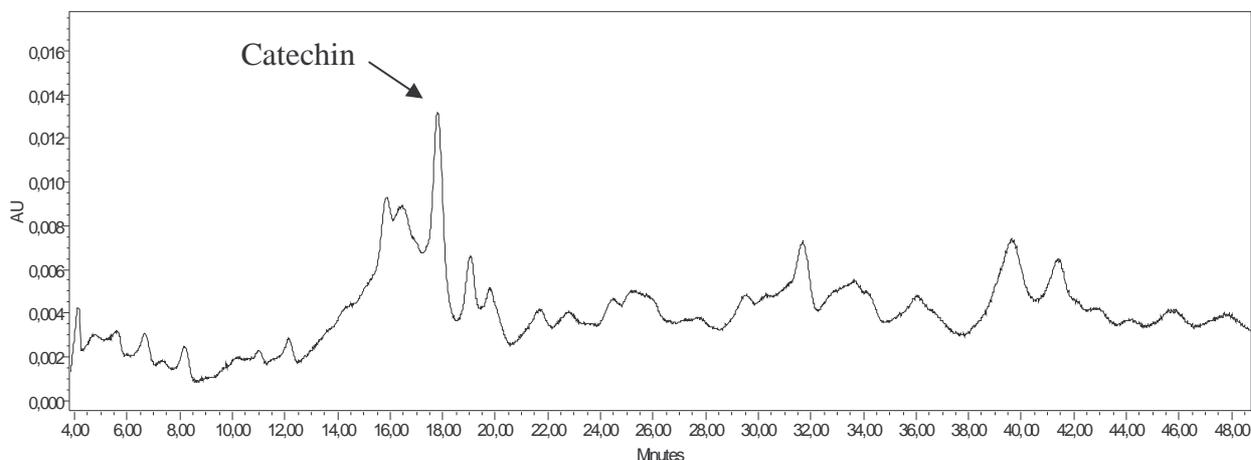


Figure 3: Acetonic extractives chromatogram at 280nm of wood beech dried at 55°C

Without having a perfectly identical profile with the reference chromatogram, the HPLC analysis of the acetonic extractives obtained after a mild drying, has exhibited a very similar look, meaning that the new conditions were much more respectful of the chemicals. Particularly, the catechin signal seemed to be unaltered and remained one of the most important component in terms of amount, allowing a good stability and a relatively intensive response at the UV detection.

To validate definitely the new drying conditions, experiments have been carried out to check whether the durability of the blocks treated in these conditions was similar to the durability evaluated with the high temperature treated blocks (fig. 4).

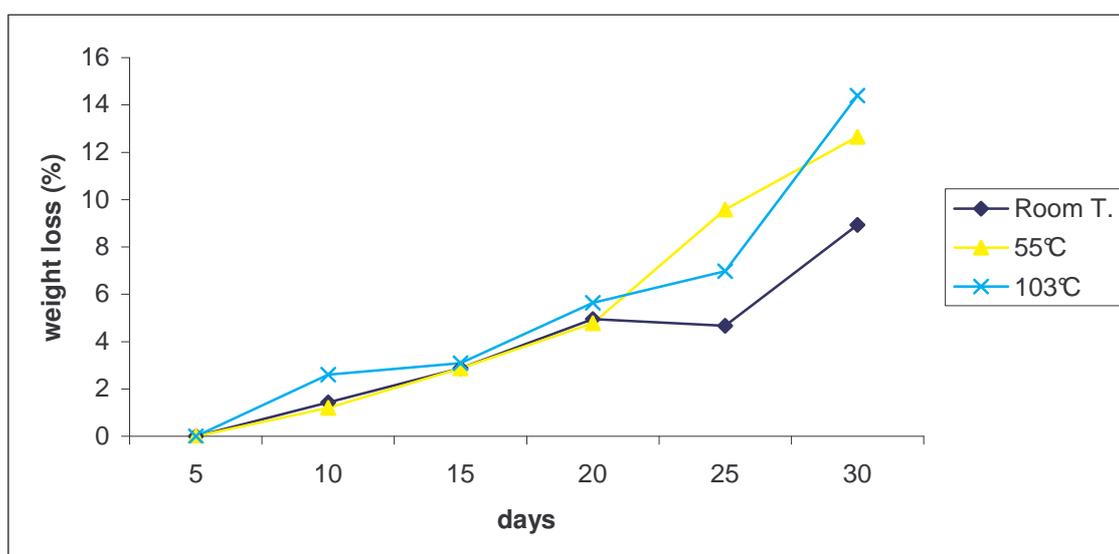


Figure 4: Influence of the blocks drying temperature on the beech durability versus *C. versicolor*

The very good similarity observed between these three curves has showed that the extractives analysis of the mild dried blocks should be directly comparable with the results usually obtained by tests complying with the exact norms conditions.

3.2. Extractives evolution under fungal action

Two series of beech blocks have been then placed on *C. versicolor* culture for a maximum duration of 30 days. These blocks were differently prepared : one half was impregnated with a solution (10^{-2} M) of propiconazole, a powerful fungicide while the rest was not treated. In this manner, it was expected that the untreated blocks extractives submitted to the fungal action would be modified and degraded when the extractives of propiconazole protected blocks would remain unchanged, particularly concerning catechin.

Drying, weight loss measurement, grinding, extraction and chromatographic analysis were performed every 5 days for both blocks series. The 5 and 30 days chromatograms are presented below (Fig.5-8)

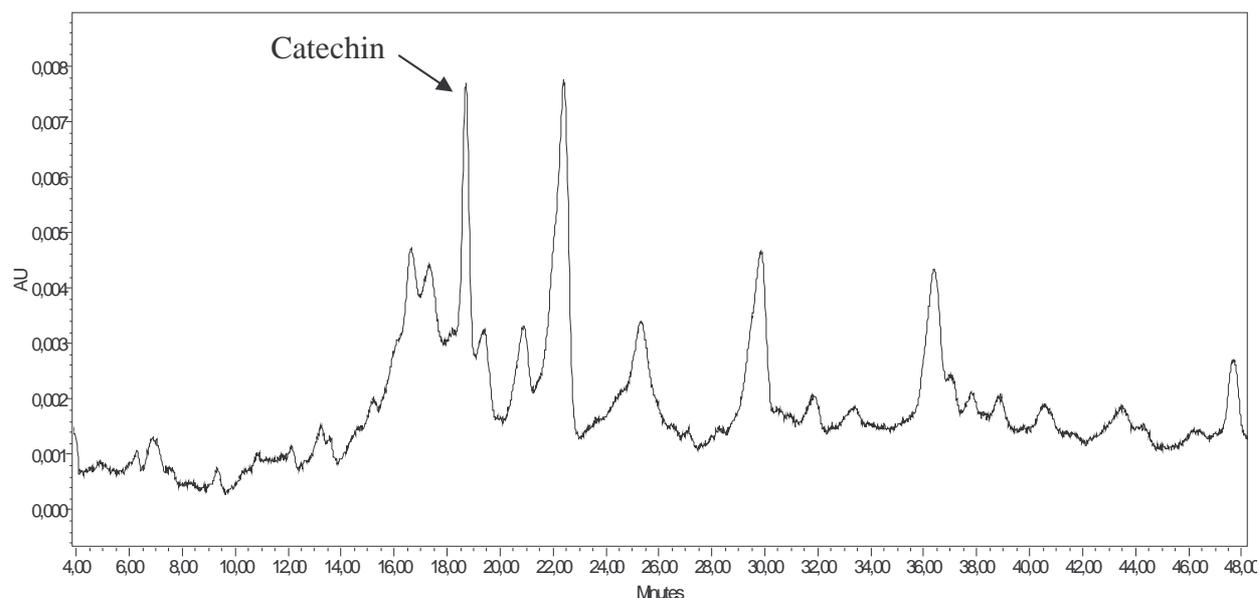


Figure 5: Acetonic extractives chromatogram at 280nm of beech blocks after 5 days on *C. versicolor* culture

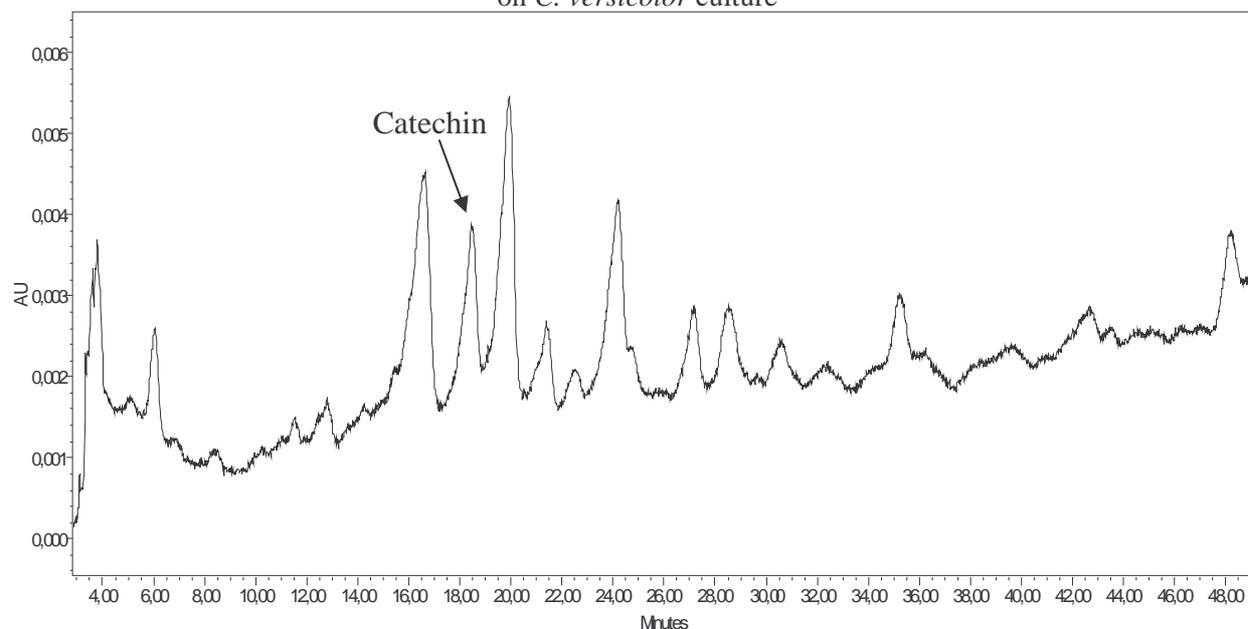


Figure 6: Acetonic extractives chromatogram at 280nm of beech blocks after 30 days on *C. versicolor* culture

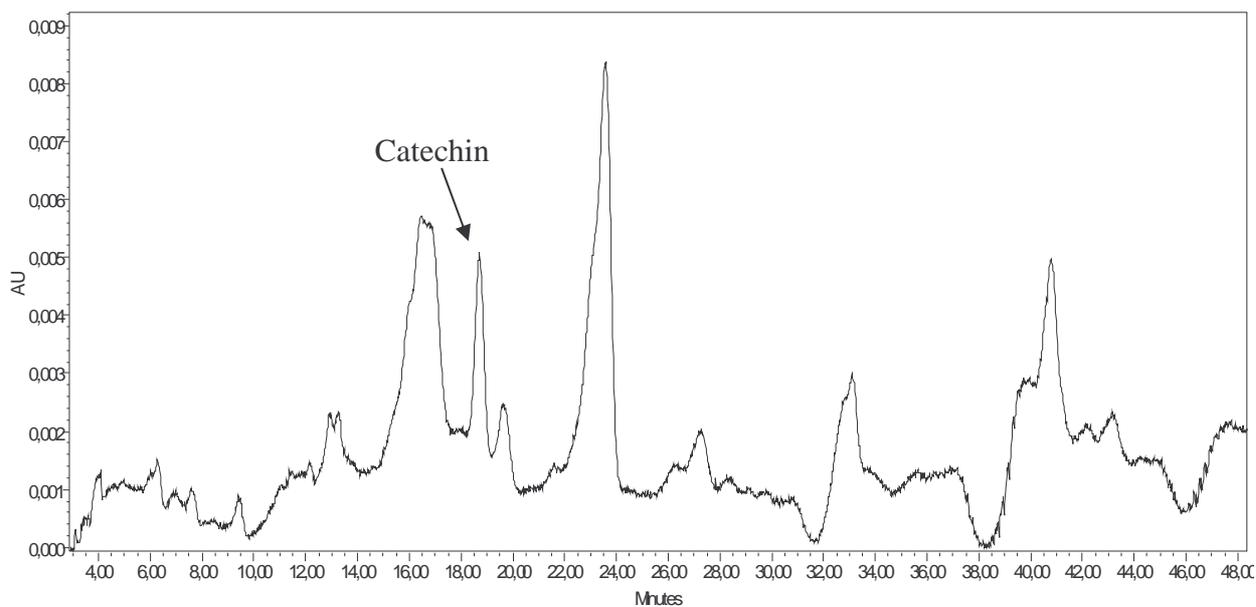


Figure 7: Acetonic extractives chromatogram at 280nm of propiconazole impregnated beech blocks after 5 days on *C. versicolor* culture

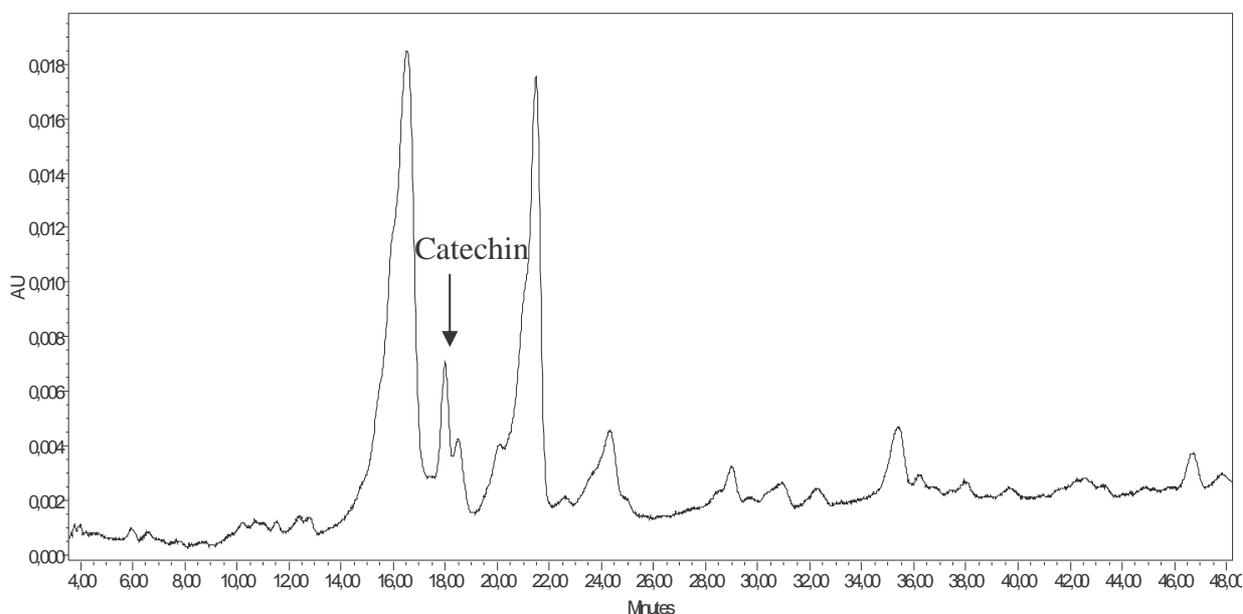


Figure 8: Acetonic extractives chromatogram at 280nm of propiconazole impregnated beech blocks after 30 days on *C. versicolor* culture

A direct interpretation was very difficult because of the difference between the chromatographic profile of each analysis. However, in the case of the propiconazole protected blocks (Fig. 7 and 8), it was possible to recognize the reference acetonic extractives profile with two additional peaks, growing with the experiment time, just before and after the catechin signal which remained constant. These two new signals could be attributed to fungal enzymatic mediators, produced in reaction to the fungicide presence.

At the opposite, considering the unprotected blocks analysis (Fig. 5 and 6), the catechin peak intensity was decreasing along the time. This trend was confirmed by the catechin concentration evolution determined taking account of every injections (Fig. 9) :

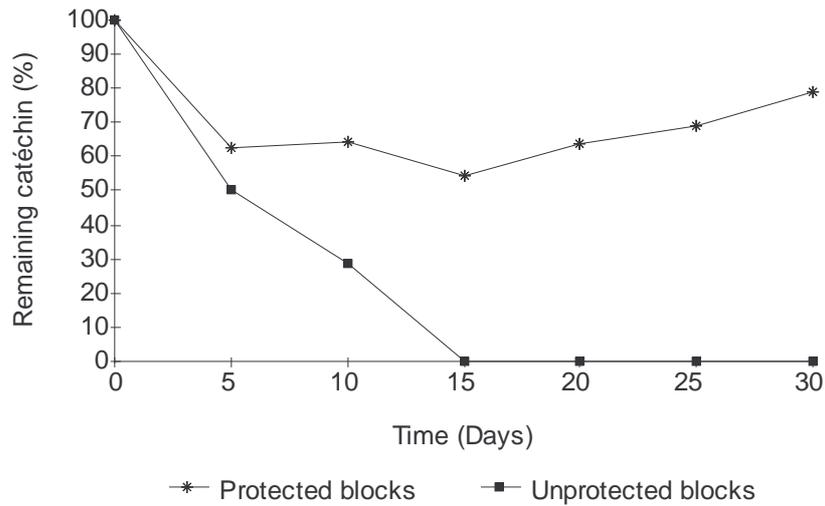


Figure 9: Catechin amount evolution for control and propiconazole protected blocks exposed to *C. versicolor*

The curve describing the evolution of catechin amount for the protected blocks, has shown that a complete protection of wood against fungal activity led to an approximately constant value after a slight decrease during the first days while the unprotected blocks curve was very different, reaching the zero value after 15 days.

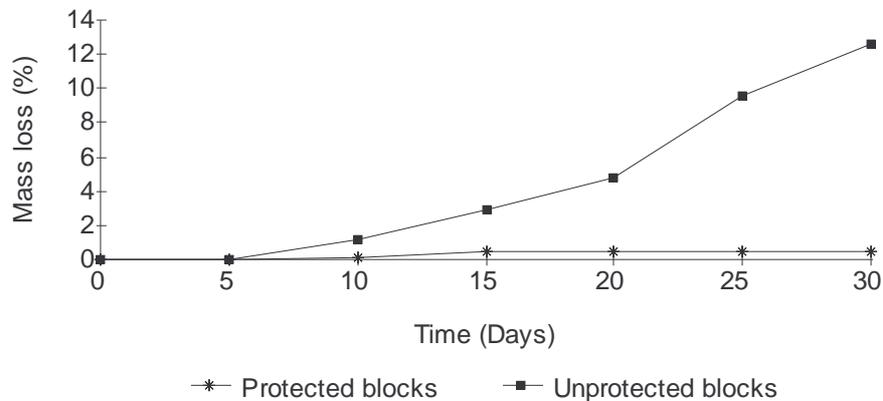


Figure 10: Mass loss measurements for control and propiconazole protected blocks exposed to *C. versicolor*

By comparing the general aspect of the catechin curves with the mass loss measurement curves (Fig. 10) obtained with the same blocks, it was clear that these two parameters evolutions were completely opposite, validating indeed the statement of a possible early wood decay biomarker role for catechin.

4. CONCLUSION

The present work demonstrates clearly that, qualitatively, a correlation is existing between the decrease of catechin amount in the extractives composition and the fungal decay level of a beech wood block. Since the determination of catechin is very a convenient process to perform with a

HPLC-UV system, it could be considered like a fast and reliable method to quantify the influence of any treatment aiming the improvement of wood durability

Other experiments are in progress to measure the catechin level corresponding to partial protection by using solutions in weaker concentrations of propiconazole to impregnate the blocks. Long duration experiments are also performing to try to correlate the mass loss after 16 weeks and the catechin rate after a short period, 15 days for instance.

5. REFERENCES

Archambault, J., Lacki., Duvnjak, Z.(1996). Conversion of catechin and tannic acid by an enzyme preparation from *Trametes versicolor* . *Biotechnology Letters*, **18** (7), 771-774

Buchert, J.; Mustranta, A.; Tamminen, T., Spetz, P (2002). Modification of spruce lignans with *Trametes hirsuta* laccase. *Holzforschung*, **56** (6), 579-584

Gazdaru, V.; Mihis, B.; Ionescu, M.(1996). Fungal degradation of phenolic compounds. *Science and Technology of Environmental Protection*, **3**(1), 41-45.

Gessner, M.O.; Scchmitt, A.L. (1996). Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (2), 415-419

Lacki, K.; Duvnjak, Z .(1997). Transformation of 3,5- dimetoxy-4-hydroxy cinnamic acid by polyphenol oxidase from the Fungus *Trametes versicolor*: Product Elucidation Studies. *Biotechnology and Bioengineering*, **57**(6), 694-703.

Nilsson, K.; Bjurman, J. (1998). Chitin as an indicator of the biomass ob two wood-decay fungi in relation to temperature, incubation time, and media composition . *Canadian Journal of Microbiology*, **44** (6), 575-581

Rabinovich, M. L.; Bolobova, A. V.; Vasil'chenko, L. G. (2004). Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* (Translation of Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya), **40**(1), 1-17.

Sutherland, G. F. J.; Aust, S.(1998). Degradation of polymers and phenols by white rot fungi. *Colloques - Institut National de la Recherche Agronomique*, **87**(Polyphenols 96), 151-163.

Toure, O.; Chahal, P. S.; Ishaque, M.; Chahal, D. S.(1997). Biodegradation of phenol with two basidiomycetous white-rot fungi. *Studies in Environmental Science*, **66**(Global Environmental Biotechnology), 649-664.

Caractérisation HPLC de marqueurs permettant de prévoir l'évolution de certaines propriétés macroscopiques du bois lors de différents processus de dégradation

Résumé : L'identification de marqueurs susceptibles de mettre en évidence et quantifier l'altération du bois par différents agents de dégradation peut présenter un grand intérêt dans la mise au point de méthodes de contrôle du matériau. Dans la première partie de ce travail, la caractérisation et le dosage des composés extractibles de deux essences non durables, le hêtre et le chêne soyeux, exposées à différents champignons de pourritures blanches ou brunes préalablement traitées ou non avec du propiconazole a été effectué. L'évolution de la quantité et de la nature des extractibles dépend directement de la présence du biocide et permet de différencier clairement les éprouvettes en fonction du taux de dégradation de ces dernières. C'est le cas notamment de la catéchine présente dans les extraits de hêtre, qui disparaît rapidement lorsque le bois est exposé à un agent de pourriture et qui peut à ce titre constituer un marqueur de l'attaque du bois. Dans la seconde partie de ce travail, l'évolution de la composition chimique du bois traité par pyrolyse douce à 240°C sous azote a été étudiée. Bien que les résultats obtenus confirment en grande partie ceux décrits précédemment dans la littérature, le dosage des différentes fractions du bois (lignine et holocellulose) et l'analyse des monosaccharides constitutifs de la fraction holocellulose du bois ont permis de mettre en évidence un important phénomène de carbonisation rapporté jusqu'à présent pour des températures plus élevées. Ce phénomène confirmé par RMN¹³C peut être à l'origine de certaines des nouvelles propriétés du matériau.

Mots clés : bois, catéchine, champignons de pourritures, extractibles, marqueur, holocellulose, HPLC, lignine de Klason, monosaccharide, traitement thermique, RMN ¹³C , carbonisation

HPLC characterization of markers allowing evaluation of some wood macroscopic properties during various degradation processes

Abstract: The identification of markers able to highlight and quantify wood deterioration by different degradation agents can be of great interest in the development of material control methods. In the first part of this work, the characterization and the quantification of the two non durable wood species extractives, beech and silky oak, treated or not with propiconazole and exposed to various white rot or brown rot fungi were carried out. The evolution of the quantity and the nature of extractives depend directly on the presence of biocide and allowed to clearly differentiate degraded and non-degraded samples. This is particularly true in the case of catechin identified in the extracts of beech, which is rapidly degraded by rotting fungi constituting therefore a valuable marker of wood degradation. In the second part of this work, the evolution of the chemical composition of wood treated by mild pyrolysis at 240°C under nitrogen was investigated. Although the results mainly confirm those described previously in the literature, isolation of lignin and holocellulose fractions and analysis of monosaccharides constitutive of holocellulose fraction highlighted an important carbonization of wood reported up to now for higher temperatures. This phenomenon is confirmed by ¹³C NMR and could be at the origin of some of the new properties of the material.

Keywords: wood, catechin, rotting fungi, extracts, marker, holocellulose, HPLC, Klason lignin, monosaccharide, heat treatment, ¹³C NMR, carbonization