



**ANALYSE STRUCTURALE DES LIGNINES PAR
RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE :
UTILISATION DES NOUVELLES SEQUENCES
IMPULSIONNELLES ET ETUDE DES LIGNINES
EXTRAITES DE BOIS TRAITE PAR
AUTOHYROLYSE RAPIDE**

Michel Bardet

► **To cite this version:**

Michel Bardet. ANALYSE STRUCTURALE DES LIGNINES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE : UTILISATION DES NOUVELLES SEQUENCES IMPULSIONNELLES ET ETUDE DES LIGNINES EXTRAITES DE BOIS TRAITE PAR AUTOHYROLYSE RAPIDE. Chimie analytique. UNIVERSITE SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE, 1987. Français. NNT : . tel-01713695

HAL Id: tel-01713695

<https://hal.science/tel-01713695>

Submitted on 20 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE, TECHNOLOGIQUE
ET MEDICALE DE GRENOBLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Michel BARDET

**ANALYSE STRUCTURALE DES LIGNINES PAR
RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE :
UTILISATION DES NOUVELLES SEQUENCES
IMPULSIONNELLES ET ETUDE DES LIGNINES
EXTRAITES DE BOIS TRAITE PAR
AUTOHYDROLYSE RAPIDE**

Soutenue le 1^{er} Juillet 1987 devant la Commission d'Examen

JURY

Président : Mr J.J. DELPUECH

Examineurs : Mrs Cl. BEGUIN
D. GAGNAIRE
K. LUNDQUIST
M. METCHE
F. PLA

Mme D. ROBERT

ANALYSE STRUCTURALE DES LIGNINES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE :
UTILISATION DES NOUVELLES SEQUENCES MULTI-IMPULSIONNELLES
ET ETUDE DES LIGNINES EXTRAITES DE BOIS TRAITE PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE

Michel BARDET

Laboratoires de Chimie
Département de Recherche Fondamentale
Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble
85 X, 38041 GRENOBLE CEDEX

à mes parents

à Béatrice

Je remercie les membres du jury de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de le juger.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur GAGNAIRE, Directeur des Laboratoires de Chimie du Département de Recherche Fondamentale, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Par son intermédiaire, je remercie le Commissariat à l'Energie Atomique des conditions matérielles excellentes dont j'ai pu bénéficier.

Danielle ROBERT m'a proposé le présent sujet, je l'assure de ma gratitude pour le soutien qu'elle m'a apporté au cours de ce travail, et pour l'atmosphère agréable dans laquelle s'est déroulée cette thèse. Elle m'a amené à collaborer avec G. BRUNOW, K. LUNDQUIST et G. GELLERSTEDT, qui m'ont fait bénéficier, de manière tout à fait sympathique, de leurs compétences dans la chimie des lignines.

Je n'oublierai pas la contribution essentielle de Marie-Françoise FORAY ; nous avons commencé ensemble à explorer la RMN multi-impulsionnelle et cette collaboration a été déterminante pour l'obtention de résultats.

L'aide de Marie-Josèphe CORMUREAU pour la frappe définitive et l'assistance de Michel AUBERT pour la réalisation des dessins, ont été des appuis inestimables.

INTRODUCTION	1
 <u>PREMIERE PARTIE</u> : ETAT DE NOS CONNAISSANCES SUR LES TRAITEMENTS DE LA BIOMASSE PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE ET SUR LES METHODES DE CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES LIGNINES	 7
 I.1 ETAT DE NOS CONNAISSANCES SUR LES TRAITEMENTS DE LA BIOMASSE PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE OU NON.	 8
- I.11 Généralités - I.12 Etat des connaissances sur les procédés de traitement de la biomasse par autohydrolyse rapide. - I.13 Sensibilité des constituants pariétaux aux conditions hydrolytiques - I.14 Modifications structurales décrites dans le cas de l'autohydrolyse rapide	
 I.2 CARACTERISATION PHYSICOCHEMIQUE DES LIGNINES	 16
- I.21 Définition et généralités sur les lignines - I.22 Méthodes chimiques d'analyse des lignines - I.221 Structure des lignines : un puzzle commencé il y a un siècle et demi - I.222 Etude des produits de dégradation chimique des lignines - I.223 Synthèse de polymères modèles - I.23 Méthodes physiques d'analyse des lignines - I.231 Spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet - I.232 Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge - I.233 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) 1) Analyse qualitative 2) Analyse quantitative 3) Analyse par les expériences multi-impulsionnelles	

DEUXIEME PARTIE : PRESENTATION DE LA RMN ^{13}C MULTI-IMPULSIONNELLE
A UNE DIMENSION APPLICATION DES EXPERIENCES RMN ^{13}C
MONO ET BIDIMENSIONNELLE A L'ETUDE STRUCTURALE
DE LIGNINES NATURELLES ET ARTIFICIELLES **33**

II.1 QUELQUES RAPPELS SUR LA RMN MULTI-IMPULSIONNELLE **35**

- II.11 La transformée de Fourier
- II.12 Description des expériences RMN dans un référentiel tournant.
- II.13 Effet des inhomogénéités du champ principal B_0
- II.14 Retour à l'équilibre de l'aimantation après une impulsion excitatrice
- II.15 Expérience d'écho de spin
- II.16 Séparation des signaux suivant le nombre de protons liés aux carbones en RMN monodimensionnelle
 - II.161 Séparation des signaux RMN en fonction des constantes de couplage carbone-proton
 - II.162 Expérience DEPT (Distortionless enhancement by polarisation transfert) : Séparation des signaux ^{13}C par transfert d'aimantations des protons sur les carbones
 - a) Transfert de polarisation non sélectif
 - b) Transfert d'aimantation non sélectif.

II.2 APPLICATION DE LA RMN MULTI-IMPULSIONNELLE A UNE DIMENSION
A L'ETUDE STRUCTURALE DES LIGNINES **49**

- II.21 Influence des paramètres expérimentaux sur la qualité des spectres spécifiques enregistrés avec l'expérience DEPT
 - II.211 Temps de répétition de l'expérience DEPT
 - II.212 Choix d'une valeur moyenne des constantes de couplage $J^{13}\text{C-H}$
 - II.213 Calibration des impulsions à 90° et à 180° sur les ^1H et ^{13}C
- II.22 Les spectres CH , CH_2 et CH_3 enregistrés avec les séquences DEPT sont-ils quantitatifs ?
 - II.221 Vérification de la quantitativité des spectres RMN ^{13}C avec la séquence CI
 - II.222 Mise en évidence de la quantitativité des spectres CH , CH_2 et CH_3 enregistrés par l'expérience DEPT.
 - II.223 Généralisation
 - II.224 Etude du rapport signal sur bruit des spectres enregistrés avec la séquence DEPT
- II.23 Autres méthodes pour séparer les signaux suivant le nombre de protons portés par les carbones

II.3 APPORTS DES EXPERIENCES DEPT DANS L'ANALYSE STRUCTURALE PAR
RMN DE LIGNINES NATURELLES (MWL) ET ARTIFICIELLES (DHP)

72

II.31 Choix des lignines étudiées

II.32 Rappels de quelques conditions expérimentales

II.321 Expériences utilisées

II.322 Exploitation quantitative des spectres

II.33 Résultats qualitatifs

II.331 Région des signaux entre 100 et 158 ppm

II.332 Région des signaux entre 100 et 50 ppm

II.3321 Etudes des principales structures du
DHP

II.3322 Etude des principales structures de la
lignine MWL du sapin

II.3323 Etude des principales structures de
lignines MWL de bouleau et peuplier

II.34 Résultats quantitatifs

II.341 Détermination et interprétation du rapport R
pour les différentes lignines étudiées

II.3411 Détermination du rapport R et du taux
de condensation

II.3412 Résultats et interprétation

II.342 Dosage des principales structures d'un polymère
artificiel

II.3421 Dosage des structures β -0-4, β - β , β -5

II.3422 Mise en évidence et dosage de
structures diphényles et aryl-aryl
éther.

II.4 APPORTS DE L'EXPERIENCE 2D INADEQUATE DANS L'ANALYSE
STRUCTURALE D'UNE LIGNINE MWL DE PEUPLIER

93

II.41 Rappels expérimentaux

II.42 Résultats et discussion

II.421 Structures syringarésinols (β - β) et
phénylcoumaranes (β -5)

II.422 Structures alkyl-aryl éther β -0-4

TROISIEME PARTIE : AUTOHYDROLYSE RAPIDE DU BOIS DE PEUPLIER ET
CARACTERISATION STRUCTURALE DES LIGNINES
EXTRAITES

104

III.1 EXTRACTION DES BOIS DE PEUPLIER TRAITES
PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE. BILAN EN MATIERE

105

III.11 Généralités

III.12 Bilan en matière des échantillons du plan
d'expérience PI.

III.121 Justification du protocole suivi

III.122 Résultats

III.13 Bilan en matière des échantillons du plan
d'expérience PII.

III.131 Justification du protocole suivi

III.132 Résultats

III.14 Extraction à l'acétone

III.141 Justification du protocole suivi

III.142 Résultats

III.15 Fractionnement des extraits de lignines par
précipitation dans l'éther éthylique

III.2 ANALYSE QUALITATIVE EN RMN DU ^{13}C DES LIGNINES
EXTRAITES DE BOIS TRAITES PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE.
APPORTS DE LA RMN ^1H ET DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE.

114

III.21 Analyse qualitative des spectres en RMN ^{13}C
Evolution générale des échantillons selon la
sévérité du traitement.

III.211 Structures alkyl-aryl éther

III.212 Structures parahydroxybenzoïque

III.213 Signaux de carbones aliphatiques saturés à
haut champ

III.22 Interprétation de l'élargissement des signaux en RMN
 ^{13}C des lignines extraites de bois traités par
autohydrolyse rapide

III.23 Contaminants osidiques - Apports de la RMN ^1H

III.24	Apports des expériences DEPT dans l'étude qualitative des lignines extraites des bois traités par autohydrolyse rapide	
III.241	Région des signaux de carbones aromatiques a) carbones des unités aromatiques b) unités stilbène c) unités parahydroxybenzoïque	
III.242	Région des signaux des carbones du maillon propane a) structure résinol (β-β), phényl coumarane (β-5), alkyl-aryle (β-1) et maillon aliphatique libre b) structures alkyl-aryl éther β-0-4 c) carbones saturés en dessous de 50 ppm	
III.25	Résumé des principaux résultats établis	
III.26	Apport de la spectroscopie infrarouge dans l'analyse structurale des lignines extraites de bois traités par autohydrolyse rapide	141
III.3	EXPLOITATION QUANTITATIVE DES SPECTRES RMN ^{13}C ENREGISTRES AVEC LES SEQUENCES "CI" ET "DEPT"	147
III.31	Analyse quantitative des extraits totaux de lignines	
III.311	Rappels expérimentaux : choix des échantillons et des expériences RMN	
III.312	Résultats obtenus sur les extraits totaux non acétylés a) Evolution de l'unité phénylpropane b) Dosage des unités parahydroxybenzoïque (pOH) et détermination du degré de condensation (d)	
III.313	Résultats obtenus sur les lignines acétylées : dosage des différents hydroxyles a) Résultats obtenus sur les lignines acétylées solubles dans l'éther éthylique (ASE) b) Résultats obtenus sur les lignines acétylées insolubles dans l'éther éthylique (AIE) c) Comparaison entre les fractions AIE et ASE	

- III.314 Mise en évidence et interprétation de l'existence de corrélation entre les mesures effectuées
- III.315 Récapitulatif des principaux résultats
- III.32 Essais de caractérisation structurale complète des lignines insolubles dans l'éther éthylique
 - III.321 Choix des échantillons et des expériences RMN
 - III.322 Détermination de la composition en C, H et O : analyse centésimale par RMN
 - a) principe de calcul
 - b) Résultats
 - III.323 Interprétation des teneurs en méthoxyles déterminées par RMN : conséquences structurales
 - a) disparition des méthoxyles
 - b) augmentation de l'aire des carbones aromatiques
- III.4 ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES COMPOSES DE FAIBLES MASSES MOLECULAIRES

- III.41 Rappels expérimentaux
 - III.411 Généralités
 - III.412 Chromatographie sur gel perméable
- III.42 Résultats
 - III.421 Analyse des chromatogrammes obtenus par CPG
 - a) comparaison des extraits "C", "R" et de la lignine MWL
 - b) Effets de la précipitation dans l'éther éthylique
 - III.422 Séparation quantitative des monomères, dimères et oligomères
 - III.423 Identification des monomères et dimères
 - a) Analyse des monomères
 - b) Analyse des dimères
 - c) Séparation quantitative du syringarésinol et de l'épisyringarésinol

- III.51 Généralités
- III.52 Modélisation des comportements des constituants parietaux durant l'autohydrolyse rapide
- III.53 Proposition de mécanismes chimiques pour l'interprétation des modification structurales
 - III.531 Dépolymérisation des lignines
 - III.532 Mécanismes de repolymérisation
 - a) condensation impliquant la formation de carbocation
 - b) condensation avec le formaldéhyde
 - c) Réaction radicalaire
- III.54 Valorisation de la biomasse traitée par autohydrolyse rapide et perspective du projet

QUATRIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

IV.1 PREPARATION ET EXTRACTION DES CONSTITUANTS PARIETAUX
DES BOIS DE PEUPLIER TRAITE PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE

- IV.11 Principe du fonctionnement du pilote du Centre Technique du Papier (C.T.P.)
 - IV.111 Description du pilote
 - IV.112 Description d'une expérience
 - IV.113 Choix du matériau ligno-cellulosique
 - IV.114 Paramètres de traitement retenus pour ces expériences

IV.2 EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES LIGNINES DES BOIS TRAITES

- IV.21 Extraction des lignines
 - IV.211 Préparation des lignines A et B extraite au dioxane-eau
 - IV.212 Extraction des substances lipophiles des extraits aqueux
 - IV.213 Séchage des produits
 - IV.214 Préparation des lignines C et D extraites à l'acétone
- IV.22 Fractionnement des extrats de lignine
 - IV.221 Précipitation dans l'éther-éthylique
 - IV.222 Extraction successive par différents solvants
 - IV.223 Fractionnement par partage de phase
 - IV.224 Chromatographie sur gel perméable (CGP)
 - IV.225 Chromatographie sur colonne ouverte
 - IV.226 Chromatographie liquide haute performance CLHP

- IV.31 Analyse qualitative par chromatographie sur gel perméable
- IV.32 Chromatographie en couche mince
- IV.33 Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)
 - IV.331 Analyse des dérivés triméthylsilylés de la fraction des monomères
 - a) préparation des échantillons
 - b) conditions analytiques
 - IV.332 Analyse des constituants de la fraction des dimères
 - Préparation des échantillons
 - a) conditions analytiques

IV.4 MODIFICATIONS CHIMIQUES DES LIGNINES

- IV.41 Acétylation
- IV.42 Traitement à la sonde
- IV.43 Hydrogénation

IV.5 SYNTHÈSE DE COMPOSÉS MODÈLES

- IV.51 Synthèse d'un dimère du type β -0-4 dans la gallicyle : le (méthoxy-3 hydroxy-4 phényl)-1 (méthoxy-2 phénoxy)-2 propanediol-1,3
- IV.52 Synthèse d'un trimère ayant une structure alkyl-diaryl éther α -0-4 β -0-4
 - IV.521 Synthèse de l'apocynol
 - IV.522 Synthèse de la méthylène quinone-QM
 - IV.523 Synthèse de structure α -0-4, β -0-4
- IV.53 Synthèse du dihydrogénéopolymère (DHP) de l'alcool coniférylique
 - IV.531 Synthèse de l'alcool coniférique
 - a) Synthèse du férulate d'éthyle
 - b) Synthèse de l'alcool coniférylique
 - IV.532 Synthèse du DHP

IV.6 EXTRACTION DES LIGNINES DES BOIS NON TRAITES	231
---	-----

IV.7 ANALYSES SPECTROSCOPIQUES	232
--------------------------------	-----

IV.71 Résonance magnétique nucléaire

IV.711 Appareillage

IV.712 Solvants et concentration

IV.713 Séquences et paramètres utilisés

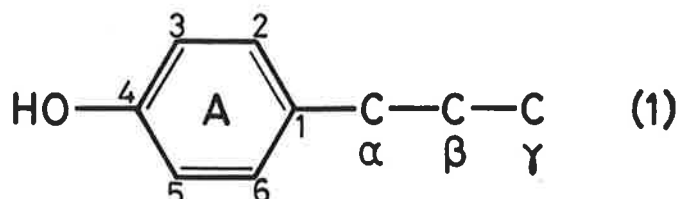
- a) Expérience CI
- b) Expérience DEPT
- c) Expérience QUAT
- d) Expérience JMOD
- e) Expériences d'inversion de récupération et d'écho de spins
- f) Expérience bidimensionnelle de corrélation proton-proton par les couplages scalaires
- g) Expérience bidimensionnelle de corrélation carbone-proton par les couplages scalaires
- h) Expérience bidimensionnelle de corrélation carbone-carbone par les couplages scalaires

IV.714 Exploitation quantitative des spectres RMN

BIBLIOGRAPHIE	240
---------------	-----

Nomenclature et signification des principales abréviations

Notation des carbones de la structure phénylpropane



gaïacyle : structure du cycle aromatique A substitué par un méthoxyle en position 3

syringyle : structure du cycle aromatique A substitué par deux méthoxyles en positions 3 et 5

séquence CI : découplage des protons en créneaux inverses ; fait référence à l'expérience RMN, ou aux spectres enregistrés avec celle-ci qui permet d'enregistrer de manière quantitative les spectres RMN des carbones treize découplés des protons

séquence DEPT : Distorsion Enhancement by Polarization Transfer ; fait référence à l'expérience RMN, ou aux spectres enregistrés avec celle-ci, qui permet d'enregistrer de manière sélective les spectres des carbones CH, CH₂ et CH₃

DHP : déhydrogénéopolymère, polymère synthétique obtenu par polymérisation radicalaire d'alcools phénylpropénoïques ; il est généralement considéré comme un polymère modèle de lignine naturelle.

INADEQUATE : Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment ; fait référence à l'expérience RMN, ou aux cartes bidimensionnelles enregistrées avec celle-ci, qui permet de repérer les carbones directement liés.

MWL : Milled Wood Lignin, lignine extraite de bois moulu selon un protocole très précis mis au point par Björkman et collaborateurs.

QUAT : Quaternary only ; fait référence à l'expérience RMN, ou aux spectres enregistrés avec celle-ci qui permet d'enregistrer uniquement les signaux des carbones quaternaires.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

Jusqu'à présent, la chimie organique dans l'industrie reposait essentiellement sur la chimie des pétroles et des gaz naturels. Ces réserves fossiles ont permis le développement industriel et technologique de nos sociétés modernes : elles sont à la fois source d'énergie et source de produits chimiques, dont certains polymérisables en une infinité de matériaux non métalliques ont des propriétés tout à fait remarquables et constituent notre environnement quotidien.

Très vite on s'est aperçu que les ressources fossiles n'étaient pas inépuisables et ne représentaient guère plus qu'une énergie équivalente à 21 jours d'ensoleillement à la surface de la terre (1). La localisation et la qualité des gisements ne sont pas équitablement réparties à la surface de la terre. Certaines nations sont déjà dans un tel état de dépendance énergétique vis-à-vis de ces ressources que les conséquences socio-économiques seront très lourdes à plus ou moins brèves échéances. Le défi de nos sociétés clairement lancé au cours de conférences (2, 3) sur ce sujet est alors de trouver des matières premières pour remplacer peu à peu celles tirées des gisements fossiles.

L'exploitation de la biomasse végétale apparaît alors comme une des solutions potentielles. La biomasse végétale est le premier stockage d'énergie solaire par la photosynthèse qui transforme l'eau et le gaz carbonique en matière organique. C'est le processus biochimique dont dépend toute vie animale sur terre. Malgré un rendement photochimique très faible, la photosynthèse est un processus très productif : en effet, les écologues bien avant les crises pétrolières estimèrent que 100 billions de tonnes de matière végétale dont 65 % sur les continents sont synthétisés chaque année (4). Tous les végétaux n'offrent pas les mêmes potentialités d'exploitation comme source de biomasse, les arbres par exemple, par la concentration et le stockage en matière ligno-cellulosique qu'ils réalisent présentent un intérêt certain (5).

L'intérêt pour la biomasse n'est pas nouveau puisque les industries papetières l'exploitent depuis longtemps pour l'obtention de pâtes dans la fabrication des papiers, des cartons et de différents dérivés cellulosiques.

Toute la stratégie de la chimie papetière consiste à séparer le bois en fibres primaires tout en les dégradant le moins possible.

Cette séparation peut être obtenue soit par des moyens mécaniques soit par l'action de réactifs chimiques soit par une combinaison de moyens mécaniques et l'addition de réactifs chimiques (6, 7). La figure 1 illustre l'importance des différents procédés.

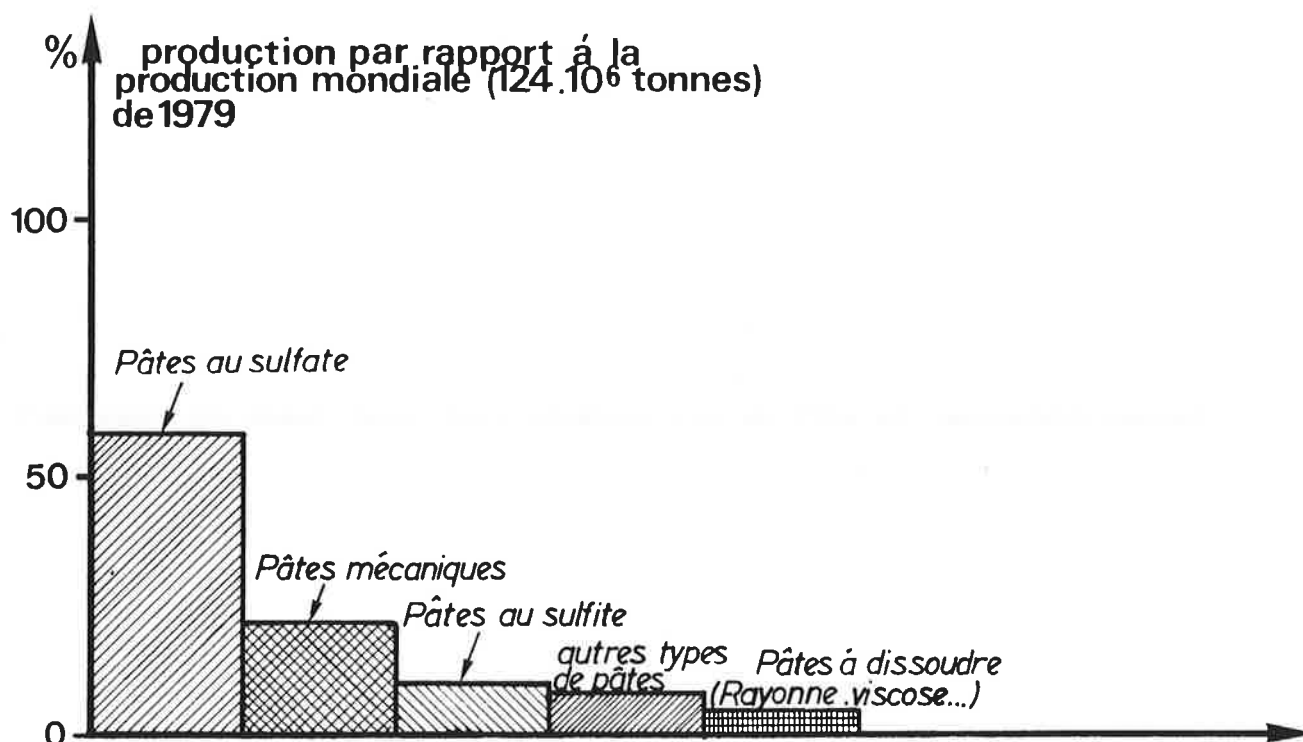
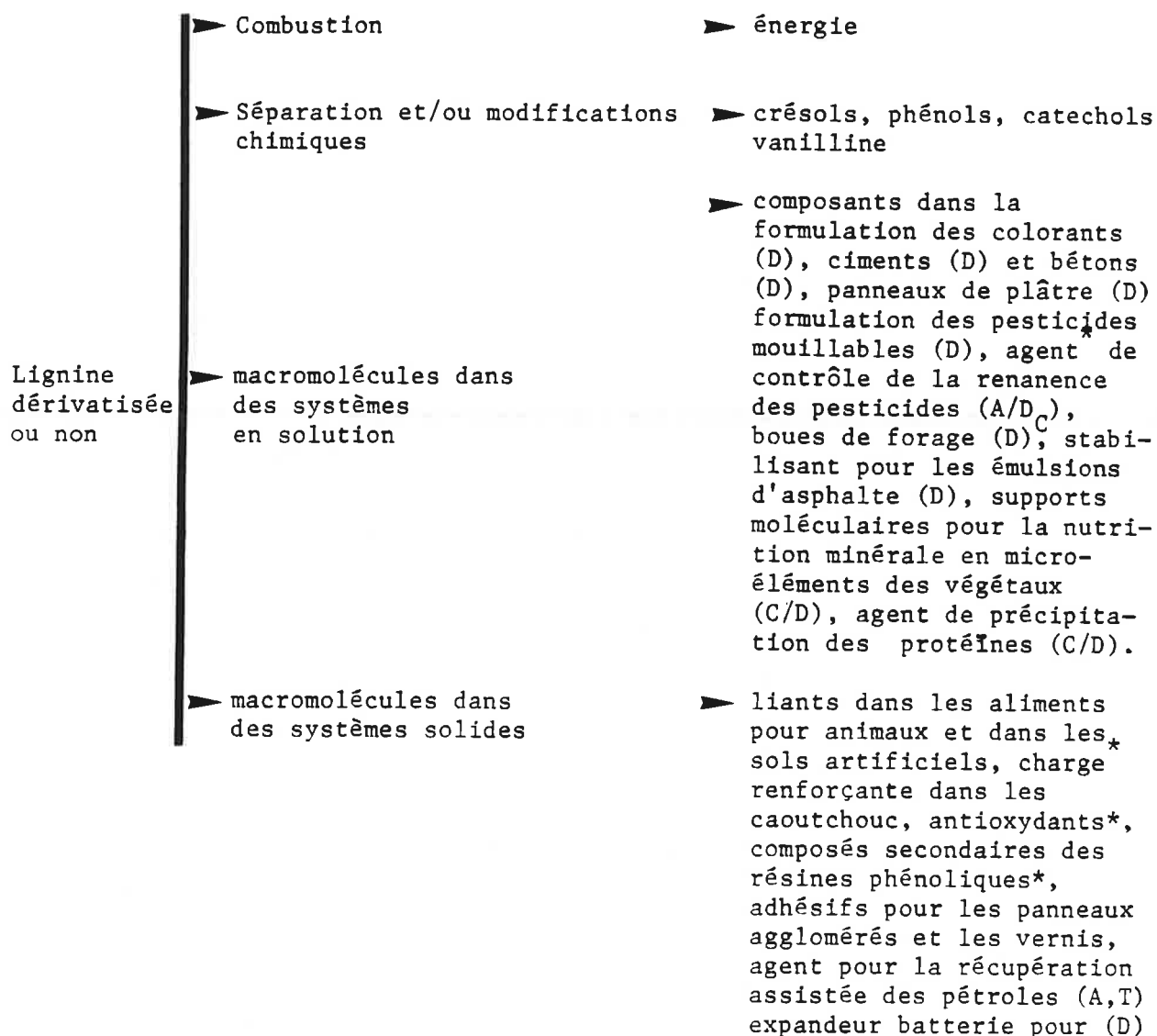


Figure 1 : Importance des différents procédés papetiers.

Les procédés chimiques reposent essentiellement sur une solubilisation des lignines modifiées qui se trouvent alors entraînées dans les liqueurs papetières, tandis que restent les pâtes cellulósiques, insolubles. Les lignines ainsi extraites sont généralement brûlées, permettant un recyclage de certains réactifs et une récupération thermique. Jusqu'à maintenant seulement 3 à 4 pour cent de la masse de ces lignines (8) principalement sous forme de lignosulfonates sont utilisés autrement, mais de nombreuses utilisations potentielles existent et pourraient être développées (8, 9) (Figure 2).

Figure 2 : UTILISATIONS ACTUELLES ET POTENTIELLES* DES LIGNINES
DERIVATISEES OU NON



Abréviation des propriétés moléculaires sollicitées : D : dispersion,
A : absorption
De : désorption
C : complexation
T : tension d'interface.

La chimie papetière repose essentiellement sur des procédés anciens et polluants qui n'utilisent que le constituant cellulosique du bois. Les crises pétrolières, la réglementation liée aux industries polluantes ont amené les papetiers à définir de nouveaux axes de recherche :

- transformer les lignines en produits à fortes valeurs ajoutées
- rechercher de nouveaux procédés qui permettent une meilleure exploitation de la biomasse végétale.

Des études faites jusqu'à maintenant, deux stratégies apparaissent pour valoriser les matériaux ligno-cellulosiques :

- Obtention de petites molécules (10-11-12) directement utilisables (éthanol) ou utilisables comme réactifs pour la synthèse organique.
- Séparation du matériau ligno-cellulosique en ses trois constituants de base (celluloses, hemicelluloses et lignines) et dans ce cas c'est souvent leurs propriétés macromoléculaires qui sont recherchées et exploitées (13-14). Les technologies utilisées (autohydrolyse, autohydrolyse rapide, procédés organosolubles ...) sont regroupées sous la terminologie de procédés papetiers non conventionnels.

C'est dans ce contexte que le Centre Technique du Papier de Grenoble (C.T.P.) a entrepris la construction d'un pilote pour fractionner la biomasse végétale en ses principaux constituants. Le principe de base choisi pour le traitement des végétaux est simple et s'inspire de la technologie IOTECH (15). C'est le résultat d'une hydrolyse acide due aux acides libérés "in situ" lorsque le matériel est soumis à des pressions de vapeurs d'eau élevées, combinée à une destructuration mécanique lors du retour brutal à la pression atmosphérique.

Des études préliminaires montrèrent (16) qu'après un tel traitement les constituants du bois étaient alors facilement séparés. Mais une évaluation technologique précise devait être conduite afin d'estimer l'opportunité ou non de développer la technologie à l'échelle d'une production industrielle.

C'est ainsi que le C.T.P. soutenu par un contrat de la Direction Générale de la Recherche Scientifique et Technique (D.G.R.S.T.) s'est associé à différents laboratoires ayant des domaines de compétences spécifiques (Fig. 3) pour étudier les performances du pilote.

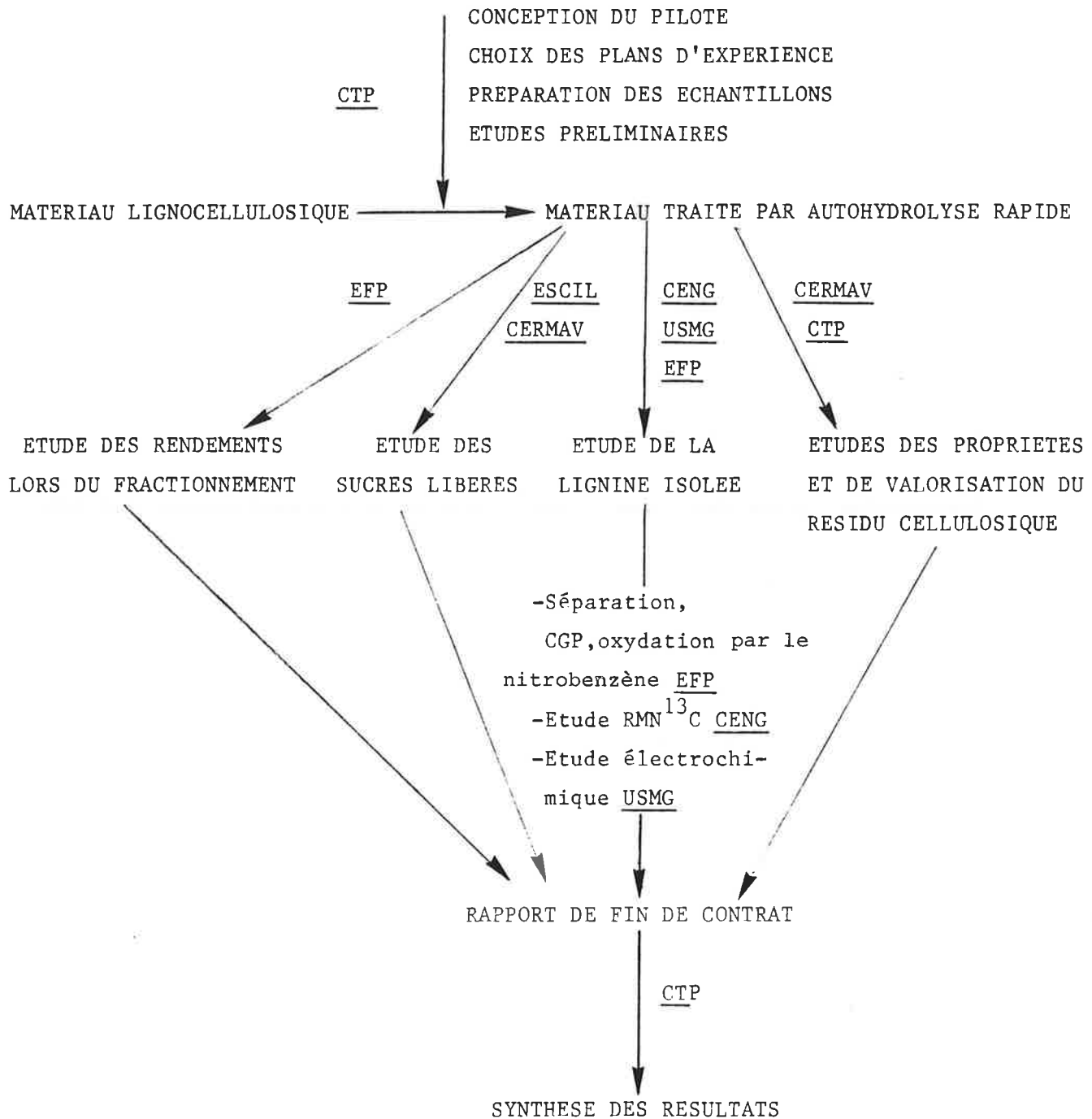
Cette étude visait dans une première étape à déterminer l'influence des conditions expérimentales sur la séparation et les caractéristiques structurales des constituants du bois traité. Le travail de notre laboratoire dans le cadre de ce contrat a porté sur l'étude des lignines extraites, plus particulièrement par l'analyse qualitative et quantitative en spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN).

Cette étude s'inscrit tout à fait dans un des axes de recherche développés au laboratoire, à savoir l'étude structurale des lignines. Les résultats apportés par ce travail sont présentés en deux parties, développées, après des rappels sur l'état de nos connaissances sur les traitements de la biomasse végétale par autohydrolyse rapide et sur la caractérisation structurale des lignines.

La première partie concerne l'application et le développement des nouvelles séquences de RMN à l'étude de lignines naturelles d'origines taxonomiques diverses et de lignines artificielles synthétisées "in vitro". Nous avons ainsi enrichi l'outil RMN, utilisé jusqu'à maintenant pour la caractérisation structurale des lignines, de certaines séquences RMN qui sont apparues ces dernières années dans la littérature.

La deuxième partie concerne l'étude des lignines extraites de bois de peuplier traité par autohydrolyse rapide. Cette étude a fait appel à la spectroscopie RMN mais aussi à d'autres méthodes d'analyse : spectroscopie infrarouge, chromatographie sur gel perméable, séparation et analyse des monomères et des dimères des échantillons de lignines extraites. Cette étude a été développée afin de caractériser la structure des lignines extraites suivant les conditions de traitement et d'établir les modifications structurales entraînées par l'autohydrolyse rapide. Une telle étude structurale est fondamentale si l'on veut dans une étape ultérieure, utiliser ces matériaux comme produits de base pour développer les différentes applications potentielles.

FIG. 3 : REPARTITION DU TRAVAIL EXPERIMENTAL
ENTRE LES DIFFERENTS LABORATOIRES



ABREVIATIONS :

CENG : Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble ; CERMAV : Centre d'Etudes et de Recherche sur les Macromolécules Végétales (Grenoble) ; CTP : Centre Technique du Papier (Grenoble) ; EFP : Ecole Française de Papeterie ; ESCIL : Ecole Supérieure de Chimie Industrielle de Lyon ; USMG : Université Scientifique et Médicale de Grenoble.

PREMIERE PARTIE

ETAT DE NOS CONNAISSANCES SUR LES TRAITEMENTS DE LA BIOMASSE
PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE ET SUR LES METHODES DE CARACTERISATION
PHYSICO-CHIMIQUE DES LIGNINES

I.1 ETAT DE NOS CONNAISSANCES SUR LES TRAITEMENTS DE LA BIOMASSE PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE OU NON

I.11 Généralités

Il existe de nombreuses installations (tab. 1) dans le monde qui permettent de déstructurer chimiquement et mécaniquement la biomasse végétale par l'effet d'un traitement par la vapeur d'eau à des pressions élevées combiné à un retour brutal à la pression atmosphérique. Le point tout à fait nouveau et en l'honneur du C.T.P. est le lancement d'une étude sur le devenir des constituants pariétaux en fonction des conditions expérimentales afin de répondre à la question triviale : "Que se passe-t-il durant le traitement par autohydrolyse rapide des matériaux ligno-cellulosiques".

En effet, malgré les cinquante années d'âge par exemple du procédé Masonite, nous ne connaissons aucune étude structurale précise des composés obtenus à l'issue du traitement. Ces projets ont été l'apanage de compagnies industrielles qui possèdent leurs propres structures de recherche, de ce fait les résultats sont souvent couverts d'un certain secret. Cela est lié à notre avis, à la fascination présentée par ces procédés du fait de leur simplicité, leur efficacité apparente et leur faible coût financier pour séparer les constituants pariétaux. La comparaison des performances des pilotes s'avère difficile puisque les traitements s'appliquent à des matériaux ligno-cellulosiques très différents (ordures ménagères, résidus de culture, copeaux de bois) pour des productions très différentes (alimentation pour le bétail, fabrication de panneaux de particules, production de furfural, d'éthanol) (10).

Ainsi, pour la production d'éthanol à partir de résidus de culture (rafles de maïs, bagasse), il faut obtenir une cellulose facilement hydrolysable par un traitement acide en vue de l'étape finale de fermentation. Si c'est la production de panneaux de particules qui est recherchée, on traitera les copeaux de bois modérément, pour ramollir suffisamment la lignine sans affecter ses propriétés liantes, pour que les opérations ultérieures de pressage soient efficaces (...). Pour la production de furfural, obtenue par déshydratation des pentosanes, il

semble que les traitements d'autohydrolyse par la vapeur d'eau avec une extraction en continu des produits solubles à l'eau donnent les

Tableau 1 : EXEMPLES DE PROCEDES DE DESTRUCTION DE LA BIOMASSE PAR L'EAU OU LA VAPEUR D'EAU SOUS PRESSION

PROCEDES	PRINCIPE DU TRAITEMENT			UTILISATIONS
	eau utilisée: s/ la forme :	matériau:	méthode	
MASONNITE-1924 Réf. 17	vapeur d'eau	copeaux de bois	Montée (qq minutes) en pression progressive jusqu'à 30 bars, puis rapide à 70-80 bars Décompression rapide	Fabrication de panneau de particules agglomérées
ASPLUND (1930) Réf. 18	vapeur d'eau	copeaux de bois	Copeaux prétraités par de la vapeur de 6 à 10 bars (165-185°C) pas de décompression rapide mais une défibrillation du matériau à ces températures	Production de cartons et panneaux agglomérés
IOTECH Réf. 15	vapeur d'eau	copeaux de bois	Montée en pression (50 bars) se fait sans palier - décompression rapide	Production d'éthanol et de résines phéno- liques
STAKE Réf. 19	vapeur d'eau	copeaux de bois	Traitement à la vapeur 15 à 25 bars - décom- pression rapide, fonctionne en continu	Alimentation pour le bétail
Autohydrolyse Réf. 20	eau liquide	copeaux de bois	Traitement par l'eau à 180-200°C pendant 1 à 120 minutes - pas de décompression rapide	Prétraitement du matériau ligno-cellulo- sique dans le procédé Kraft
Réf. 27	vapeur d'eau	copeaux de bois	" "	Production de furfural
Organosolve Réf. 21	eau+solvant	copeaux de bois	Extraction des maté- riau par mélange eau- solvant à des pressions élevées, de 50 à 200 bars soit des tempéra- tures de 180 à 300°C	Production de pâtes à papier

meilleurs résultats. Pour rivaliser avec les procédés papetiers, il faudra rechercher la qualité du résidu cellulosique la meilleure possible, c'est à dire avec un degré de polymérisation élevé d'une part, et d'autre part un taux de lignine résiduelle le plus faible possible pour faciliter et diminuer le coût financier des procédés de blanchiment.

Récemment, quelques études comparatives pour la production finale d'éthanol ont été faites par Schultz et collaborateurs. Ils comparent les potentialités de divers types de biomasse traitées par autohydrolyse rapide (22), mais aussi l'efficacité de différents traitements (autohydrolyse, autohydrolyse rapide, oxydation humide, autohydrolyse rapide couplée à une extraction en continu de la vapeur d'eau condensée) pour traiter le même matériau : des copeaux de bois de feuillus (23).

La biomasse disponible et les buts recherchés dépendent de l'environnement industriel et économique du pays. Les scientifiques doivent trouver le meilleur procédé pour réaliser le passage suivant.

biomasse $\xrightarrow{\text{procédé de conversion}}$ productions recherchées

Ensuite, l'avenir du projet dépend des paramètres suivants :

- coût de la biomasse : production, collectage ;
- coût du procédé : amortissement du matériel, fonctionnement, recherche et développement, coût énergétique ;
- prix de vente des produits finaux souvent fluctuants.

L'intérêt du procédé de conversion est démontré lorsque l'exploitation commerciale est viable. Les traitements des copeaux de bois par les procédés Stake pour la production d'aliments pour le bétail et Asplund pour la fabrication de panneaux de particules agglomérées sont des exemples de procédés exploités commercialement.

En plus de raisons que nous venons d'exposer, la protection des procédés par des brevets fait qu'il s'est développé une très grande variété dans les pilotes construits dans le monde. Cela conduit à des procédés parfois très éloignés du vieux canon Masonnite. Ces différences peuvent être de nature technique comme pour le procédé Stake qui permet

le traitement en continu du matériau ou le procédé RASH (rapid steam hydrolysis/continuous extraction) (23) qui permet d'évacuer en continu la vapeur condensée durant le traitement d'autohydrolyse rapide. Dans certains procédés l'autohydrolyse rapide se fait en présence de soude ou d'ammoniac, c'est par exemple le procédé développé par Mamers et collaborateurs (24) pour traiter des pailles et des plantes annuelles. De tels traitements sont parfois effectués en présence de catalyseurs acides (25).

I.12 Etat des connaissances sur les procédés de traitement de la biomasse par autohydrolyse rapide

B.R. Allen souligne dans un rapport (14) sur les procédés non conventionnels de traitement de la biomasse qu'il existe peu de données disponibles concernant la caractérisation structurale des constituants pariétaux après l'autohydrolyse rapide des matériaux ligno-cellulosiques.

Jusqu'à ces dernières années les articles relatifs à ce sujet sont très descriptifs et se bornent à donner les rendements en lignines hémicelluloses et cellulose extraites. C'est ainsi que Marchessault (26) montre que l'on extrait à l'eau du bois de peuplier traité 30 % de matériel qui sont principalement des sucres. Il peut extraire ensuite à l'éthanol une fraction de lignine fortement dépolymérisée qui représente 90 % de la lignine totale. Les articles (22-27) font plutôt état du comportement des matériaux traités par autohydrolyse rapide vis-à-vis de certains traitements ultérieurs tels l'hydrolyse acide ou enzymatique, dans le but final d'une production industrielle d'éthanol.

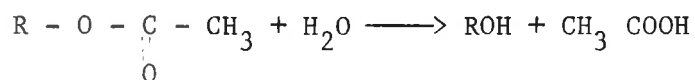
Cette tendance s'est néanmoins atténuée ces dernières années par le développement d'études concernant la caractérisation structurale de ces matériaux. Les résultats concernant la caractérisation des sucres solubles, des hémicelluloses et cellulose du bois de peuplier traité par le pilote IOTech ou le pilote C.T.P. sont consignés dans les thèses de Nava Saucedo (28) et David Barnett (29) respectivement. Marchessault et collaborateurs (30) ont été les premiers à aborder l'étude structurale des lignines des bois de peuplier traités par cette technologie.

Une étude beaucoup plus complète a été réalisée par H. Chum (31) qui a étudié l'influence des conditions de traitement sur les caractéristiques structurales des lignines extraites ainsi que leur comportement en électrolyse. J. Hemmingson a analysé l'effet du traitement sur les lignines de pin (32) et d'eucalyptus (33).

Avant de résumer les principaux résultats de ces travaux, il faut mentionner ceux beaucoup plus complets concernant l'influence sur les constituants pariétaux des traitements plus conventionnels d'autohydrolyse obtenus par Klemola (34 à 39) en traitant les matériaux par de la vapeur d'eau à une température de 180-200° et par Wayman (40-43) en portant dans un autoclave du bois et de l'eau à des températures équivalentes. Ces deux procédés sont caractérisés par des durées de traitement beaucoup plus longues (1 à 120 minutes) que dans l'autohydrolyse rapide (10 à 120 secondes). Le retour à la pression atmosphérique contrairement aux procédés d'autohydrolyse rapide se fait progressivement et ne s'accompagne pas d'une destructuration mécanique des matériaux traités. Le point commun entre ces différents procédés est la combinaison d'une température élevée et la présence d'eau favorable aux réactions d'hydrolyse.

I.13 Sensibilité des constituants pariétaux aux conditions hydrolytiques

Des constituants du bois, les hemicelluloses sont de loin les plus sensibles aux conditions hydrolytiques. L'hydrolyse est catalysée par les acides libérés par l'hydrolyse des groupements acétates des hémicelluloses (44).



De la même manière, du méthanol serait formé à partir des groupes méthoxyles des hemicelluloses (45). Les xylanes sont dégradées en xylose (46-47) qui peut à son tour se transformer en un produit très réactif le furfural. Celui-ci peut alors se polymériser (peu probable dans les conditions d'autohydrolyse) ou plus généralement se condenser sur les constituants pariétaux et leurs produits de dégradation. Les produits de dégradation de la lignine réagissent facilement avec le furfural et

donnent des produits de condensation. Brauns (48) préconise de traiter le bois par une solution d'acide dilué pour éliminer les hemicelluloses et leurs produits de dégradation avant de procéder au dosage de la lignine. Dans les traitements du bois à la vapeur pour la production du furfural, il apparaît avantageux d'extraire en continu les produits formés (39) : on accroît ainsi le rendement en furfural et on améliore la délignification ultérieure au sulfate du résidu ligno-cellulosique. De manière analogue Schultz et collaborateurs (23-49) montrent que si la vapeur qui se condense dans l'autoclave d'un pilote d'autohydrolyse rapide est évacuée en continu pendant le traitement et avant l'extraction du matériau (procédé RASH) on récupère des fractions riches en hémicelluloses peu dégradées et on obtient un rendement en lignine nettement supérieur à celui de l'autohydrolyse rapide conventionnelle.

Ces différents exemples illustrent bien l'importance du rôle joué par les produits de dégradation des hémicelluloses dans des réactions de condensation.

La cellulose (20) n'est dégradée qu'à partir de conditions beaucoup plus sévères ; on estime qu'elle n'est pas affectée aux températures inférieures à 200°. Dans tous les cas la vitesse d'hydrolyse de la cellulose est 1500 fois plus lente que celle des hemicelluloses. Une diminution du pH entraîne une augmentation de cette vitesse. Les hexoses libérés peuvent être dégradés en 5 - hydroxyméthyl-5 furfural-2.

La vitesse d'hydrolyse de la lignine peut être placée entre celle des hemicelluloses et de la cellulose. Cette dissolution serait également catalysée par les acides comme le montre la préparation des lignines au dioxane.

Les études de Klemola (20) sur la lignine extraite du bois de bouleau traité à la vapeur montre que l'extractibilité de la lignine est due à une rupture des liaisons alkyl-aryl éther. Il montre (39) que le taux d'hydroxyles phénoliques croît alors que le taux d'hydroxyles aliphatiques décroît. Parmi les monomères isolés (36) de ces lignines, il retrouve les cétones de Hibbert les plus stables. Cela indique des mécanismes réactionnels voisins de ceux intervenant dans l'acidolyse des lignines. D'après les résultats quantitatifs obtenus en RMN protons (37) et la dominance des monomères de type syringyle, il déduit que les

unités gallicyles participent ultérieurement à des réactions de condensation.

Ce résultat est étayé par l'oxydation au nitrobenzène des lignines, en effet il montre que les lignines extraites des bois traités donnent des rendements en produits d'oxydation d'autant plus faibles que les traitements sont sévères (l'oxydation au nitrobenzène permet de caractériser les fragments de lignines non condensées).

Par une étude structurale des lignines extraites des bois de peuplier traité par autohydrolyse, Wayman et collaborateurs confirment ces points (41-42). Ils étudient également ces lignines en chromatographie sur gel perméable (40) et mettent en évidence aussi la succession des réactions de dépolymérisation et recondensation qui conduisent à des fractions de lignines distinctes dans un même échantillon de bois traité. En étudiant le comportement de la lignine isolée puis traitée dans les mêmes conditions que le bois, ils montrent que les condensations "in situ" se feraient également sur les sucres et leurs produits de dégradation (50). Ils montrent dans cette même étude que la démethylation ou la démethoxylation sont des réactions mineures. La mise en jeu de réactions de condensation est également soutenue par le fait que la présence de l'acide parahydroxybenzoïque dans certains bois et l'addition de naphthol améliore la faisabilité de l'autohydrolyse : les condensations se faisant préférentiellement sur ces molécules, on évite ainsi la formation de structures trop polymérisées pour être facilement solubles.

Finalement, Wayman et Chua à partir du schéma structural de lignine proposé par Nimz indiquent les liaisons sensibles à l'hydrolyse et notent également les différents centres nucléophiles et électrophiles qui apparaissent sur les structures formées (42). Leurs combinaisons permettent de prévoir les différentes condensations possible.

Evidemment ces structures peuvent réagir sur les sucres et leurs produits de dégradation.

Sudo et collaborateurs (52) dans leur étude confirment ces résultats et mettent également en évidence par RMN du carbone la formation de carbones aliphatiques saturés à haut champ au cours du traitement. Dans

toutes les études mentionnées ci-dessus il y a peu de données concernant l'évolution des chaînes aliphatiques et ce résultat constitue une information intéressante.

I.14 Modifications structurales décrites dans le cas de l'autohydrolyse rapide

D. Barnet (28) montre qu'au cours du traitement par autohydrolyse rapide du bois, les hémicelluloses sont complètement hydrolysées en fragments solubles à l'eau froide ; celles-ci ont été partiellement désacétylées. Les acétates non hydrolysés protègent les fragments glucidiques qui les portent d'une dégradation hydrolytique ultérieure. Il montre également que la cellulose est dépolymérisée dès le début du traitement d'autohydrolyse rapide et en fait lorsqu'elle est débarrassée des hémicelluloses et de la lignine, elle a un degré de polymérisation assez faible.

Nava Saucedo (29) a identifié des saccharides qui indiquent que les unités glucoses libérées subissent ensuite des réactions de déshydratation.

Marchessault et collaborateurs (30) avaient déjà souligné certains des résultats précédents et ils montrèrent que la lignine est très dégradée et est constituée en moyenne de quatre unités phénylpropanes. Cette dépolymérisation est due à une rupture des liaisons alkyl-aryl éther -O-4. Chum et collaborateurs (34) montrent que le nombre d'hydroxyles phénoliques croît considérablement ce qui est en accord avec la rupture des liaisons éthers tandis que le taux d'hydroxyles aliphatiques décroît. Plusieurs travaux, notamment en RMN du carbone treize, indiquent la formation de carbones aliphatiques saturés (30,32,33).

Toutes ces études ne mentionnent pas la formation de lignines insolubles ou de masse moléculaire élevée dû à des mécanismes de condensation similaires à ceux décrits par Wayman. Néanmoins, D. Barnet (28) montre que l'on ne retrouve pas entièrement la masse des hémicelluloses (solubles à l'eau) lorsque les conditions de traitement sont sévères alors que la quantité de lignines extraites dépasse la teneur normale,

cela indiquerait une condensation de produits issus des la dégradation des hémicelluloses sur les lignines.

H. Chum et collaborateurs isolent à partir de ces lignines une fraction soluble dans l'éther éthylique réagissant sur le formaldéhyde, et qui pourrait servir comme copolymère dans les résines phénoliques (34).

I.2 CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DES LIGNINES

I.21 Définition et généralités sur les lignines

Les lignines sont des polymères phénoliques tridimensionnels amorphes, caractéristiques des parois végétales des plantes supérieures, résultant de la copolymérisation radicalaire (fig. 4) de différents alcools phénylpropénoïques. C'est la définition qui se dégage des différents articles de revues et ouvrages traitant des lignines (53-54-55). Les proportions relatives de ces alcools phénylpropénoïques varient selon les lignines et représentent l'une des causes de l'hétérogénéité structurale des lignines.

Cette variabilité a pu être néanmoins corrélée (56-57) aux origines taxonomiques des lignines, à leur situation dans la plante (les tissus situés de part et d'autre des ramifications ont des lignines très différentes), à la nature (parenchyme, vaisseaux), à l'âge des cellules, et même à leur localisation au sein de la paroi végétale.

Les voies de biosynthèse (58) des lignines, unanimement reconnues, font état de régulations enzymatiques jusqu'à la formation des radicaux phénoxyles, eux-mêmes sous la dépendance de peroxydases. En revanche, les couplages entre les radicaux dépendraient uniquement de la réactivité des radicaux générés. La fréquence et la répartition des liaisons intermonomériques sont alors le résultat des divers couplages entre les radicaux. Des concentrations faibles en radicaux favoriseraient le couplage progressif des monomères aux oligomères déjà formés par rapport à la seule dimérisation. Ce mode de formation radicalaire du polymère

justifie l'absence d'activité optique de la lignine, confirmée par celle de ses produits de dégradation, malgré leurs très nombreux centres de chiralité.

Les lignines sont donc fondamentalement différentes des autres polymères naturels (59) (cellulose, protéine, ADN...). Ces derniers ont des structures qui dépendent des contrôles enzymatiques complexes et peuvent être caractérisés par une masse moléculaire et une distribution précise de leurs unités constitutives. En revanche, les lignines représentent plutôt des mélanges de polymères caractérisées au mieux par une distribution en masse.

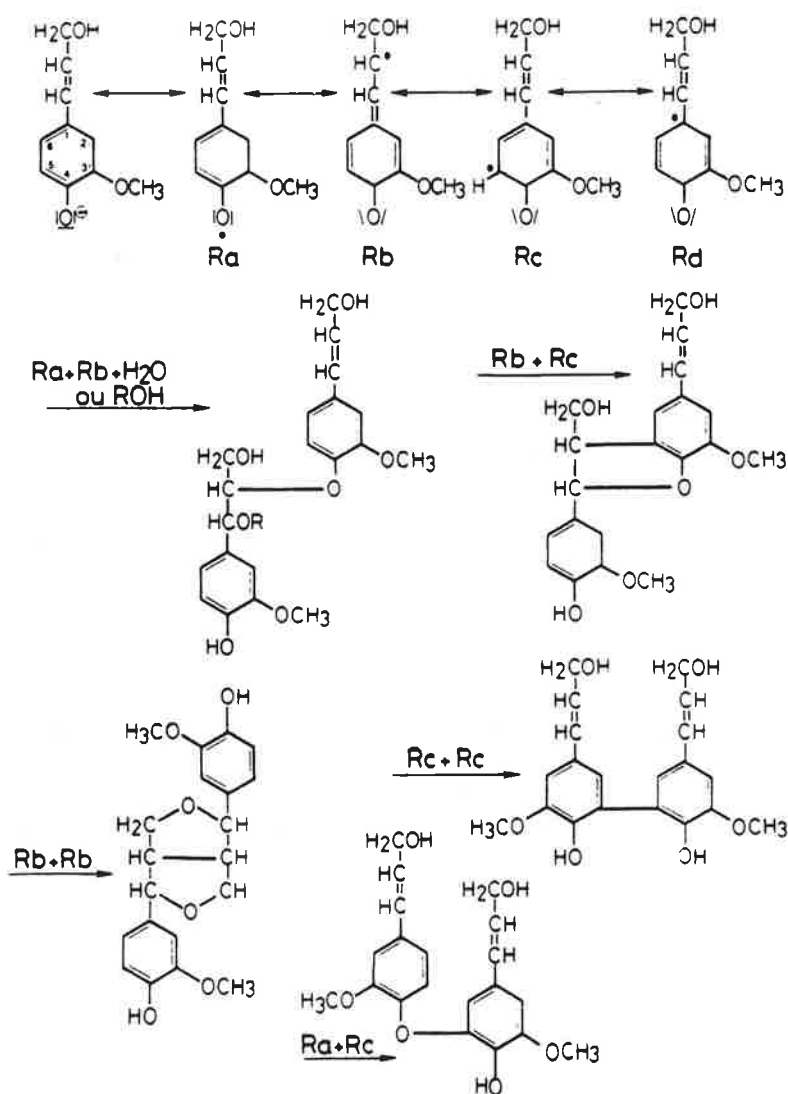


Figure 4 : Formation des principales structures rencontrées dans les lignines par couplage des formes mésomères du radical phénoxy.

I.22 Méthodes chimiques d'analyse des lignines

I.221 Structure des lignines : un puzzle commencé il y a un siècle et demi (60)

C'est en 1836 que A. Payen met en évidence l'hétérogénéité chimique du bois. En traitant du bois par l'acide nitrique il en solubilise une partie qu'il nomme "matière incrustante" et récupère un résidu fibreux qu'il nomme cellulose.

Schulz donne en 1865 le nom actuel de "lignine" à la fraction soluble. L'hypothèse d'une structure aromatique de la lignine est avancée par Erdtman en 1968. Les développements des processus papetiers, notamment ceux au sulfite, ont insufflé un intérêt grandissant pour la chimie puis la biochimie des lignines. Déjà en 1907, Klason eut l'intuition de la filiation biochimique entre l'alcool coniferylique et les lignines.

Ensuite les résultats concernant la caractérisation de ces molécules se sont succédés à une cadence soutenue. Les techniques d'isolement des lignines ont toujours été sujet à de vives polémiques quant aux modifications qu'elles entraînent pour le matériau extrait. Depuis la découverte de Payen, différentes méthodes (Klason, Brauns, Björkman) ont été proposées pour isoler et purifier les lignines, et cela afin d'obtenir la lignine la plus proche de celle "in situ".

Le protocole proposé par Björkman (61-62-63) permet d'obtenir un échantillon bien défini, et aux caractéristiques facilement reproductibles ; malgré certains désavantages comme son faible rendement (30 % de la ligne de Klason) et une sélection topologique (64) de la lignine induite par le broyage, on peut le considérer comme un procédé standard dans la chimie du bois. Les comparaisons de lignines de différentes origines se font généralement sur la base de lignines préparées selon le protocole de Björkman.

I.222 Etude des produits de dégradation chimique des lignines

La structure aromatique, puis la structure aryl propane ont été démontrées par l'analyse des monomères obtenus par dégradation chimique des lignines. A cette fin, de nombreuses méthodes ont été proposées ; la figure 5 résume les principales voies utilisées.

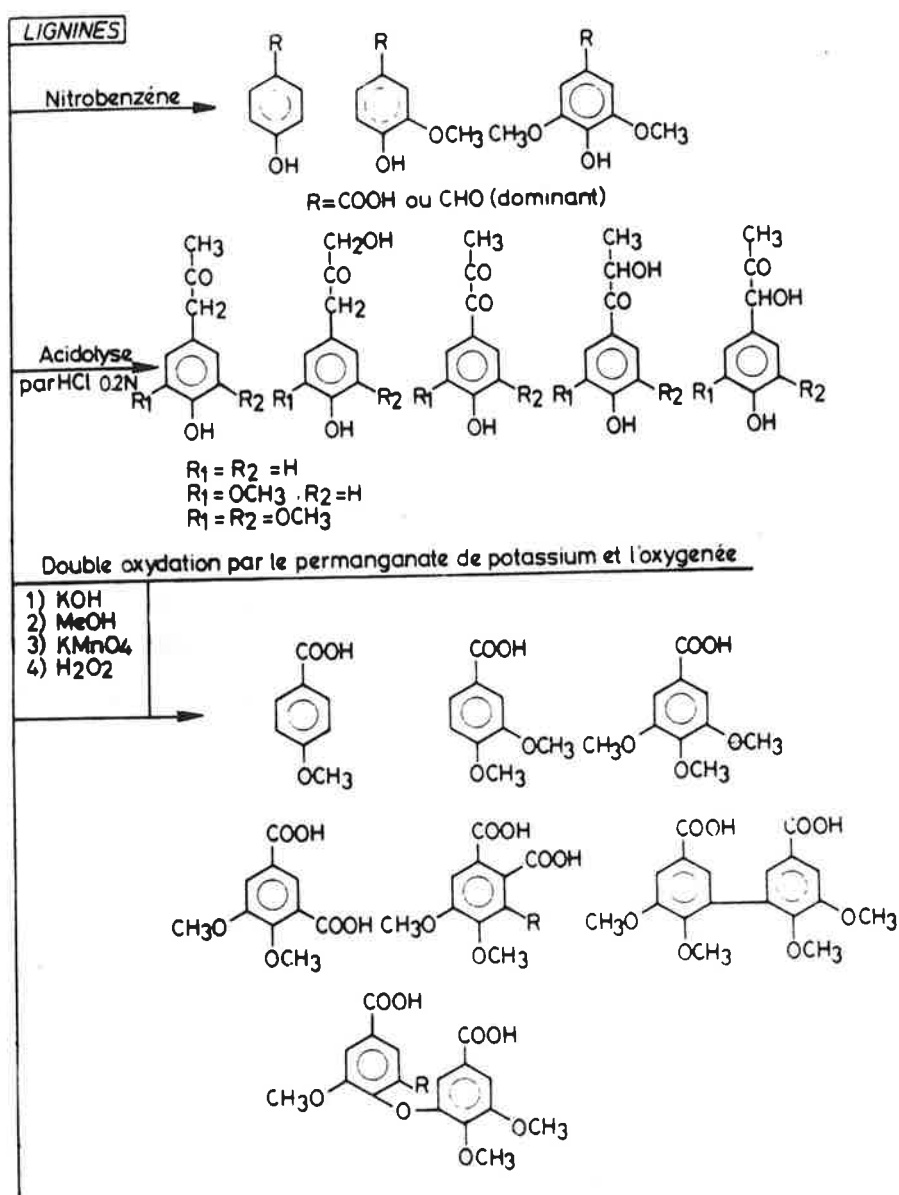


Figure 5 : Exemple de méthodes chimiques pour la caractérisation structurale des lignines.

I.22 Méthodes chimiques d'analyse des lignines

I.221 Structure des lignines : un puzzle commencé il y a un siècle et demi (60)

C'est en 1836 que A. Payen met en évidence l'hétérogénéité chimique du bois. En traitant du bois par l'acide nitrique il en solubilise une partie qu'il nomme "matière incrustante" et récupère un résidu fibreux qu'il nomme cellulose.

Schulz donne en 1865 le nom actuel de "lignine" à la fraction soluble. L'hypothèse d'une structure aromatique de la lignine est avancée par Erdtman en 1968. Les développements des processus papetiers, notamment ceux au sulfite, ont insufflé un intérêt grandissant pour la chimie puis la biochimie des lignines. Déjà en 1907, Klason eut l'intuition de la filiation biochimique entre l'alcool coniferylque et les lignines.

Ensuite les résultats concernant la caractérisation de ces molécules se sont succédés à une cadence soutenue. Les techniques d'isolement des lignines ont toujours été sujet à de vives polémiques quant aux modifications qu'elles entraînent pour le matériau extrait. Depuis la découverte de Payen, différentes méthodes (Klason, Brauns, Björkman) ont été proposées pour isoler et purifier les lignines, et cela afin d'obtenir la lignine la plus proche de celle "in situ".

Le protocole proposé par Björkman (61-62-63) permet d'obtenir un échantillon bien défini, et aux caractéristiques facilement reproductibles ; malgré certains désavantages comme son faible rendement (30 % de la ligne de Klason) et une sélection topologique (64) de la lignine induite par le broyage, on peut le considérer comme un procédé standard dans la chimie du bois. Les comparaisons de lignines de différentes origines se font généralement sur la base de lignines préparées selon le protocole de Björkman.

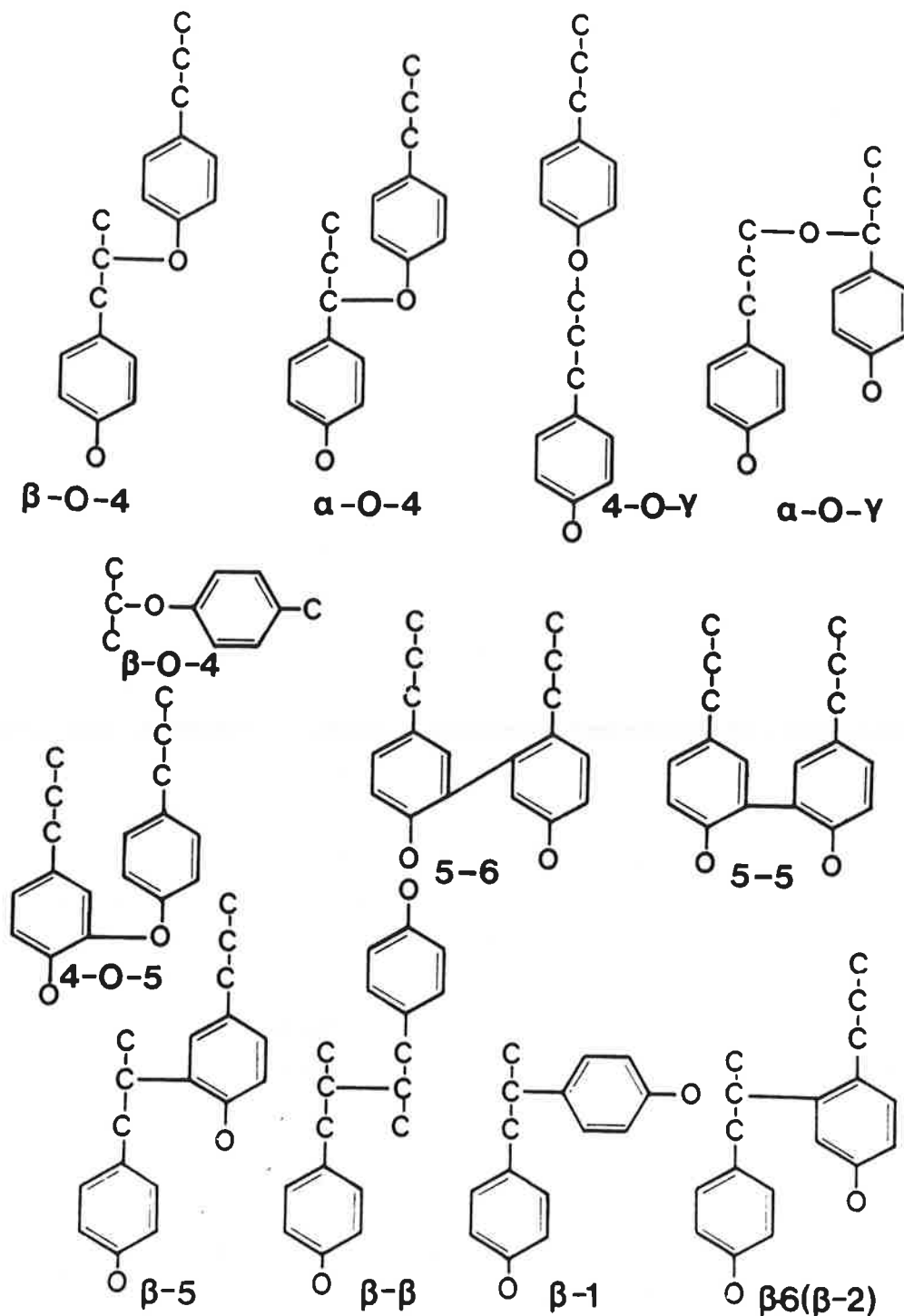


Figure 6 : Principales liaisons intermonomériques rencontrées dans les lignines.

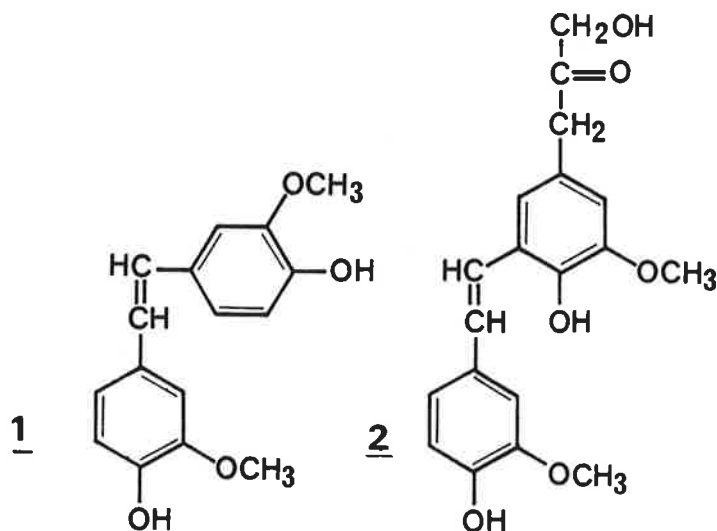
Les mécanismes et les apports de ces techniques de dégradation chimique sont par ailleurs discutés par Adler dans un excellent article de revue (60).

Cette pléthore de techniques s'explique par des réactivités très différenciées de ce matériau qui est constitué d'une très grande variété

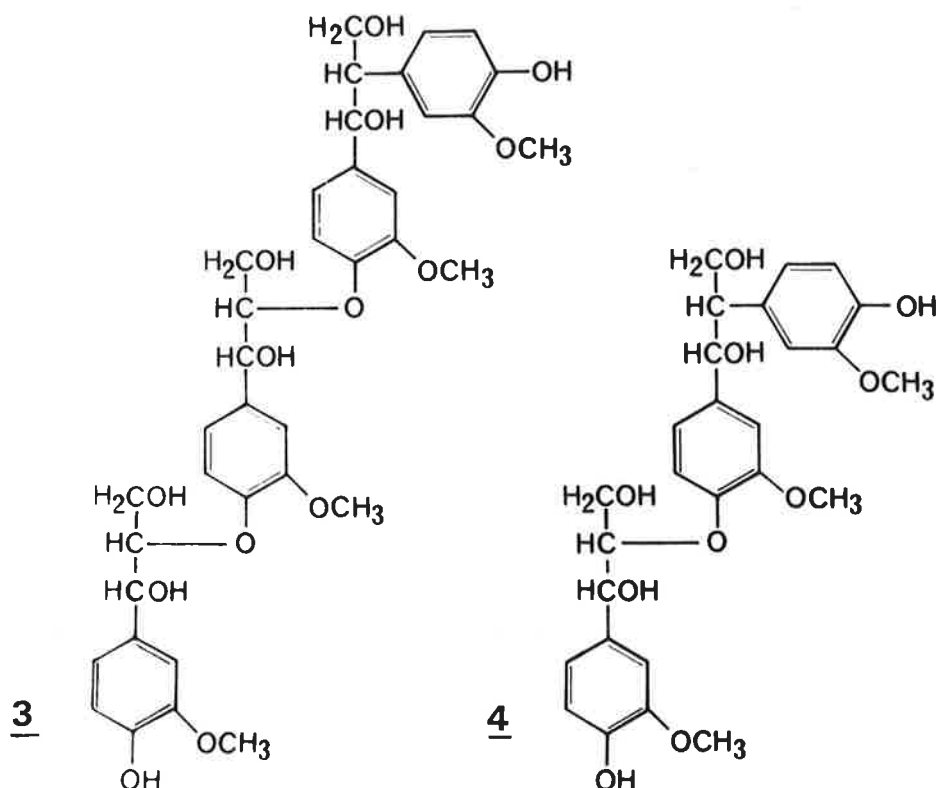
de structures chimiques : les méthodes proposées ne permettent pas à priori de caractériser les mêmes enchainements de monomères.

La caractérisation totale d'un échantillon de lignine a nécessité la mise au point de protocole permettant de fragmenter suffisamment les macromolécules en unités facilement analysables sans détériorer (ouverture du cycle aromatique) la structure aromatique. On peut citer Glasser et collaborateurs (65) qui, par la combinaison de méthylation et d'oxydation au permanganate de potassium, puis à l'eau oxygénée avant et après un traitement alcalin, caractérisent totalement des échantillons de lignines (66, 67). La thioacidolyse développée par Nimz permettrait également de caractériser totalement les échantillons de lignines (68, 69).

Les produits de dégradation sont parfois considérés comme la preuve de l'existence de certaines liaisons, ainsi l'ensemble des cétones d'Hibbert (70) obtenues par l'acidolyse de lignine dans le dioxane démontre l'existence des liaisons alkyl-aryl éther β -O-4 (Figure 5). De même, K. Lundquist isole à partir d'une fraction de dimères des stilbènes du type 1 et 2 qu'il démontre provenir des structures phénylcoumarane (71) et β -1 respectivement (72).



Une autre approche a été celle de Nimz (73) qui a isolé, en percolant du bois par de l'eau à 100° acidifiée, 8 dimères ayant une structure alkyl-aryl éther β -O-4, les deux formes diastéréoisomères d'un trimère 3 et un tétramère 4.



Ces méthodes de dégradation permettent en outre la mise en évidence de structures minoritaires (diphényle, alkyl-aryl éther 5-0-4, alkyl-aryl éther...), on peut citer pour exemple l'hydrogénolyse catalytique développée par Sakakibara et collaborateurs (74,75,76). Pour décortiquer la structure des lignines, la mise au point des méthodes analytiques permettant la séparation puis l'identification des dimères, trimères et oligomères a donc été une étape fondamentale.

Finalement, en regroupant les résultats apportés par toutes ces méthodes, la figure 6 donne les différents types de liaisons intermonomériques rencontrées dans un échantillon de lignines.

Si les produits de dégradation sont obtenus de manière quantitative, on peut alors, à partir des études décrites ci-dessus, estimer les proportions des différents monomères constitutifs et les différents types de structures de l'échantillon étudié. Ainsi l'oxydation au nitrobenzène est couramment utilisée pour estimer le pourcentage de monomères du type syringyle, gaïacyle ou coumaryle constitutifs des fractions non condensées de la lignine. C. Lapierre et B. Monties (77) ont développé l'aspect quantitatif de l'acidolyse mise au point par K. Lundquist, et dosent ainsi les monomères constitutifs mais aussi le nombre des structures alkyl-aryl éther β -O-4 des parties non condensées de la lignine. W. Glasser et collaborateurs (65) affirment caractériser totalement un échantillon. En effet, à la suite de la dégradation chimique des lignines ils identifient et dosent les différents produits de dégradation formés, ce qui leur permet d'établir le rapport suivant :

Produits de dégradation des unités non condensées

Produits de dégradation des unités condensées

Finalement, le développement quantitatif de ces méthodes de dégradation chimique permet d'établir les proportions relatives des différents monomères constitutifs et d'estimer la fréquence des différentes structures dans un échantillon de lignine. Les résultats sont généralement publiés sous la forme de tableaux donnant les fréquences des monomères et des structures déterminées (60-73-78). Quelques modèles moléculaires ont été proposés à partir de ces résultats. Bien que didactiques, ces représentations admettent à priori des enchaînements pour les différentes structures quantifiées et doivent être considérées avec prudence.

I.223 Synthèse de polymères modèles (53-55-60)

Les travaux sur la dégradation chimique des lignines se sont donc développés parallèlement aux synthèses "in vitro" de polymères, à partir de composés para-hydroxycinnamiques. En 1908, Cousin et Herissey obtenaient par déshydrogénation de l'isoeugenol un dimère (le déshydroisoeugenol) dont la structure phénylcoumarane définitive fut démontrée par Erdtman et confirmée par Freudenberg. Freudenberg pour interpréter les

résultats des analyses élémentaires de lignines proposait une structure régulière faite d'enchainements phénylcoumaranes. De là, Erdtman eut l'idée que les lignines pouvaient être synthétisées par déshydrogénation de composés similaires à l'alcool coniférylique. Freudenberg en 1936, par oxydation avec FeCl_3 de l'alcool coniférylique, obtenait un polymère dont les produits de dégradation étaient identiques à ceux obtenus à partir du déshydroisoeugenol et de la lignine. Cela confirmait l'hypothèse avancée par Erdtman. Par la suite, les polymères synthétisés à partir de l'alcool coniférylique par oxydation enzymatique montrèrent de très fortes similarités avec la lignine MWL de sapin. Freudenberg a réalisé un travail fondamental en séparant et analysant les dimères, trimères et oligomères jusqu'à l'heptamère qui se forment en cours de polymérisation (55). Les structures établies s'expliquent de façon tout à fait cohérente par les couplages possibles entre les formes mésomères du radical phenoxy formé. La figure 4 résume ainsi différentes structures formées.

En reprenant les analyses élémentaires de lignines d'origines diverses, Freudenberg (55) montre que l'on peut interpréter la formule élémentaire comme étant celle d'un polymère obtenu par polymérisation deshydrogénative de trois alcools phénylpropénoïques pris en différentes proportions : l'alcool coumarylique (hydroxy-1 benzène-propényl-4), l'alcool coniférylique (méthoxy-2 hydroxy-1 benzène-propényl-4) et l'alcool sinapylique (diméthoxy-2,6 hydroxy-1 benzène-propényl-4).

I.23 Méthodes physiques d'analyse des lignines

Pour caractériser les lignines, le chimiste de la lignine dispose également des techniques classiques de spectroscopies : absorption ultraviolette, infrarouge, et plus récemment résonance magnétique nucléaire.

Elles ont été l'objet de très nombreux progrès les rendant de plus en plus performantes, la RMN en est l'exemple le plus spectaculaire si l'on considère son évolution pendant ces quinze dernières années. Ces spectroscopies ne font pas intervenir les mêmes énergies et répondent à des phénoménologies distinctes ; elles fournissent ainsi des renseignements très différents, mais toutes permettent une caractérisation des échantillons sans nécessiter leur dégradation, comme l'exigent les méthodes chimiques d'analyse.

I.231 Spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet (79,80)

Si les différents monomères constitutifs des lignines ont des spectres d'absorption dans l'ultraviolet distincts, les courbes d'absorption de lignines différentes apparaissent souvent très semblables. C'est alors l'étude de détail des courbes d'absorption qui renseigne sur des différences structurales. Ainsi l'absorption maximale d'une lignine de feuillus constituée à la fois d'unités syringyles et gâïacyles se situe à 275 nm, tandis qu'elle se trouve déplacée à 280 nm dans les lignines de conifères qui ne contiennent que des unités gâïacyles : on relie ce déplacement au taux de méthoxyle par unité phénylpropane des lignines étudiées.

L'absorption dans l'ultraviolet est principalement due aux structures phénoliques des lignines, ainsi l'effet d'un traitement de chloration qui entraîne la perte de l'aromaticité peut être suivi en spectroscopie UV.

Des structures particulières d'une lignine peuvent être mises en évidence et même quantifiées par les courbes $\Delta\epsilon$ obtenues en effectuant les différences entre l'absorption d'une lignine normale et les absorptions de la même lignine ionisée, réduite ou hydrogénée. Ces courbes caractérisent les groupements chromophores affectés par ces traitements tels les hydroxyles phénoliques, les carbonyles... Des lignines différentes peuvent être ainsi comparées.

L'absorption dans l'ultraviolet des lignines et des composés phénoliques qui en sont hérités reste une propriété fondamentale pour leur détection dans les différents systèmes chromatographiques (CCM, CPG, CLHP). C'est également par cette propriété qu'une étude topochimique des composés phénoliques de la paroi végétale peut être réalisée à partir de micrographies en lumière ultraviolette de coupes fines de tissus ligneux (81-82). Des études densimétriques permettent alors d'en établir la répartition à l'intérieur de la paroi. Ces études fourniront la preuve définitive de l'existence "in situ" des lignines.

I.232 Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge

La spectroscopie IR est beaucoup plus sensible que la spectroscopie UV aux différences structurales d'une molécule ; en effet, les différentes liaisons absorbent à des fréquences distinctes qui sont sensibles à l'environnement chimique. Les différents monomères constitutifs de la lignine sont ainsi assez précisément identifiables par leur spectre d'absorption dans l'infrarouge (83). Les spectres IR des lignines résultent de la superposition de toutes ces absorptions, ce qui donne à priori des spectres très similaires. Néanmoins, une analyse précise permet de repérer certains signaux caractéristiques des monomères constitutifs. Ainsi on reconnaît dans une lignine de conifères (84) les bandes caractéristiques ($1610, 1510 \text{ cm}^{-1}$) des unités gâïacyles, auxquelles se superposent les bandes caractéristiques des unités syringyles dans les spectres de lignines de feuillus (85). Sarkanen (85) a démontré en analysant des lignines de différents types que les intensités relatives des bandes IR mentionnées pouvaient être corrélées linéairement aux taux de méthoxyle donc aux rapports syringyles sur gâïacyles des lignines étudiées. Cette exploitation quantitative des spectres IR a été poursuivie sur des lignines de synthèse et des lignines industrielles (31). L'attribution de bandes s'est faite de manière très empirique en comparant les spectres IR de très nombreux monomères à ceux des lignines étudiées. Hergert, dans un article de revue (86) discute et justifie les différentes attributions et propose ainsi une interprétation des principales bandes d'absorption. De cette mise au point il ressort que l'attribution précise des fonctions carbonyles, carboxyles et hydroxyles nécessite la dérivatisation des lignines et la comparaison des spectres IR des lignines ainsi modifiées. La deutération, la méthylation, l'acétylation, la réduction et la saponification sont autant de méthodes classiquement utilisées. D'une manière générale, l'interprétation des spectres infrarouges demeure un domaine de spécialistes qui exige beaucoup de prudence afin d'éviter des erreurs importantes du fait de la redondance des attributions pour un même signal.

Malgré ces restrictions, la spectroscopie infrarouge reste une technique avantageuse pour caractériser rapidement des échantillons. Nous l'avons utilisée de manière routinière pour caractériser les échantillons obtenus au cours de différentes étapes de séparation et de purification. En effet, les spectres des hydrates de carbones des

lignines et des contaminants lipophiles (dominés par les acides gras) sont suffisamment distincts pour identifier rapidement une fraction, un résidu insoluble, et estimer qualitativement leur pureté : par exemple, on repère très bien si une fraction est un mélange de lignine et d'hydrates de carbone (87).

D'autre part, un des aspects souvent négligé de la spectroscopie infrarouge est la possibilité d'obtenir des spectres IR du matériau ligno-cellulosique lui-même traité ou non. En effet, après quelques broyages, encapsulages et pastillages successifs dans le bromure de potassium, les spectres IR obtenus deviennent interprétables, et l'on reconnaît les bandes caractéristiques des produits isolés. Obst et collaborateurs ont étudié de cette manière l'hétérogénéité de la lignine suivant l'origine des parois dans les tissus ligneux (88). De la même manière, on peut suivre la délignification du matériau suivant les conditions du traitement appliqué.

I.233 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) a été sans aucun doute un apport essentiel en chimie pour l'analyse structurale des molécules. En spectroscopie RMN, on enregistre les absorptions de spins nucléaires ; celles-ci sont caractéristiques du noyau observé et varient plus ou moins selon l'environnement magnétique et chimique du noyau considéré. Ainsi dans une molécule, les différents types de carbones ($C=O$, CH_2 , $CH_3...$) ont à priori des absorptions distinctes. La mise au point de nouvelles expériences rendues possibles par un appareillage électronique et informatique de plus en plus performant permet aux physico-chimistes d'accéder à une foule de renseignements autres que ces seules absorptions nucléaires (89,90).

Le premier spectre de la lignine a été enregistré vers 1963 en RMN du proton par C.H. Ludwig (91). Les spectres de lignine en RMN proton ont été plutôt jugés d'une "simplicité décevante". En effet, les couplages entre les protons d'une part, qui multiplient le nombre des raies d'absorption, et la grande distribution de ces signaux sur une gamme de fréquence réduite d'autre part, fait que la résolution des spectres protons est très pauvre. Néanmoins, les absorptions des protons

aromatiques, ceux de la chaîne propane et ceux des groupes méthoxyles définissent des régions spectrales suffisamment nettes pour être intégrées et permettre ainsi la comparaison de lignines différentes (92).

Par la suite, les progrès techniques (RMN à haut champ, transformée de Fourier) ont permis d'accroître la sensibilité et la résolution de la RMN proton. En comparant les spectres de lignines et ceux de composés modèles (93), notamment dans la région due aux protons des chaînes aliphatiques, certaines structures ont pu être repérées. L'observation des protons méthyliques des lignines acétylées permet de différencier les hydroxyles aliphatiques et phénoliques (94).

K. Lundquist (94) montre que l'on sépare les protons aromatiques des unités gailacyles et des unités syringyles en utilisant le chloroforme comme solvant pour solubiliser les lignines acétylées. Il repère (95,96) également les protons des hydrates de carbone présents dans les lignines extraites selon le protocole de Björkman. La RMN permet de repérer les protons de structures aldéhydiques qui apparaissent aux fréquences élevées (97).

Jusqu'à la mise au point de la RMN par transformée de Fourier qui permet entre autre un grand nombre d'accumulations, la RMN en onde continue du ^{13}C n'était pas envisageable du fait de la faible abondance (1 %) de l'isotope ^{13}C et de sa faible sensibilité comparée à celle du proton. Cette faible abondance des ^{13}C permet en pratique une simplification des spectres : les couplages $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ sont très peu abondants (1/10000) ; seuls demeurent les couplages $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ qui sont supprimés en irradiant les protons sur toute leur plage de fréquence de résonance. Ainsi, chaque type de carbone peut être observé comme un signal unique. Si l'on ajoute à cela que la gamme des fréquences d'absorption des carbones treize est environ 20 fois celle du proton, on comprend aisément le gain de résolution de la RMN ^{13}C .

L'étude des lignines en spectrométrie RMN, et plus particulièrement en RMN du ^{13}C présente trois aspects qui ont été développés chronologiquement : l'analyse qualitative, l'analyse quantitative et l'analyse par les séquences multiimpulsionnelles.

1) Analyse qualitative

La démarche est la même quel que soit le noyau observé : on interprète les signaux du spectre RMN du carbone treize découplé des protons en comparant leur fréquence à celles des signaux de composés modèles de lignines qui représentent les liaisons intermonomériques et les fonctions identifiées dans les études chimiques des lignes décrites précédemment. Il faut citer les travaux pionniers de H.H. Nimz et collaborateurs (98,99,100) qui de cette manière ont attribué la plupart des signaux des spectres de lignines MWL de feuillus, conifères et de lignines de synthèse (DHP). L'existence des principaux types de liaisons peut être ainsi confirmée et les différences entre les lignines sont parfaitement mises en évidence. R. Morck et coll. (101,102) d'une part et C.L. Chen et coll. (103,104) d'autre part, procèdent de la même manière pour interpréter respectivement des spectres en RMN ^{13}C de lignines industrielles du type Kraft et des lignines biodégradées. La fiabilité et la précision des interprétations repose sur la synthèse de composés modèles de plus en plus diversifiés : synthèse de différents diastéréoisomères des structures alkyl-aryl éther β -O-4 par exemple. Des essais d'étude sont faits actuellement concernant l'influence des substituants sur les déplacements chimiques des carbones appartenant à une molécule de base rencontrée dans la lignine (gaiacol par exemple) (105).

L'avenir est sans aucun doute au dépouillement informatisé des spectres qui nécessitent la création de banques de données des composés modèles de lignines. C'est un projet en cours d'étude par C.L. Chen à Raleigh (106).

2) Analyse quantitative

Dans un article de revue (107), J.N. Shoolery résume les conditions nécessaires à l'obtention de spectre quantitatif en RMN du ^{13}C et donne différents exemples d'application. A cette fin, on utilise la séquence d'impulsion dite de découplage en créneaux inverses "CI" (inverse gate decoupled spectra) dans laquelle les protons sont découplés uniquement pendant le temps d'acquisition du signal. Ainsi l'effet Overhauser nucléaire (NOE) qui accroît l'intensité des signaux de carbones protonés n'est pas effectif pendant cette période trop courte. Entre chaque

impulsion on attend un temps suffisamment long pour laisser l'aimantation totale revenir à son état d'équilibre initial et l'effet NOE disparaître. S. Gillet (108) analyse de manière quantitative par RMN des coupes pétrolières. Dans son étude il détaille l'influence des différents paramètres instrumentaux d'acquisition et de traitement du signal sur l'intensité des signaux obtenus en RMN du ^{13}C .

D. Robert a appliqué ces résultats aux lignines et a vérifié la validité de la méthode par l'adjonction à l'échantillon de lignine d'une référence interne (tétraméthyléthiourée) en quantité connue. Elle démontre (109) que les conditions utilisées permettent d'enregistrer des spectres quantitatifs : en effet, elle trouve un accord à 5 % près entre la détermination du taux de carbone calculé à partir des signaux des carbones de la référence et le taux de carbone déterminé à partir de l'analyse élémentaire de la lignine étudiée.

La détermination quantitative de certains motifs structuraux ou groupes fonctionnels est tout à fait envisageable.

D'une façon générale, seuls sont considérés pour l'analyse quantitative les signaux ou groupe de signaux ayant un bon rapport signal sur bruit et pouvant être attribués sans ambiguïté aux structures que l'on veut doser. L'analyse porte généralement sur les signaux suivants :

- signaux des carbones aromatiques entre 150 et 100 ppm,
- signaux des carbones aliphatiques liés à des oxygènes entre 100 et 56 ppm,
- signaux des carbones méthoxyliques à 56 ppm.

D. Robert (109) dose également le taux d'unités syringyles incluses dans des structures alkyl-aryl éther β -O-4 en intégrant le signal entre 156 et 150 ppm. D. Robert et G. Brunow (110) ont montré que l'on pouvait doser les différents types d'hydroxyles présents dans un échantillon de lignine acétylée en intégrant les aires des signaux, suffisamment séparés, des acétoxyles correspondants.

On a accès ainsi à des paramètres structuraux tout à fait fondamentaux pour la caractérisation des lignines naturelles (MWL) ou industrielles (111,112).

3) Analyse par les expériences multiimpulsionnelles

Cet aspect constitue à lui seul une partie de cette thèse. En effet, la moindre étude de la littérature récente en RMN du carbone et du proton révèle la richesse des informations structurales qui sont apportées par ces nouvelles séquences de RMN.

Dans ce but, nous avons cherché à maîtriser ces nouvelles techniques et à les adapter au cas particulier de polymères tels que les lignines.

Deux expériences se sont révélées particulièrement fructueuses :

- L'expérience DEPT (114-115) :

Elle permet d'enregistrer des spectres monodimensionnels sélectifs des carbones CH_1 , CH_2 et CH_3 . Le spectre des carbones quaternaires seuls peut être enregistré avec une séquence spécifique (115). En précisant le type des carbones, on confirme ou infirme ainsi les attributions fondées uniquement sur l'étude de composés modèles. De plus, combinée à l'expérience CI, nous avons montré que l'on pouvait établir le rapport : carbones aromatiques tertiaires sur le total des carbones aromatiques, paramètre important pour l'analyse structurale de ce type de polymère.

- L'expérience d'INADEQUATE bidimensionnelle (115 - 177) :

Elle permet, en nous livrant une carte à deux dimensions, de corrélérer les signaux des carbones qui sont directement voisins. L'enchaînement du squelette carboné peut être ainsi reconstitué. Cette technique extrêmement efficace ne s'applique hélas, compte tenu des problèmes de sensibilité, qu'aux échantillons de lignines enrichies en carbone treize.

Le premier spectre bidimensionnel de lignine en RMN du ^{13}C a été publié par H.H. Nimz (118), c'est un spectre de corrélation (δ/J) des déplacements chimiques des carbones treize avec leur constante de couplage proton-carbone. On repère ainsi le type de carbone d'un signal

(par la multiplicité des signaux observés dans la deuxième dimension), et on peut déterminer la valeur de la constante de couplage.

Ces trois volets dans l'analyse par RMN des lignines sont tout à fait complémentaires et permettent de caractériser de plus en plus précisément la structure ou plus exactement les structures des lignines.

DEUXIEME PARTIE

PRESENTATION DE LA RMN ^{13}C MULTI-IMPULSIONNELLE A UNE DIMENSION
APPLICATION DES EXPERIENCES RMN ^{13}C MONO ET BIDIMENSIONNELLES A L'ETUDE
STRUCTURALE DE LIGNINES NATURELLES ET ARTIFICIELLES

Dans cette partie nous présentons les nouvelles séquences RMN que nous avons utilisées pour améliorer les analyses structurales réalisées jusqu'alors sur les lignines.

Parmi les multiples expériences décrites dans la littérature, (89, 90, 113) nous avons retenu celles qui présentaient un intérêt pour l'étude structurale des lignines. Certaines expériences ont été écartées à cause des problèmes de sensibilité inhérents à la spectroscopie RMN du carbone treize. En effet, la faible abondance naturelle des ^{13}C (1%) combinée à leur très grande anisotropie de déplacement chimique dans un échantillon de lignine est rédhibitoire pour la plupart des expériences bidimensionnelles. L'analyse de lignines enrichies en ^{13}C extraites de végétaux cultivés en atmosphère enrichie en $^{13}\text{CO}_2$ est une solution expérimentale à ce problème.

L'utilisation d'une nouvelle expérience n'a d'intérêt que si elle représente un réel progrès dans l'analyse structurale du polymère. C'est finalement en fonction de ces deux critères (sensibilité - intérêt) que nous avons choisi de présenter les résultats qui suivent.

Les attributions des signaux d'un spectre RMN ^{13}C de lignine reposent essentiellement sur leur comparaison avec les signaux de composés modèles. Néanmoins, l'analyse est rendue difficile par le grand nombre de signaux qui se recouvrent partiellement ou complètement. Certaines ambiguïtés peuvent être levées si l'on connaît le nombre de protons liés aux carbones des signaux considérés. Parmi les nombreuses expériences (off-résonance, JMOD, INEPT, DEPT.....) qui conduisent à ce type d'attribution, l'expérience DEPT s'est avérée particulièrement performante. Elle permet d'enregistrer les spectres RMN sélectifs des carbones CH_1 , CH_2 et CH_3 . On peut non seulement attribuer les différents signaux en fonction du nombre de protons liés aux carbones, mais aussi distinguer des signaux superposés à condition qu'ils soient dus à des carbones liés à un nombre différent de protons.

Nous avons pu démontrer que l'exploitation quantitative des spectres obtenus par l'expérience DEPT est tout à fait envisageable si l'on choisit convenablement les différents paramètres expérimentaux intervenant dans l'expérience DEPT (chapitre II.2).

Nous présentons dans les chapitre (II.3) et (II.4) les apports de l'expérience DEPT dans l'analyse structurale de lignines MWL extraites de bois de feuillus de conifères et d'une lignine artificielle (DHP) synthétisée à partir d'alcool coniférylique. Ces études reposent sur une exploitation qualitative (chapitre II.3) et quantitative (chapitre II.4) des spectres CH_1 , CH_2 et CH_3 enregistrés avec l'expérience DEPT.

Enfin nous exposons au chapitre (II.5) les apports de l'expérience bidimensionnelle de corrélation des déplacements chimiques carbone-carbone par les couplages scalaires $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ (2D INADEQUATE) réalisée sur une lignine MWL de peuplier enrichie en ^{13}C .

Dans un premier chapitre (II.1) nous allons donner quelques points de repères pragmatiques qui permettront aux chimistes néophytes en RMN d'aborder la RMN multiimpulsionnelle.

II.1 QUELQUES RAPPELS SUR LA RMN MULTI-IMPULSIONNELLE

II.11 La transformée de Fourier

Sur les spectromètres RMN utilisés aujourd'hui toutes les transitions sont excitées en même temps par l'application d'une impulsion ν_0 de forte puissance pendant un temps très court t . On génère ainsi les fréquences excitatrices de l'intervalle ($\nu_0 - 1/t$,

$\nu_0 + 1/t$). On appelle porteuse la fréquence ν_0 . On aura une réponse du système chaque fois qu'une fréquence excitatrice correspond à une fréquence de résonance ν_1 de l'échantillon définie par :

$$\nu_1 = (1 - \sigma) \frac{\gamma B_0}{2}$$

γ : rapport magnéto gyrique n'existe que pour les noyaux à spins non nuls (^{13}C , ^1H ...)

B_0 : champ magnétique principal

σ : constante d'écran qui pour un noyau donné varie suivant son environnement chimique et fait que l'on observe différentes résonances sur les spectres RMN du ^{13}C ou du ^1H d'une molécule

En RMN par impulsions, toutes les fréquences excitatrices sont générées en même temps. On a une superposition des réponses qu'il faut alors séparer. Cela se fait par le jeu d'une transformation mathématique particulièrement astucieuse : la transformée de Fourier.

Pour cela, à la suite de l'impulsion excitatrice on recueille cette superposition de réponses (signal de précession libre) pendant un temps TA plus ou moins long (temps d'acquisition). On obtient alors un signal global $S(t)$ qui s'amortit dans le temps. La transformée de Fourier (TF) du signal $S(t)$, réalisée par le calculateur du spectromètre, permet d'obtenir une réponse, en fonction de la fréquence $S(\nu)$.

$$S(t) \xrightarrow{\text{TF}} S(\nu)$$

Ainsi par cette transformation on obtient un spectre du même type que celui obtenu en onde continue. Vu les délais très courts de chaque expérience de l'ordre de la seconde pour une expérience de RMN ^{13}C sur nos échantillons dans des conditions de routine, on peut accumuler de nombreux signaux de FID avant d'en faire la transformée de Fourier. On améliore ainsi le rapport signal sur bruit et la RMN des noyaux peu sensibles ou faiblement abondants (1,1 % pour le ^{13}C) devient tout à fait routinière. On comprend le rôle des calculateurs pour le stockage et le traitement de l'information.

II.12 Description des expériences RMN dans un référentiel tournant

L'origine des aimantations étant décrite dans tous les ouvrages élémentaires on rappellera uniquement la simplification apportée par le changement de repère pour décrire les expériences de RMN (119). Pour simplifier la description des expériences RMN, on se place dans un référentiel tournant à la fréquence de précession ($\nu_o = \frac{\gamma B_o}{2\pi}$) du noyau observé. On montre alors que la composante du champ principal (créé par le cryo ou l'électroaimant) devient négligeable et que la composante efficace du champ exciteur est stationnaire pendant l'impulsion (figure 7).

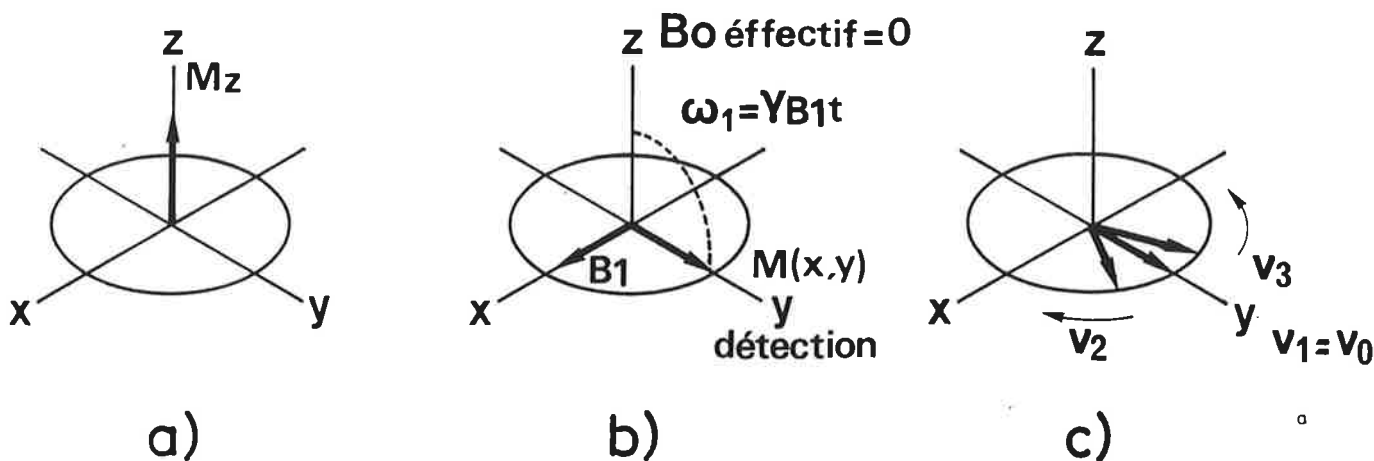


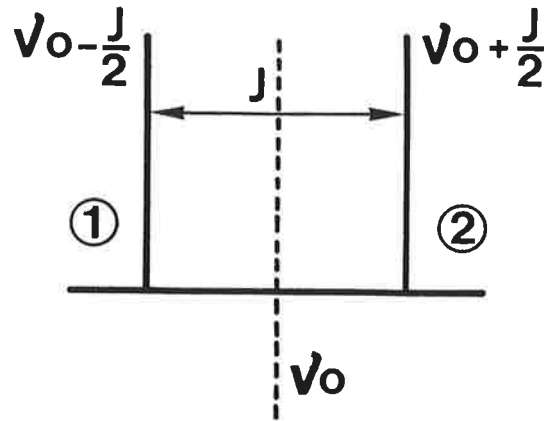
Figure 7 : Représentation des aimantations dans un référentiel tournant à une fréquence ν_0 : a) à l'équilibre ; b) immédiatement après une impulsion à 90° ; c) après une période d'évolution consécutive à l'impulsion à 90° (ν_1 , ν_2 et ν_3 correspondant à des fréquences de résonances distinctes avec $\nu_3 < \nu_1 = \nu_0 < \nu_2$)

Le mouvement du vecteur aimantation peut être décrit comme un basculement de celui-ci par rapport à l'axe défini par B_1 et proportionnel au temps pendant lequel on applique B_1 (figure 7b).

Dans un tel référentiel les vecteurs représentant les aimantations sont fixes si elles ont une fréquence de résonance identique à la fréquence de rotation du référentiel tournant, mais ils se déphaseront plus vite (ou moins vite) si les aimantations ont des fréquences de résonance supérieures (ou inférieures) à la fréquence de rotation (figure 7c).

- Exemple d'application (fig. 8)

Si l'on considère un couple $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, en RMN du carbone treize on observe un doublet qui correspond aux deux transitions observables dues au couplage scalaire carbone-proton $^{13}\text{C}-^1\text{H}$. Si le centre du doublet est à la fréquence ν_0 on peut exprimer les fréquences de chacune des transitions observables en fonction de ν_0 et de la constante de couplage scalaire.



On peut représenter les aimantations dans le référentiel tournant après une impulsion excitatrice et une période d'évolution (t).

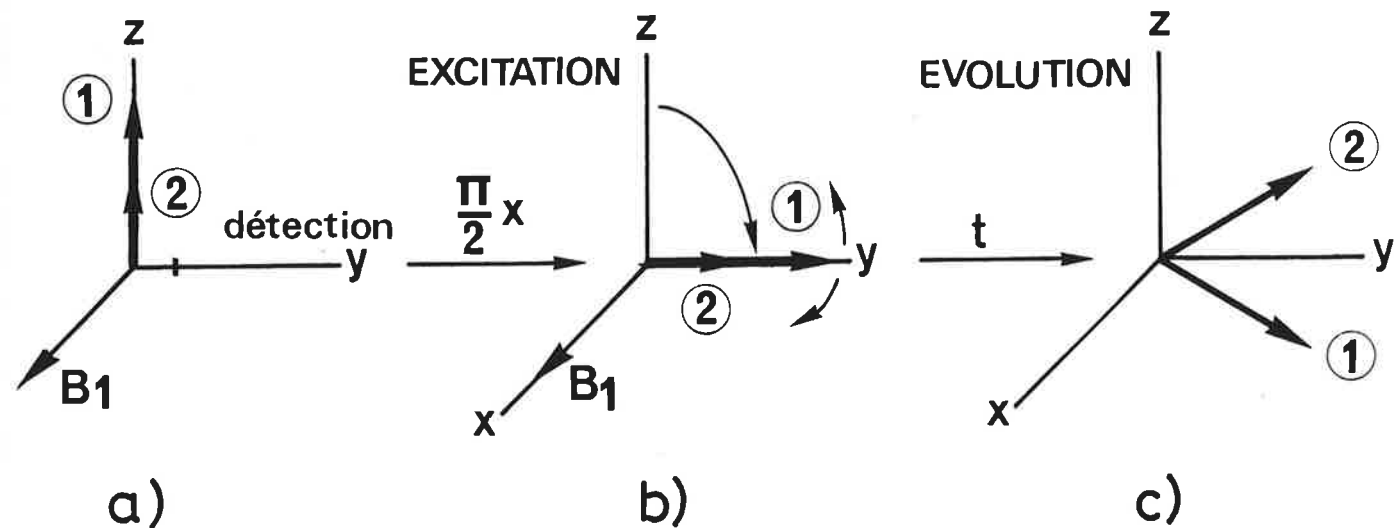


Figure 8 : Représentation dans un référentiel tournant des aimantations ^{13}C d'un couple $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$: a) à l'équilibre ; b) immédiatement après une impulsion à 90° ; c) après une période d'évolution.

Au bout d'un temps t les aimantations seront déphasées par rapport à la porteuse de $2\pi(v_0 - J/2)t$ pour l'aimantation ① et $2\pi(v_0 + J/2)t$ pour l'aimantation ②. Le déphasage entre les deux aimantations est alors $2\pi Jt$. Pour $t = 1/2 J$, les 2 aimantations sont à 180° , on ne détecte plus de signal le long de l'axe d'observation y .

II.13 Effet des inhomogénéités du champ principal B_0

Le champ principal B_0 n'est pas parfaitement homogène dans tout le volume de l'échantillon et au lieu d'avoir B_0 on a plutôt $B_0 \pm \Delta B_0$. La fréquence de résonance ne sera donc pas exactement $\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$ pour un noyau donné mais plutôt :

$$\nu_0 \pm \Delta \nu_0 = \frac{\gamma (B_0 \pm \Delta B_0)}{2\pi}$$

Ainsi, quel que soit l'aimantation, elle se sépare en des isochromates lents $\mu_0 - \Delta \mu_0$ et des isochromates rapides $\mu_0 + \Delta \mu_0$, cela conduit à une dispersion des vecteurs aimantations, dont la résultante au bout d'un certain temps s'annule le long de l'axe y. On peut supprimer les effets néfastes dus aux inhomogénéités de champ par l'expérience d'écho de spin (cf. § II.145).

II.14 Retour à l'équilibre de l'aimantation après une impulsion excitatrice

Après une impulsion excitatrice ayant fait basculer l'aimantation d'un angle Θ , on peut la décomposer en une composante transversale M_{ox} selon OX et une composante longitudinale M_z selon O_z . Ces composantes reviennent de manière indépendante à leur position d'équilibre (M_0 pour M_z , 0 pour M_x) suivant des lois qui dépendent du temps :

- Retour à l'équilibre de l'aimantation transversale :

$$M_z = M_0 (1 - 2 e^{-t/T_1})$$

- Retour à l'équilibre de l'aimantation horizontale :

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2}$$

T_1 définit le temps de relaxation longitudinale (spin-réseau)

T_2 définit le temps de relaxation horizontale (spin-spin)

Puisque la détection se fait selon l'axe Y si l'on veut détecter un signal après une impulsion excitatrice, il faut un T_2 suffisamment long. Compte-tenu des inhomogénéités du champ principal le retour à l'équilibre de la composante transversale de l'aimantation est beaucoup plus rapide que si elle dépendait uniquement de T_2 .

On relie le T_2 avec la largeur la raie d'absorption a mi-hauteur :

$$\Delta(\nu)_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2^{\star}} \quad (1)$$

l'étoile indique que $\Delta(\nu)_{1/2}$ ne dépend pas uniquement du vrai T_2 mais d'un T_2 modifié par les effets dus aux inhomogénéités du champ principal B_0 .

On a : $1/T_2^{\star} = 1/T + 1/t$

$1/t$ rend compte des effets dus aux inhomogénéités du champ.

Dans tous les cas on constate, à partir de la relation (1) que pour des T_2 courts on aura des raies larges et pour des T_2 longs on aura des raies fines.

On s'affranchit des inhomogénéités du champ principal par l'expérience d'écho de spins.

II.15 Expérience d'écho de spin

Elle est réalisée en appliquant une impulsion à 180° au milieu d'une période donnée d'évolution. Une telle séquence d'impulsion réalisée sur le ^{13}C s'écrit :

^{13}C : $90^\circ_x - D_2 - 180^\circ_x - D_2$ Acquisition avec ou sans découplage des protons.

On peut suivre l'effet de cette expérience sur une aimantation ^{13}C (fig. 9). Sous l'effet des inhomogénéités du champ B_0 chaque aimantation se sépare en différentes composantes qui évoluent pendant la période D_2 . L'impulsion à 180° retourne les isochromats qui continuent d'évoluer avec leur propre fréquence et ils se retrouvent alors parfaitement refocalisés au bout de $2t = 2D_2$ le long de l'axe y (120).

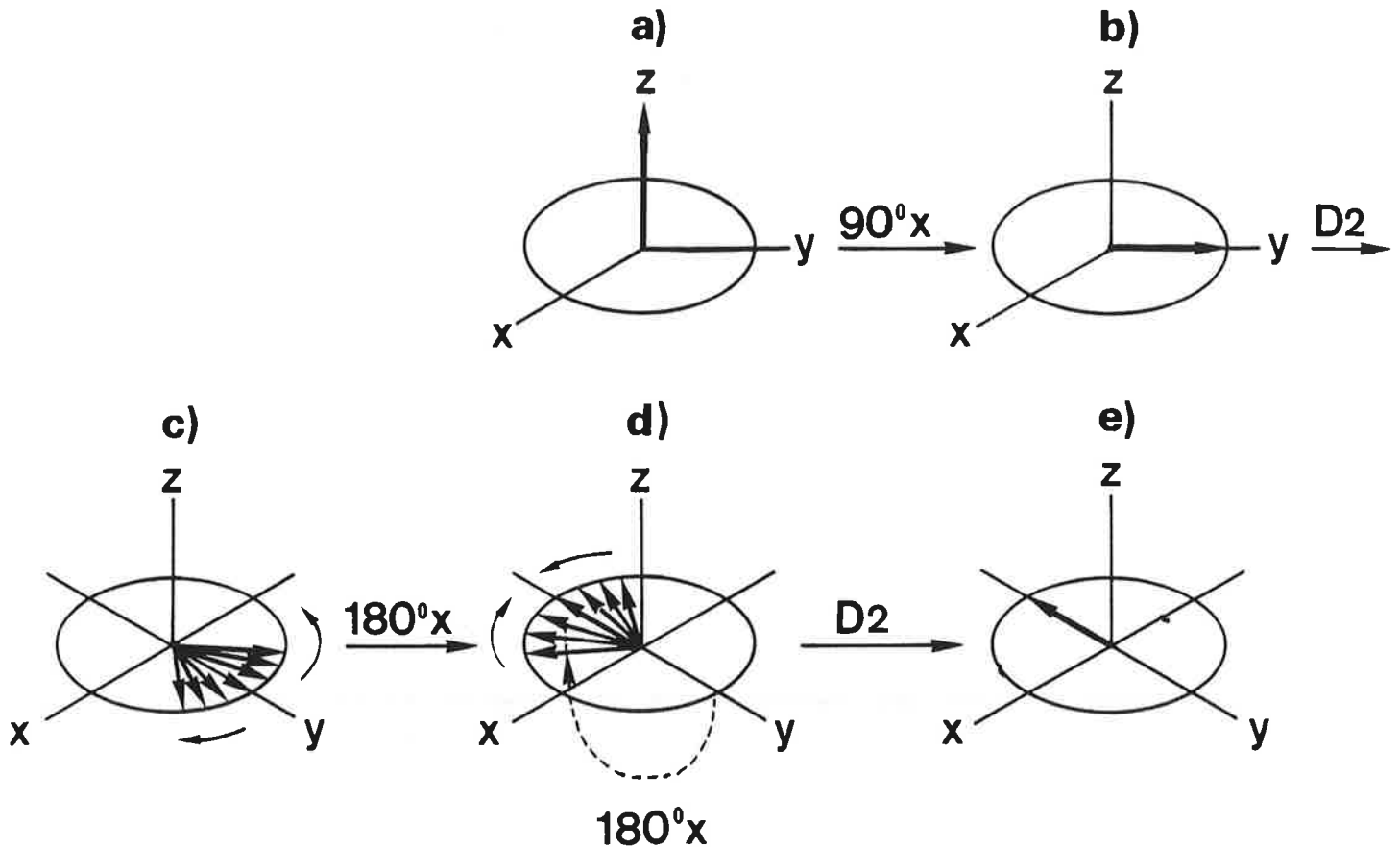


Figure 9 : Expérience d'écho de spin sur le carbone treize (^{13}C : $90^\circ x - D_2 - 180^\circ x - D_2$ - acquisition), évolution des aimantations dans un référentiel tournant : a) à l'équilibre ; b) immédiatement après une impulsion à $90^\circ x$; c) séparation de l'aimantation en différents isochromats pendant la période D_2 sous l'effet des inhomogénéités du champ B_0 ; d) l'impulsion à $180^\circ x$ retournant les isochromats qui continuent d'évoluer avec leur propre fréquence et qui se retrouvent alors parfaitement refocalisés à la fin de la deuxième période D_2 (e).

Par rapport au signal que l'on enregistre juste après une impulsion excitatrice, celui enregistré après l'expérience d'écho de spin a diminué d'intensité sous l'effet de la relaxation transversale (T_2).

En augmentant la durée des échos on enregistre des signaux qui diminuent et l'on peut calculer la valeur de T_2 pour l'aimantation considérée.

Cette expérience permet de séparer des raies fines de raies nettement plus larges. En effet, nous avons vu que ces deux types de

raies se distinguent par leur valeur de T_2 . Pour éliminer de telles raies larges, il suffit, en reprenant l'expérience d'écho de spin décrite précédemment, d'augmenter le délai D_2 jusqu'à la disparition des raies larges, les raies fines ayant une relaxation transversale plus lente resteront seules. En général, on préfère conserver une valeur petite du délai et accroître le nombre n d'échos. La séquence s'écrit alors :

^{13}C : $90_x (D_2 - 180^\circ - D_2)_n$ acquisition avec ou sans découplage des protons

Ce type de séquence est très important en spectrométrie "in vivo" (122) et en RMN des molécules biologiques pour lesquelles la suppression des raies larges facilite l'interprétation des spectres (123).

Cependant, toutes les impulsions de 180° placées au milieu d'une période d'évolution ne refocalisent pas les déplacements chimiques et les inhomogénéités de champ (89). En effet, si on considère un couple hétéronucléaire ($^{13}\text{C} - ^1\text{H}$) ou homonucléaire ($^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$, $^1\text{H} - ^1\text{H}$) on peut imaginer différentes expériences que nous donnons avec leurs résultats à la figure 10.

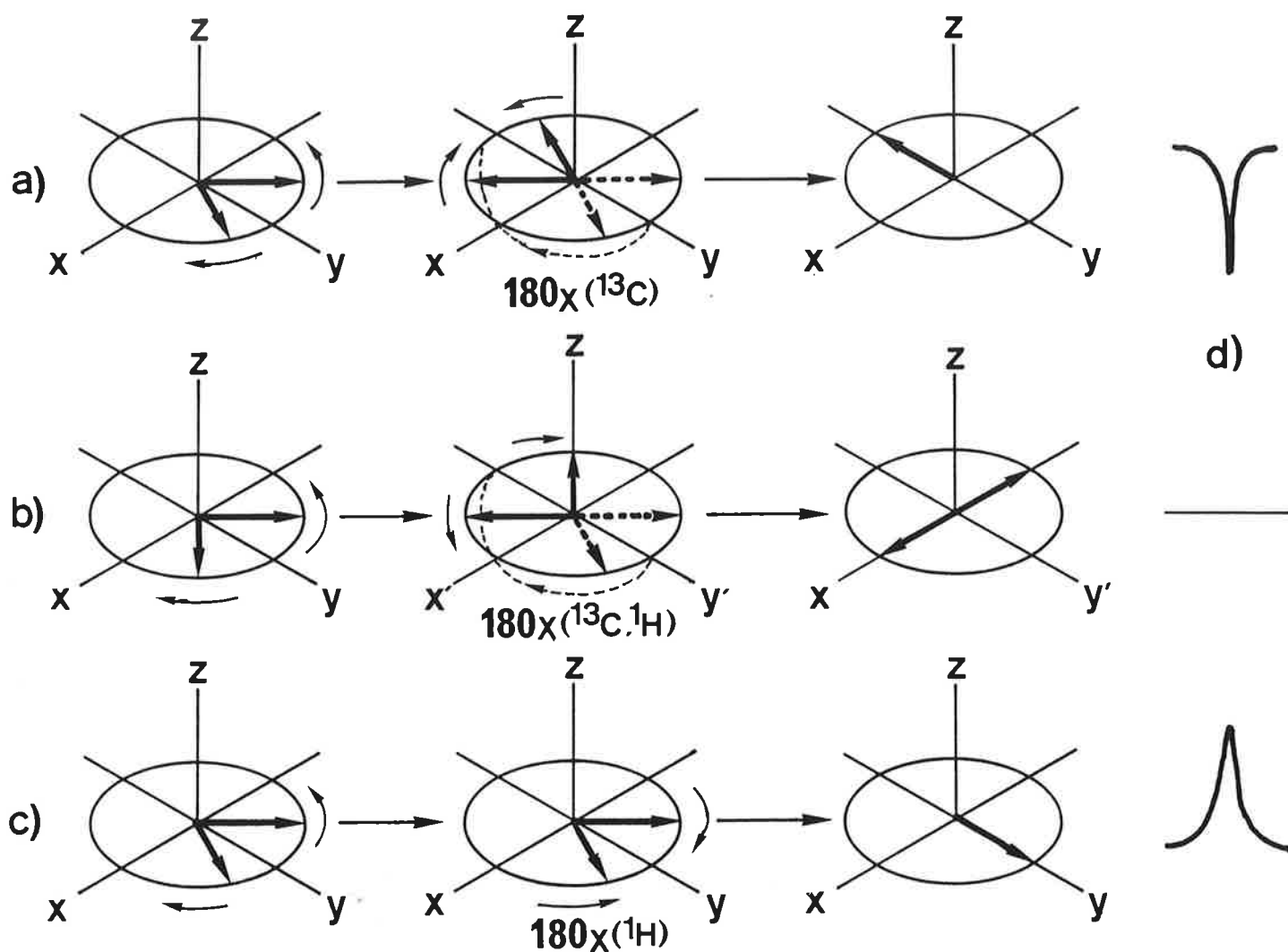


Figure 10 : Effets d'impulsions à 180° appliquées au milieu d'une période d'évolution sur les aimantations ^{13}C d'un couple C-H ; a) 180° sur les ^{13}C uniquement : retourne les aimantations et conserve les sens de rotation ; b) 180° sur les ^{13}C et ^1H : retourne les aimantations et inverse les sens de rotation ; c) impulsion à 180° sur les ^1H uniquement : inverse les sens de rotation ; d) signal ^{13}C enregistré en découplant les protons.

Seuls les cas a et b permettent de s'affranchir des effets dus aux inhomogénéités du champ B_0 .

Ces résultats s'expliquent bien, si on repasse aux diagrammes de répartition des populations de spin sur des niveaux d'énergie correspondant aux combinaisons des états de spin ($\alpha\beta$, $\beta\beta$, $\beta\alpha$, $\alpha\alpha$), et si on admet qu'une impulsion à 180° sur un noyau donné fait passer les spins de l'état α à β et vice versa (124).

II.16 Séparation des signaux suivant le nombre de protons liés aux carbones en RMN monodimensionnelle

Cette attribution peut être réalisée par deux types d'expériences :

- les expériences de modulation des intensités (JMOD) en fonction des constantes de couplage (JMOD) carbone-proton (125, 126, 127).
- les expériences de transfert d'aimantations des protons sur les carbones treize.

II.161 Séparation des signaux RMN en fonction des constantes de couplage carbone-proton

La séquence impulsionnelle est la suivante (127) :

^{13}C : 90° , D_2 - 180° - D_2 acquisition
 ^1H : découplage découplage

L'impulsion à 180° permet de refocaliser les inhomogénéités du champ magnétique B_0 . Pratiquement, c'est pendant le deuxième délai D_2 que les aimantations vont donner une, deux, trois ou quatre composantes suivant le nombre de protons liés aux carbones. Si l'on considère le centre des multiplets à la fréquence ν_0 du référentiel tournant, on peut alors exprimer les différentes fréquences des composantes des aimantations en fonction de J et ν_0 .

Carbones quaternaires	: 1 composante à ν_0
Carbones tertiaires CH_1	: 2 composantes à $\nu_0 \pm J/2 t$
Carbones secondaires CH_2	: 3 composantes à $\nu_0, \nu_0 \pm J t$
Carbones primaires CH_3	: 4 composantes à $\nu_0 \pm J/2 t$ et $\nu_0 \pm 3 J/2 t$

En fonction de la durée de D_2 , il est facile d'établir les évolutions des composantes suivant le type des carbones (fig. 11). On constate que pour $D_2 = 1/J$ les signaux des carbones quaternaires et secondaires sont inversés par rapport à ceux des tertiaires et primaires. Pour la valeur $D_2 = 1/2 J$ on récupère uniquement les signaux des carbones quaternaires.

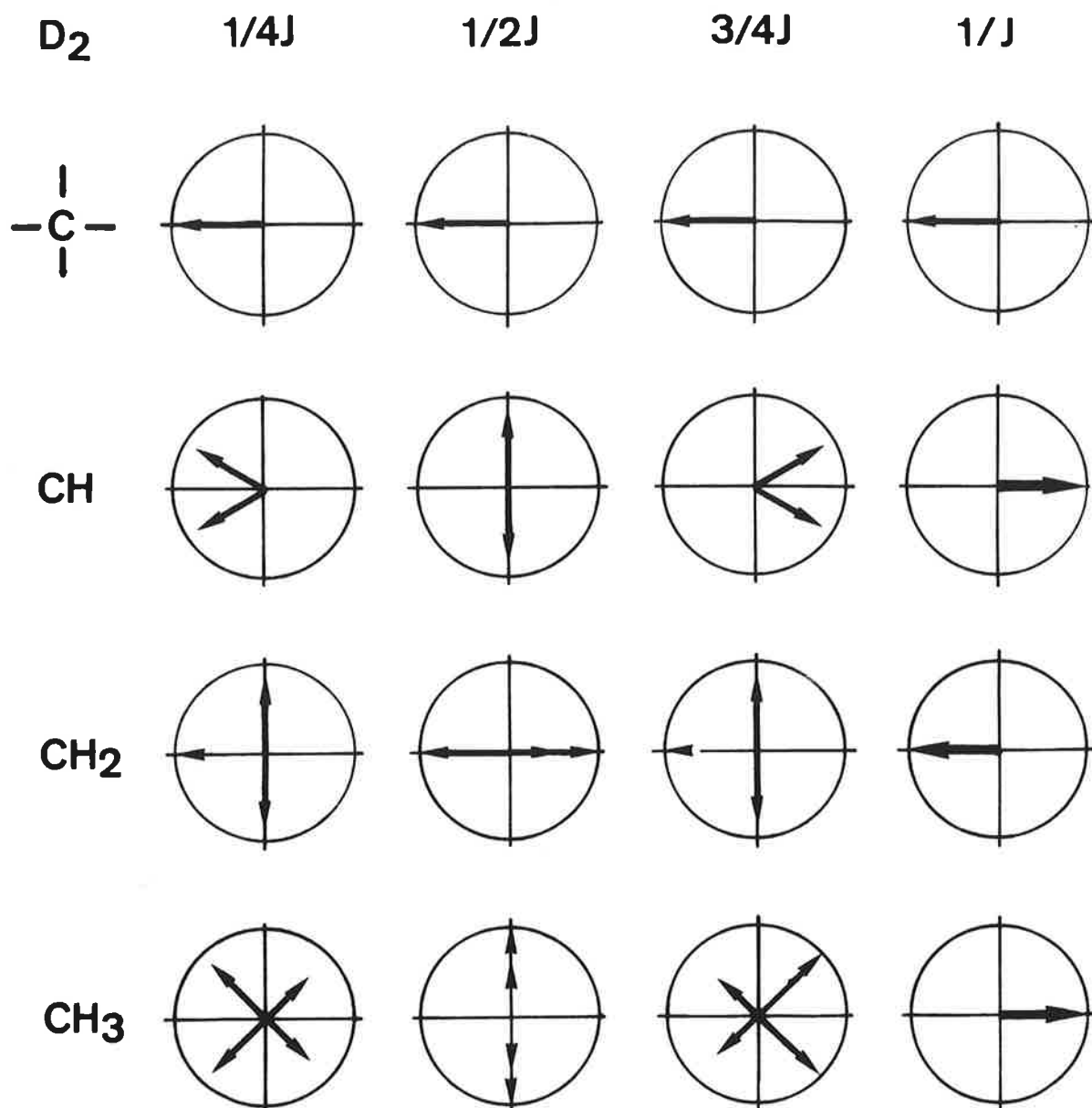


Figure 11 : Evolution des aimantations des carbones C, CH, CH₂ et CH₃ en fonction de la valeur de D_2 dans la séquence JMOD.

Selon la valeur de D_2 et le type du carbone les intensités des signaux enregistrés en découplant les protons peuvent être données par les équations suivantes (127) :

Pour un carbone quaternaire	$I_{\text{quat}} = I_0$
Pour un carbone tertiaire	$I(\text{CH}) = I_0 \cos(\pi D_2 J)$
Pour un carbone secondaire	$I(\text{CH}_2) = 1/2 I_0 (1 + \cos(\pi D_2 J))$
Pour un carbone primaire	$I(\text{CH}_3) = 1/4 I_0 (3 \cos(\pi D_2 J) + \cos(3 \pi D_2 J))$

II.162 Expérience DEPT (Distortionless enhancement by polarisation transfert) : Séparation des signaux par transfert d'aimantations des protons sur les carbones

a) Transfert de polarisation non sélectif

Si l'on considère un couple $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, l'inversion sélective de l'une des transitions du couple $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ observé sur le spectre RMN proton permet de modifier l'intensité des raies du doublet observé en RMN ^{13}C .

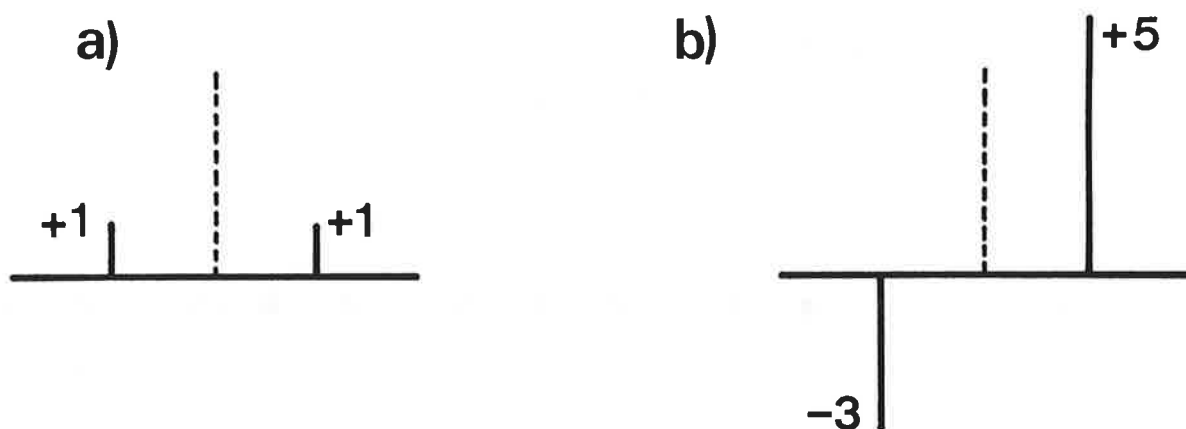


Figure 12 : a) Signal en RMN ^{13}C du couple $^{13}\text{C}-^1\text{H}$; b) Signal en RMN ^{13}C du couple $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ enregistré juste après l'inversion de l'une des composantes du satellite $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ observé sur le spectre proton.

Cette expérience s'accompagne d'une augmentation des intensités des transitions du ^{13}C . Si l'on reprend le diagramme d'énergie des spins d'un couple $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, l'inversion sélective de l'une des transitions proton inverse les populations des deux niveaux d'énergie correspondant. Les différences de population de chacun des niveaux, définissant pour chaque transition ^{13}C , l'intensité des signaux correspondants, se trouve alors augmentée d'un facteur $\pm \frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{C}}}$

Cette expérience RMN connue sous le nom de SPT (Selective Population Transfer inversion) peut être utilisée pour l'observation des noyaux peu sensibles liés à des protons et ayant un rapport magnéto-gyrique petit par rapport à γ_{H} . Cette expérience peut être utilisée pour la détermination des signes de couplage $^{13}\text{C}-^1\text{H}$.

b) Transfert d'aimantation non sélectif

Une étape importante a été franchie lorsqu'il a été démontré que l'on pouvait réaliser l'inversion de population de manière non sélective, c'est-à-dire sur tous les systèmes $^{13}\text{C}-\text{H}_n$ de l'échantillon par l'expérience suivante en RMN impulsionnelle.

$$^1\text{H} : 90^\circ_x - D_2 - 90^\circ_y$$

$$^{13}\text{C} : \quad \quad \quad 90^\circ_x \text{ Acquisition}$$

On peut représenter l'évolution des aimantations protons d'un couple ^{13}CH par exemple pour $D_2 = 1/2J$ au cours de cette séquence (figure 13).

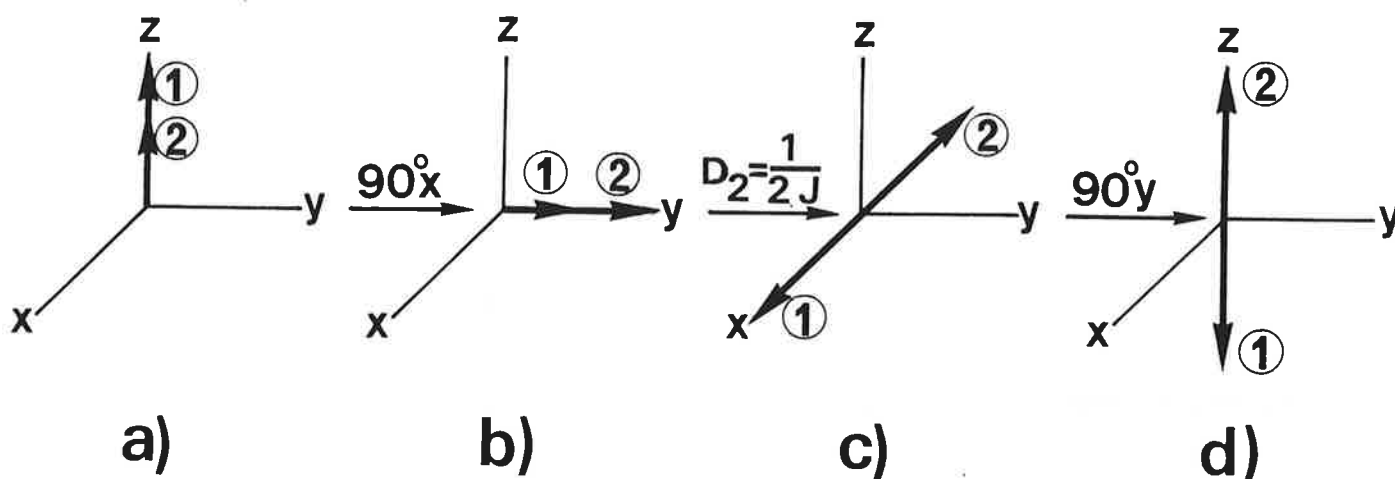


Figure 13 : Evolution des aimantations ^1H d'un couple C-H lors d'une séquence d'inversion de population non sélective des protons $^1\text{H} : 90^\circ_x - D_2 - 90^\circ_y$; $D_2 = \frac{1}{2 J^{1,13}_{\text{C-H}}}$

On réalise sur tous les couples $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ de l'échantillon l'inversion de l'une des deux composantes. Ainsi après l'impulsion de lecture de 90° sur le ^{13}C , on obtient une modification d'intensité identique à celle obtenue dans le cas de l'inversion sélective, mais ce sur tous les couples CH de l'échantillon.

En fait, dans l'expérience telle que nous l'avons décrite, les inhomogénéités du champ principal perturbent fortement la détection du signal. On s'affranchit de ce problème en réalisant la séquence suivante où l'on introduit une séquence d'écho de spin (128).

$$^1\text{H} : 90^\circ_x - D_2 - 180^\circ_x - D_2 - 90^\circ_y$$

$$^{13}\text{C} : \quad \quad \quad 180^\circ_x \quad \quad \quad 90^\circ_y \text{ acquisition}$$

L'impulsion de 180° sur ^1H seule refocalise effectivement les inhomogénéités de champ, mais également les déplacements chimiques, ainsi au bout du délai $2 D_2$, les deux composantes sont refocalisées et

l'on ne retrouve pas l'état de la fig. 13.C. En revanche, si on applique simultanément une impulsion à 180° sur les carbones, on inverse le sens de rotation des deux composantes qui, au bout du délai $2D_2$ se trouvent en opposition de phase si l'on choisit $D_2 = 1/4J$. A la suite de l'impulsion à 90_y sur 1H , les deux composantes se retrouvent comme sur la figure 13d mais les effets négatifs dus aux inhomogénéités de champ sont supprimés. L'impulsion à 90_x sur les carbones permet alors d'observer le signal attendu.

Cette expérience constitue la base des séquences du type INEPT (129) ou DEPT (115).

L'expérience DEPT est généralement préférée à l'expérience INEPT dont elle est issue. En effet, la séquence d'impulsion DEPT est beaucoup plus astucieuse et permet d'enregistrer les sous spectres spécifiques CH, CH₂ et CH₃.

La séquence d'impulsions de l'expérience DEPT est la suivante :

$$\begin{array}{ll}
 ^1H : 90_x^\circ - D_2 - 180_x^\circ - D_2 - \Theta_y^\circ & \text{découplage} \\
 ^{13}C : 90_x^\circ - D_2 \quad 180_x^\circ - D_2 - & \text{acquisition} - D_1 -
 \end{array}$$

Le transfert d'aimantation est réalisé par l'impulsion Θ_y° et dépend de sa valeur et du nombre de protons liés au carbone. Ainsi, l'intensité du signal enregistré est fonction de ces deux éléments. Les courbes de la figure 14 illustrent l'évolution des intensités des signaux CH, CH₂, et CH₃ enregistrés avec la séquence DEPT lorsque la valeur de Θ varie. Généralement, on enregistre 3 spectres de base pour les valeurs de Θ égales à $\pi/4$, $\pi/2$ et $3\pi/4$, leur combinaison linéaire permet d'obtenir les sous spectres spécifiques des carbones CH, CH₂ et CH₃.

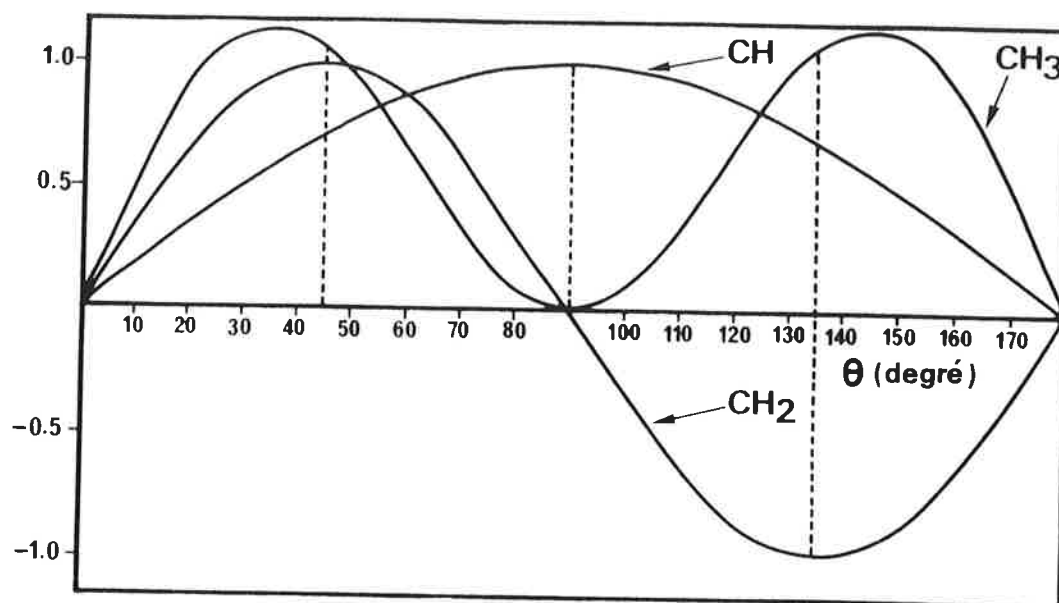


Figure 14 : Evolution des intensités des aimantations CH_3 , CH_2 et CH en fonction de l'impulsion Θ dans la séquence DEPT.

II.2 APPLICATION DE LA RMN MULTI-IMPULSIONNELLE A UNE DIMENSION A L'ETUDE STRUCTURALE DES LIGNINES

Parmi les expériences de RMN permettant de séparer les signaux des ^{13}C en fonction du nombre de protons qui leur sont liés, nous avons plus particulièrement adopté et utilisé l'expérience DEPT pour l'étude des lignines.

Nous allons, dans ce chapitre, discuter les paramètres intervenant sur la qualité des spectres spécifiques enregistrés et sur la quantitativité des signaux. Nous démontrons ensuite que l'expérience DEPT permet d'enregistrer des spectres CH_1 , CH_2 et CH_3 quantitatifs.

II.21 Influence des paramètres expérimentaux sur la qualité des spectres spécifiques enregistrés avec l'expérience DEPT

La séquence d'impulsion DEPT (§ II.162) est répétée pour trois valeurs de Θ différentes. L'intensité des signaux est ainsi modulée en fonction de Θ .

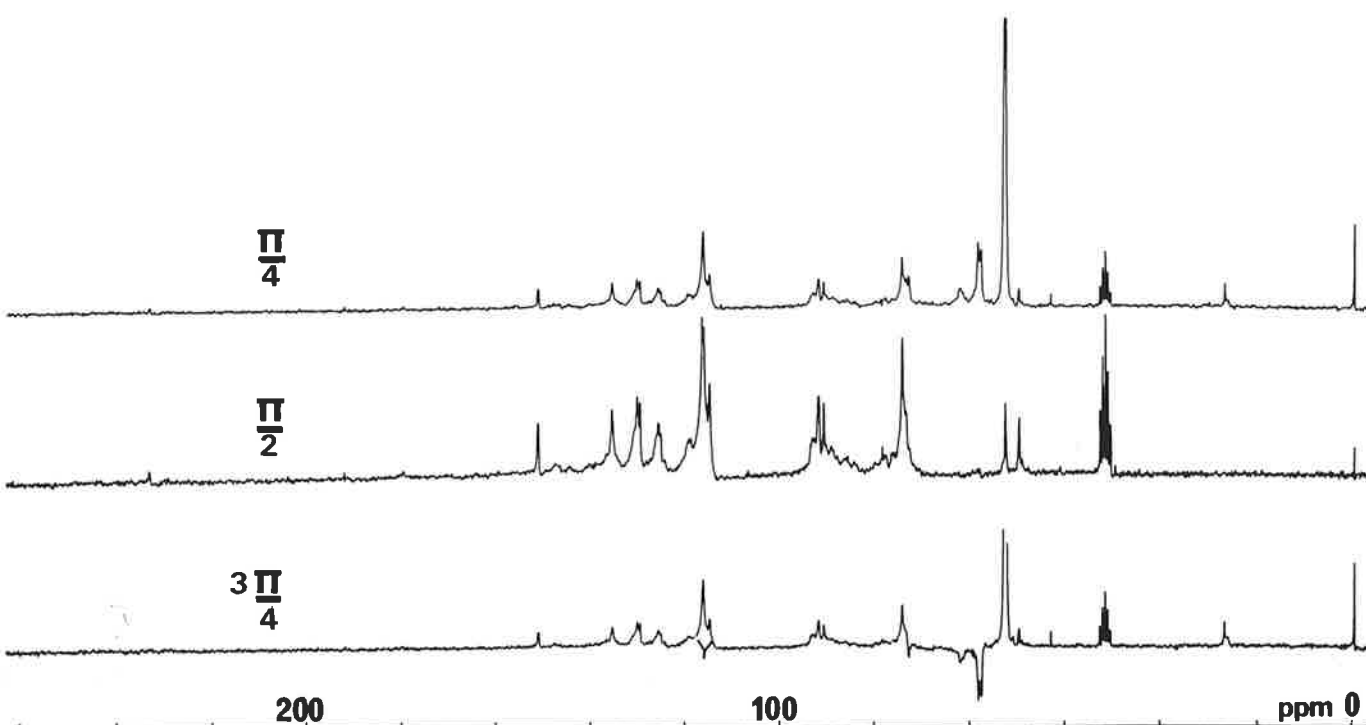


Figure 15 : Spectres de base d'une lignine MWL de peuplier enregistrés avec la séquence DEPT pour des valeurs de $\pi/4$, $\pi/2$ et $3\pi/4$ de l'impulsion Θ .

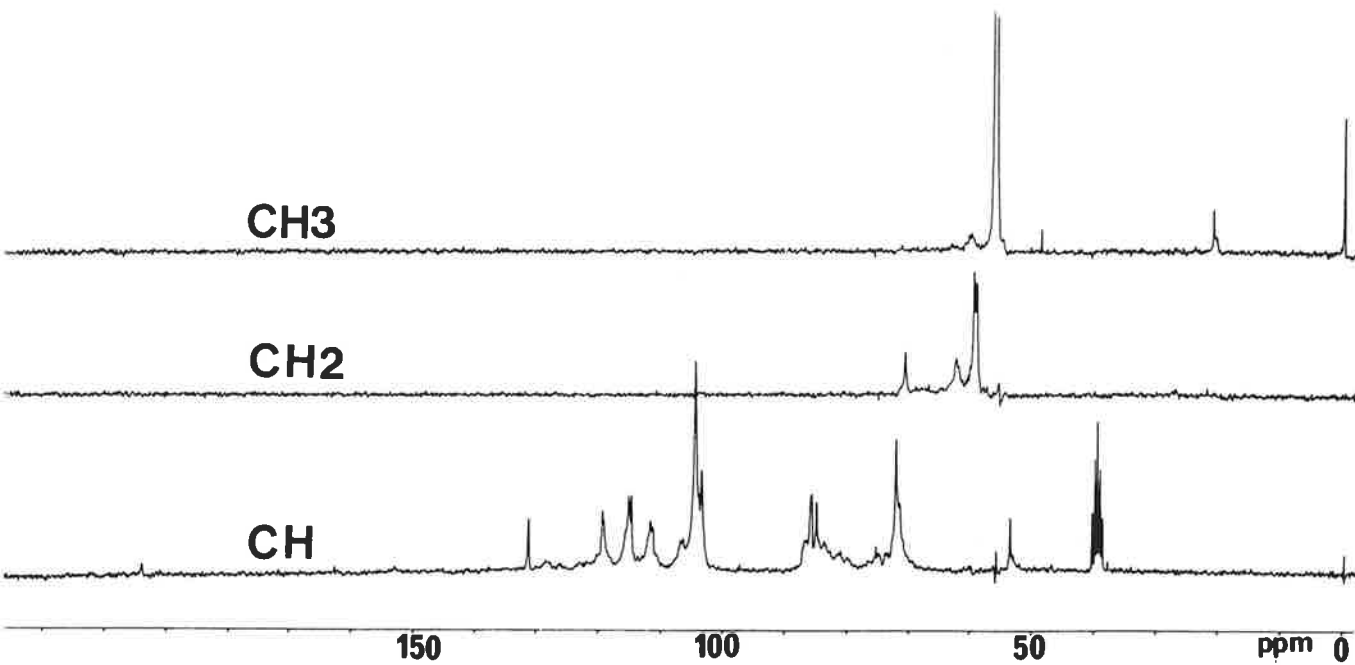


Figure 16 : Spectres spécifiques d'une lignine MWL de peuplier CH , CH_2 et CH_3 obtenus par combinaisons linéaires des spectres de base (cf. figure 15) enregistrés avec l'expérience "DEPT".

. Cette modulation dépend du nombre de protons liés aux carbones. La figure 15 montre les trois spectres de base obtenus pour des valeurs de l'impulsion θ de $\pi/4$, $\pi/2$ et $3\pi/4$. Le spectre enregistré pour $\theta = 3\pi/4$ fournit une attribution rapide des différents signaux puisque les signaux des carbones CH_2 sont déphasés de 180° par rapport aux signaux des carbones CH et CH_3 .

Les spectres de résonance spécifiques (figure 16) des carbones tertiaires, secondaires et primaires sont alors obtenus par combinaison linéaire des 3 spectres de base :

Les spectres de base enregistrés avec la séquence DEPT pour une valeur de θ précise sont notés "spectre de base θ ".

Les spectres spécifiques résultant de la combinaison linéaire des spectres de base sont notés "spectre CH_n ", ainsi :

$$\begin{aligned} \text{spectre } \text{CH}_2 &= \text{spectre de base } 3\pi/4 - a (\text{spectre de base } \pi/4) \\ \text{spectre } \text{CH} &= \text{spectre de base } \pi/2 - c (\text{spectre de base } 3\pi/4) \\ &\quad + a (\text{spectre de base } \pi/2) \\ \text{spectre } \text{CH}_3 &= (\text{spectre de base } 3\pi/4 + a (\text{spectre de base } \pi/4) - b \\ &\quad \text{spectre de base } \pi/2). \end{aligned}$$

Le nombre de signaux de précessions libres accumulés pour obtenir le spectre de base $\pi/2$ est le double de celui utilisé pour chacun des deux autres spectres de base. Moyennant cette condition les valeurs des coefficients donnés dans la littérature sont :

$$1,00 < a < 1,10$$

$$0,68 < b < 0,74$$

$$0 < c < 0,10$$

Pour tous les spectres que nous publions, les coefficients a , b et c correspondent à ces valeurs. Un écart par rapport à ces valeurs ou l'impossibilité d'obtenir les spectres spécifiques sans signaux résiduels traduisaient dans tous les cas des erreurs dans le choix des paramètres expérimentaux :

- erreur dans le temps de répétition D_1 de l'expérience DEPT.

- erreur dans le choix des valeurs des constantes de couplage moyenne $J^{13}\text{C-H}$ intervenant pour la détermination du délai $D_2 = 1/2J$.

- erreur dans la calibration des impulsions 90° et 180° sur les protons et sur les carbones.

Nous avons détaillé l'influence de chacune de ces sources d'erreurs (§ 211, 212 et 213) et optimisé ainsi les paramètres expérimentaux.

II.211 Temps de répétition de l'expérience DEPT

On s'est aperçu qu'un temps de répétition trop court (< 1 s) de l'expérience DEPT a des effets négatifs sur la qualité des spectres obtenus notamment par la présence de signaux résiduels sur les spectres spécifiques.

Dans ce type d'expérience, le retour à l'équilibre des aimantations proton est primordial puisque l'efficacité des transferts de polarisation en dépend directement. Dans l'expérience DEPT, seuls les carbones liés à des protons sont observés, ce sont eux qui relaxent le plus rapidement.

Nous avons donc mesuré les temps de relaxation longitudinale des ^1H et des ^{13}C des échantillons étudiés. Les données ont été collectées à partir des spectres enregistrés avec la séquence d'inversion-récupération et traités sur le calculateur ASPECT 2000 du spectromètre. Les figures 17 et 18 montrent l'évolution des spectres ^{13}C et ^1H enregistrés pour différentes valeurs de D pour la lignine MWL de peuplier. Le tableau 2 donne les valeurs de $T_1\text{C}$ des principaux signaux ^{13}C .

La détermination des temps de relaxation longitudinale $T_1\text{H}$ des protons est beaucoup plus délicate du fait de la largeur des raies. Elle permet néanmoins d'obtenir des temps de relaxation moyens pour les régions spectrales considérées (tableau 3).

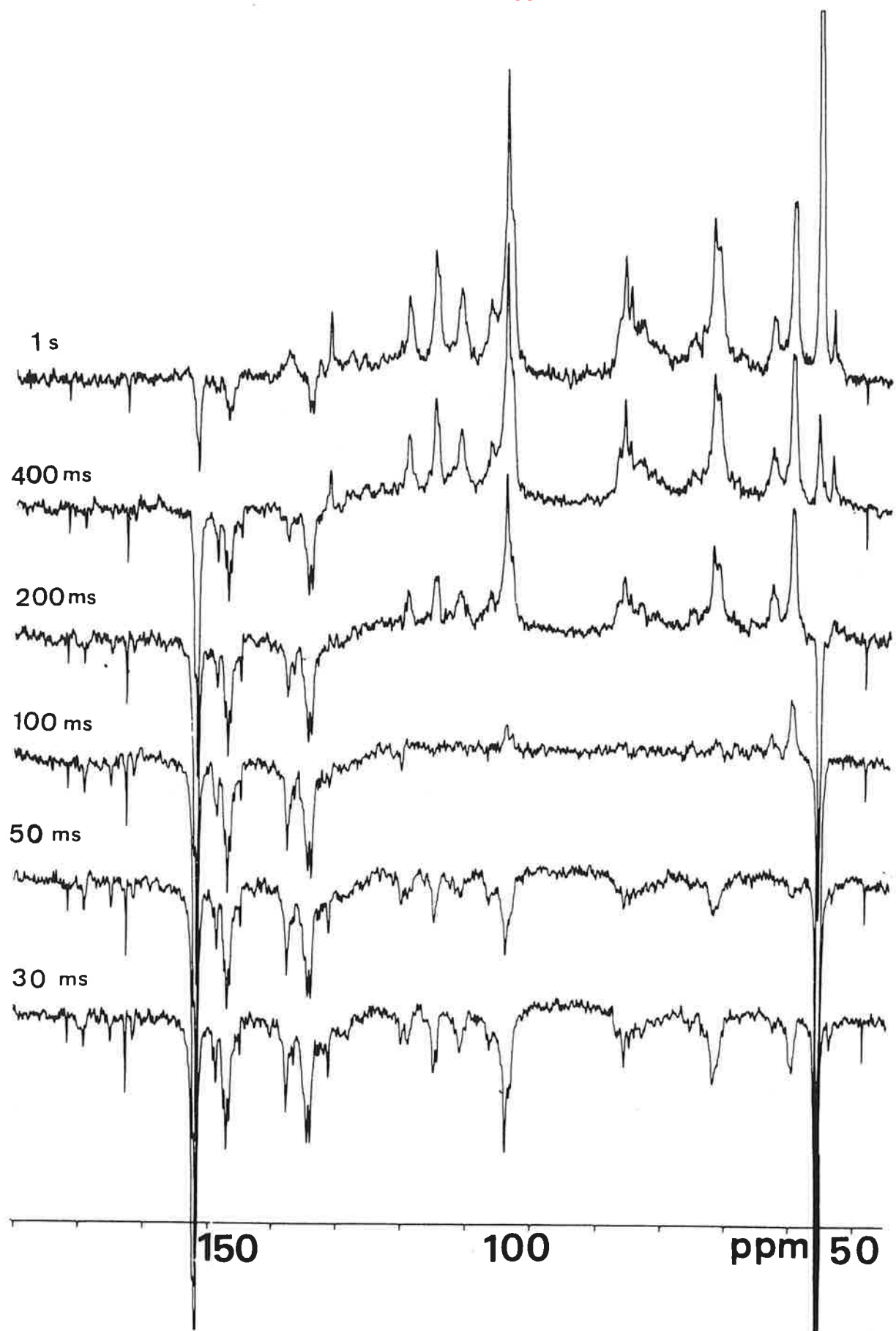


Figure 17 : Spectres ^{13}C de lignines MWL de peuplier enregistrés pour différentes valeurs de VD avec l'expérience d'inversion récupération
 (^{13}C : attente 180° - VD - 90° acquisition)
 (^1H : . découplage .)

TABEAU 2 : DETERMINATION DES T_1 DES ^{13}C D'UNE LIGNINE MWL DE PEUPLIER.
(Echantillon non dégazé).

: Attributions générales des signaux	: Valeurs des T_1 déterminés	:
: considérés	:	:
: Carbones quaternaires aromatiques	: 2,2 - 2,6 s	:
: 152 - 132 ppm	:	:
: Carbones tertiaires aromatiques	: 0,17 - 11 s	:
: 132 - 110 ppm	:	:
: Carbones tertiaires aliphatiques	: 0,13 - 0,15 s	:
: principalement C- α et C- β dans les	:	:
: structures β -0-4	:	:
: 88 - 70 ppm	:	:
: Carbones secondaires aliphatiques	: 0,100 s	:
: C- γ dans les structures β -5 et	:	:
: principalement C- γ dans les structures	:	:
: β -0-4	:	:
: 63 - 60 ppm	:	:
: Carbones primaires des groupes méthoxyles	: 0,5 s	:
: 56 ppm	:	:
: Carbones secondaires aliphatiques C- β	: 0,13 s	:
: dans les structures β - β et β -5	:	:
:	:	:
:	:	:

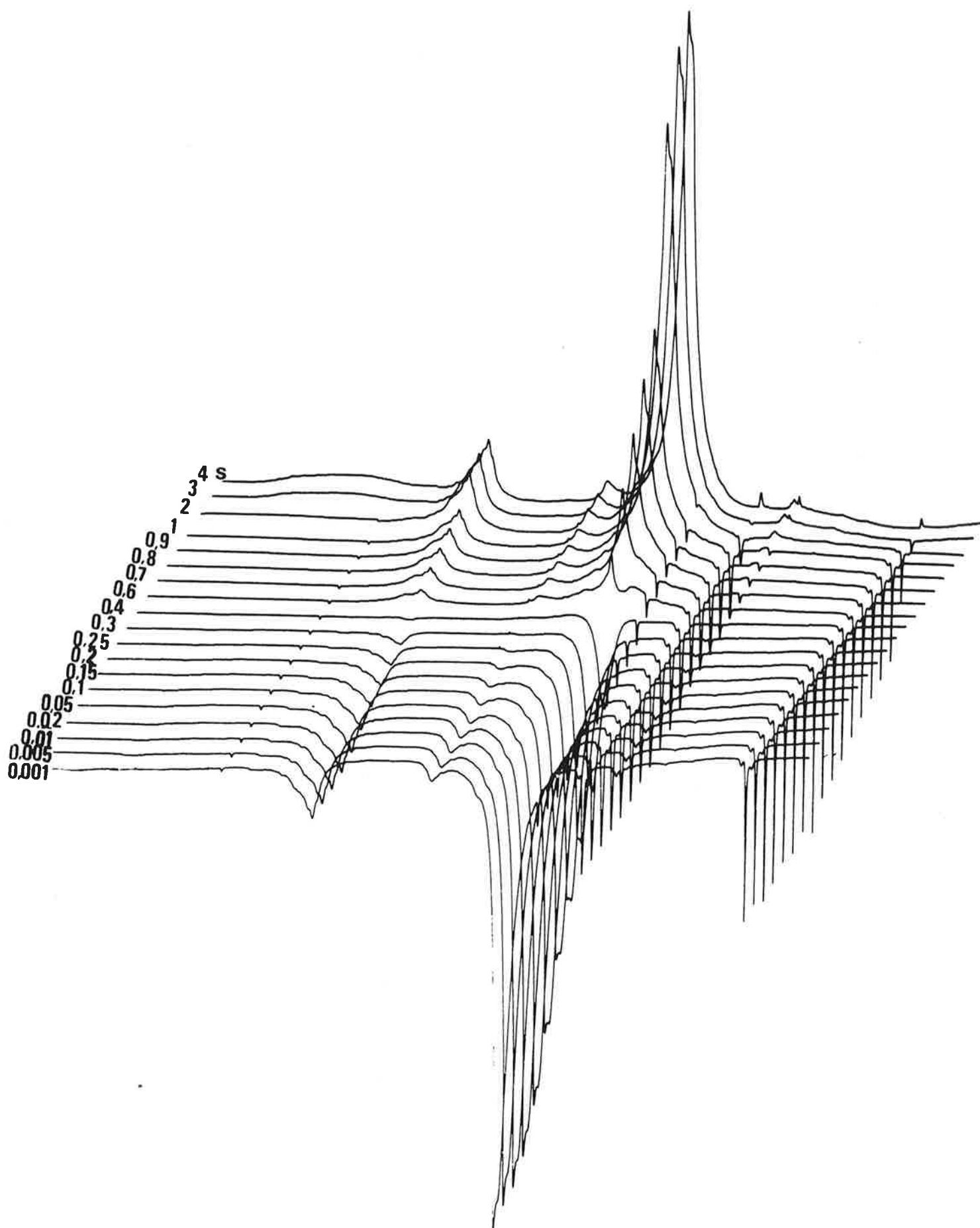


Figure 18 : Spectres ^1H de lignines MWL de peuplier enregistrés pour différentes valeurs de VD avec l'expérience d'inversion récupération (^1H : attente 180° - VD - 90° - acquisition).

TABEAU 3 : DETERMINATION DES T_1 DES ^1H D'UNE LIGNINE MWL DE PEUPLIER
(échantillon non dégazé)

: Attributions générales des signaux : considérés	: Valeurs des T_1 déterminés	:
: Protons aromatiques des unités galacyles : ou syringyles : 7 à 6,4 ppm	: 0,4 s	:
: Protons des chaînes aliphatiques : 5,3 à 4,2 ppm	: 0,4 s	:
: Protons des groupes méthoxyles : 3,8 ppm	: 0,5 s	:
: Protons du DMSO (solvant) : 2,5 ppm	: 2 s	:
: Protons du TMS (référence)	: 2 s	:

Les temps de relaxation longitudinale des ^1H sont nettement plus longs que ceux des ^{13}C auxquels ils sont liés. Par exemple, si l'on considère les protons aromatiques et les carbones aromatiques tertiaires $T_{1\text{H}} = 500$ ms et $T_{1\text{C}} = 100$ Ms. Nous avons vérifié que les lignines MWL d'origines diverses (feuillus, conifères) les lignines artificielles et les lignines extraites du bois de peuplier traité par autohydrolyse rapide ont des $T_{1\text{H}}$ et $T_{1\text{C}}$ tout à fait comparables. Nous avons donc considéré ces valeurs comme représentatives des lignines que nous avons étudiées.

Les valeurs de $T_{1\text{H}}$ et $T_{1\text{C}}$ ainsi obtenues n'ont évidemment qu'un intérêt limité à la détermination des temps de répétition nécessaires au bon déroulement des expériences RMN sélectionnées. En effet, la détermination exacte des valeurs de $T_{1\text{H}}$ et $T_{1\text{C}}$ nécessiterait une préparation soignée des solutions avec par exemple l'élimination de l'oxygène par dégazage (ce qui augmenterait considérablement les valeurs déterminées). Ainsi, à partir des valeurs déterminées aucune interprétation concernant la dynamique moléculaire des lignines n'a été effectuée.

Dans nos expériences nous avons fixé le temps de répétition D_2 à 3 secondes. Compte-tenu des paramètres d'acquisition, le signal de précession libre est recueilli pendant 0,79 s, ainsi la durée totale entre chaque expérience est de 3,8 s supérieure à $5 \times T_{IC}$ et $5 \times T_{IH}$. Ce délai permet donc aux protons et aux carbones observables par l'expérience DEPT d'être parfaitement relaxés au début de chaque nouvelle expérience. Nous avons utilisé une telle valeur pour le développement quantitatif du DEPT, mais il est tout à fait possible de réduire ce délai d'un tiers sans nuire à la qualité des spectres. Néanmoins, il n'est pas possible de le réduire au seul temps d'acquisition (0,79%) qui apparaît trop court et conduit à des spectres de bases inexploitable.

II.212 Choix d'une valeur moyenne des constantes de couplage $J^{13}C-H$

La valeur de cette constante de couplage $^1J^{13}C-^1H$ intervient dans la séquence DEPT dans le choix du délai $D_2 = 1/2J$, période pendant laquelle s'effectue le déphasage des aimantations protons. C'est de ce déphasage dont dépend par la suite le transfert d'aimantations des spins 1H vers les spins ^{13}C .

Si l'on considère les différents types de carbones présents dans un échantillon de lignine, les constantes de couplage prennent des valeurs de 110 Hz pour les carbones aliphatiques saturés (minoritaires dans les lignines MWL) à 150 Hz pour les carbones aromatiques tertiaires et les carbones aliphatiques liés à des oxygènes. Une valeur de 150 Hz est la valeur la plus représentative des constantes de couplage d'un échantillon de lignines. En prenant une valeur moyenne de 130 Hz, les spectres obtenus sont tout à fait corrects.

Ce point est confirmé par une étude théorique de Bendall et Pegg (115) concernant la sensibilité de l'expérience DEPT aux variations, dans la séquence, du délai $D_2 = 1/2J$. Le modèle qu'ils proposent leur permet d'apprécier les erreurs sur les intensités des signaux des carbones considérés et sur les intensités des signaux résiduels des autres carbones en fonction des variations entre la vraie valeur de la constante de couplage $^1J^{13}C-^1H$ et la valeur moyenne choisie (tableau 4) pour chacun des spectres spécifiques enregistrés. Si l'on considère un délai D_2 calculé pour une valeur de $^1J^{13}C-^1H$ de 130 Hz et des variations de J de 10 %, dans le cas le plus défavorable ($J_{CH} = 130$ Hz pour les CH_3 et $J_{CH} = 150$ Hz pour les CH), on aura une différence

d'intensité de 11 % entre les intensités. Compte-tenu de l'homogénéité des valeurs des constantes de couplage rencontrées dans les lignines (118), on peut réduire considérablement cette différence. En effet en prenant 130 Hz comme valeur moyenne, la différence théorique entre les intensités des signaux des différents carbones CH, CH₂ et CH₃ est au plus de 4 %.

TABEAU 4 : EFFETS DES VARIATIONS DE $^1J_{13C-1H}$ SUR L'INTENSITE DES SIGNAUX CH, CH₂ ET CH₃ DU SPECTRES SPECIFIQUES ENREGISTRES AVEC L'EXPERIENCE DEPT, D'APRES BENDALL et PEGG (115)

SPECTRES SPECIFIQUES	INTENSITE DES SIGNAUX (EXPRIMEE PAR RAPPORT A L'INTENSITE DES CH)								
	CH			CH2			CH3		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
CH	100	99,4	97,6		1,2	4,7		0	0
CH2	0	0	0	100	98,8	95,2		0	0
CH3	0	0	0	0	0	0	106	104,1	98,5

a, b et c correspondent respectivement à des variations de $^1J_{13C-1H}$ de 0 %, de 5 % et de 10 %.

II.213 Calibration des impulsions à 90° et 180° sur les 1H et ^{13}C

Pour les valeurs d'impulsion à 90° et 180° sur les ^{13}C , on peut utiliser les valeurs déterminées à partir des solutions tests. En revanche, la calibration des impulsions 1H est tout à fait cruciale et doit être refaite sur chaque échantillon. En effet, un écart de 3 % a des conséquences visibles sur les spectres enregistrés en ce sens qu'il reste de très nombreux signaux résiduels. La meilleure méthode pour calibrer les impulsions 1H s'est avérée la recherche de valeur d'impulsion 1H qui annule parfaitement le signal d'un carbone secondaire connu en utilisant directement la séquence DEPT. On détermine ainsi la valeur du $\pi/2$.

. Il faut évidemment changer toutes les valeurs des impulsions protons intervenant dans la séquence en fonction de la valeur testée. Cette méthode également proposée par Doddrell (115) en 1982 est maintenant communément utilisée pour la calibration des impulsions protons émises par le canal du découpleur.

Nous venons de préciser l'importance des différents paramètres intervenant dans la séquence DEPT sur la qualité des spectres spécifiques CH, CH₂ et CH₃. Pour tous les spectres que nous publions nous avons modifié le programme DEPT proposé par le constructeur : nous enchaînons l'expérience DEPT pour les trois valeurs de θ nécessaires ($\pi/4$, $\pi/2$, $3\pi/4$) avec un nombre de 64 accumulations pour la valeur $\pi/2$, et 32 pour les valeurs $\pi/4$ et $3\pi/4$. Cet enchaînement est bouclé n fois. Les problèmes d'homogénéité du champ B_0 , les variations de température sont ainsi moyennées sur les 3 spectres de base, et les spectres CH, CH₂ et CH₃ sont calculés sans aucun problème.

Les spectres obtenus sont d'une très bonne qualité comme on peut le voir sur la figure 16 pour la lignine MWL de peuplier, ils ne présentent aucun signal résiduel. La qualité de ces spectres rend même les signaux de faible intensité significatifs.

Pour convaincre le lecteur des possibilités des expériences DEPT, nous montrons (figure 19) les informations apportées par l'expérience DEPT au niveau de l'attribution des signaux dans le cas de spectres aussi complexes et mal résolus que ceux de substances humiques que nous avons été amenés à étudier au niveau RMN (130).

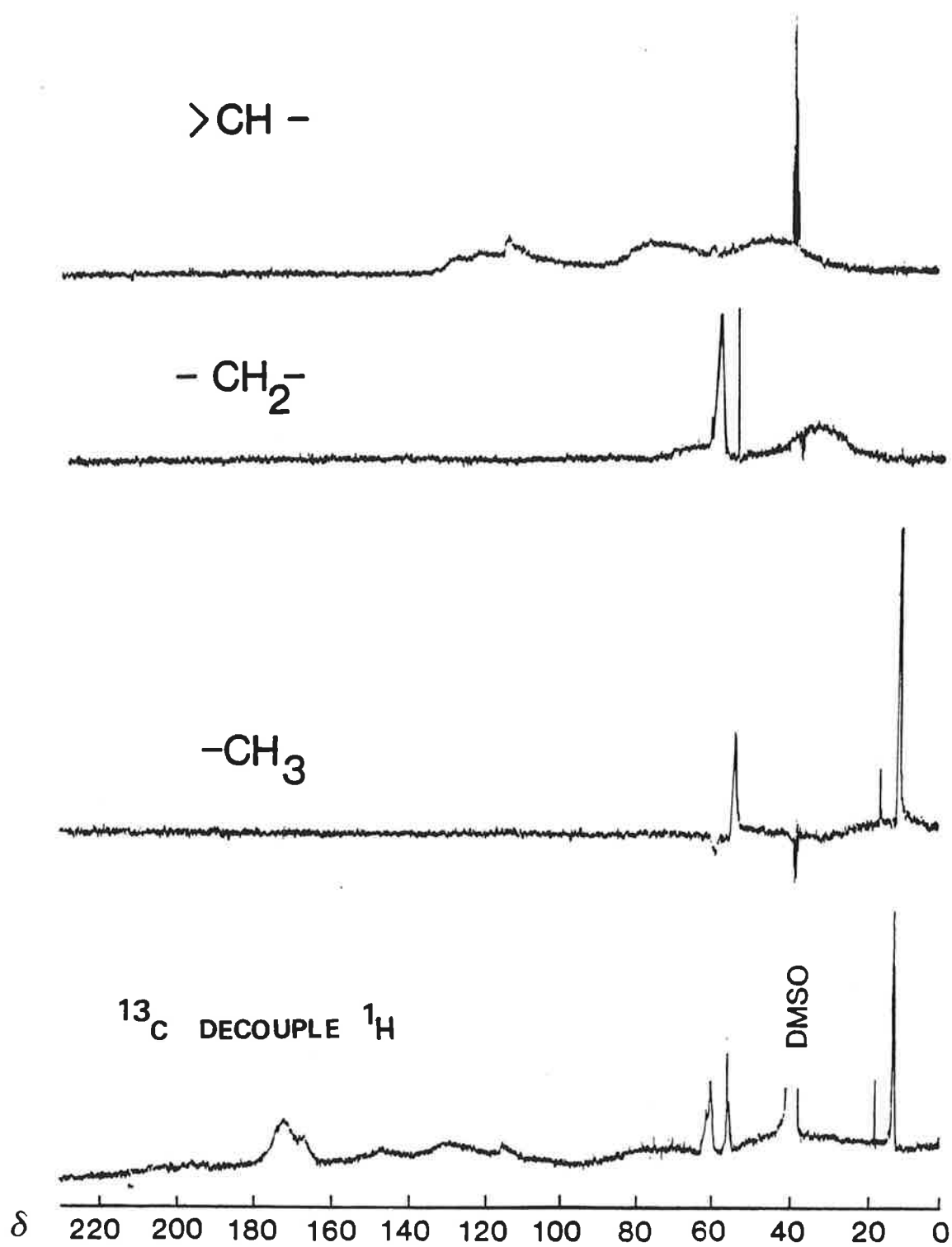


Figure 19 : Substances humiques, spectres spécifiques CH, CH₂ et CH₃ enregistrés avec la séquence DEPT et spectre total découplé des protons.

II.22 Les spectres CH, CH₂ et CH₃ enregistrés avec les séquences DEPT sont-ils quantitatifs ?

Dans l'expérience DEPT les intensités des signaux ^{13}C sont exaltées par le transfert d'aimantation des spins ^1H vers les ^{13}C (Fig. 3). L'efficacité de ce transfert dépend alors de la valeur moyenne de la constante de couplage choisie $^1\text{J } ^{13}\text{C}-^1\text{H}$ et du retour à l'équilibre de toutes les aimantations protons au début de chaque expérience. En se basant sur l'analyse théorique de Bendall et Pegg (115) et sur la détermination des temps de relaxation longitudinale des protons $T_{1\text{H}}$, il est facile d'optimiser ces deux paramètres :

- en attendant $5 T_{1\text{H}}$ entre chaque nouvelle expérience, on obtient une relaxation complète des ^1H et également celle des ^{13}C observés. Compte tenu de l'étude des $T_{1\text{C}}$ et $T_{1\text{H}}$ nous avons choisi de répéter l'expérience DEPT toutes les 3 secondes,

- en choisissant astucieusement la valeur moyenne de $^1\text{J } ^{13}\text{C}-^1\text{H}$, on évite des erreurs trop importantes entre les intensités de CH, CH₂ et CH₃. En choisissant par exemple 130 Hz, on obtient des variations d'intensités inférieures à 4 %, par rapport aux valeurs obtenues pour $J = 150 \text{ Hz}$.

Moyennant ces précautions, on peut donc envisager d'enregistrer les spectres sélectifs CH, CH₂ et CH₃ de manière quantitative. Pour le démontrer, nous avons choisi une méthode pragmatique en comparant les spectres sélectifs obtenus par le DEPT et le spectre total enregistré de manière quantitative avec la séquence "CI". La comparaison s'effectue à l'aide du calculateur (Aspect 2000) du spectromètre en établissant la combinaison linéaire suivante :

$$\text{Spectre total} - a (\text{spectre CH}_1 + \text{spectre CH}_2 + \text{Spectre CH}_3)$$

Si les signaux des spectres enregistrés par l'expérience DEPT sont quantitatifs, les signaux correspondants sur le spectre CI doivent s'annuler pour une valeur précise de "a" qui dépend du nombre d'accumulations dans chacune des expériences DEPT ou CI). Le point important de cette démonstration est de s'assurer que les spectres de lignines enregistrés avec la séquence CI sont effectivement quantitatifs.

II.221 Vérification de la quantitativité des spectres RMN ^{13}C avec la séquence CI

Cette vérification se fait selon une méthode mise au point par D. Robert (109) : on compare pour l'échantillon de lignine analysé, la masse de carbone en solution déterminée à partir de l'analyse élémentaire et celle calculée à partir de l'intégrale totale des signaux du spectre ^{13}C étalonnée par rapport à l'intégrale des signaux ^{13}C d'une référence ajoutée (tétraméthylthiourée). D. Robert trouvait un accord à 6 % pour des lignines MWL de peuplier et bouleau. C'est également un accord de même ordre que nous trouvons pour une lignine artificielle (DHP) et une lignine extraite de bois traité par autohydrolyse rapide (tableau 5).

Tableau 5 : Vérification de la quantitativité des signaux en RMN ^{13}C enregistrés avec l'expérience CI

	Polymère artificiel DHP	^a Lignines de bois traité par auto- hydrolyse rapide
Masse de l'échantillon mis en solution	400 mg	500 mg
% de carbone (microanalyse)	61,4%	61,4%
Masse (Mr) de carbone mis en solution	246 mg	307 mg
Masse (m) de TMTU mis en solu- tion (masse moléculaire 132,2 g)	20 mg	48,6 mg
Aire totale (A) des signaux ^{13}C de la lignine	2816	297,15
Aire (R) du signal C=O du TMTU	157	4,625
Masse de carbone M_C de la lignine déduite des intégrales $M_C = \frac{A}{R} \times 12/132,2 \times m$	260 mg	316 mg
$M = (M_r - M_C)/M_r \times 100$	6 %	3 %

a) extraite du bois traité n° 3 (40 bars, 45 s) par l'acétone, et précipitée dans l'éther éthylique (voir § III.14 et III.15).

L'inconvénient de cette méthode provient des T_{1C} très longs (8 s pour le CH_3) de la référence qui conduisent alors à des temps d'attente entre deux impulsions d'au moins 40 s. Ceci exige alors des durées d'expérience très longues si l'on veut obtenir des spectres RMN ayant un

rapport signal sur bruit convenable. C'est pourquoi nous effectuons cette vérification uniquement lorsque l'étude d'un nouveau type de lignine est abordée. Les spectres RMN¹³ C enregistrés avec la séquence CI des lignines MWL, DHP et extraites de bois par autohydrolyse rapide sont donc tout à fait quantitatifs et peuvent être utilisés comme référence.

II.222 Mise en évidence de la quantitativité des spectres CH, CH₂ et CH₃ enregistrés par l'expérience DEPT.

A partir de la lignine MWL de peuplier, nous avons donc effectué la différence entre le spectre total quantitatif et la somme des différents spectres CH, CH₂ et CH₃ obtenus par l'expérience DEPT. Le spectre différence (figure 20) montre l'annulation de tous les signaux des carbones tertiaires, secondaires et primaires et démontre ainsi la quantitativité de l'expérience DEPT.

Bendall et Pegg (115) ont proposé une séquence QUAT pour enregistrer uniquement les signaux des carbones quaternaires. Le spectre obtenu par différence et le spectre enregistré avec la séquence QUAT sont identiques (figure 20c, d). Nous démontrons ainsi que les signaux du spectre obtenu par différence donnent rigoureusement le spectre d'absorption des carbones quaternaires.

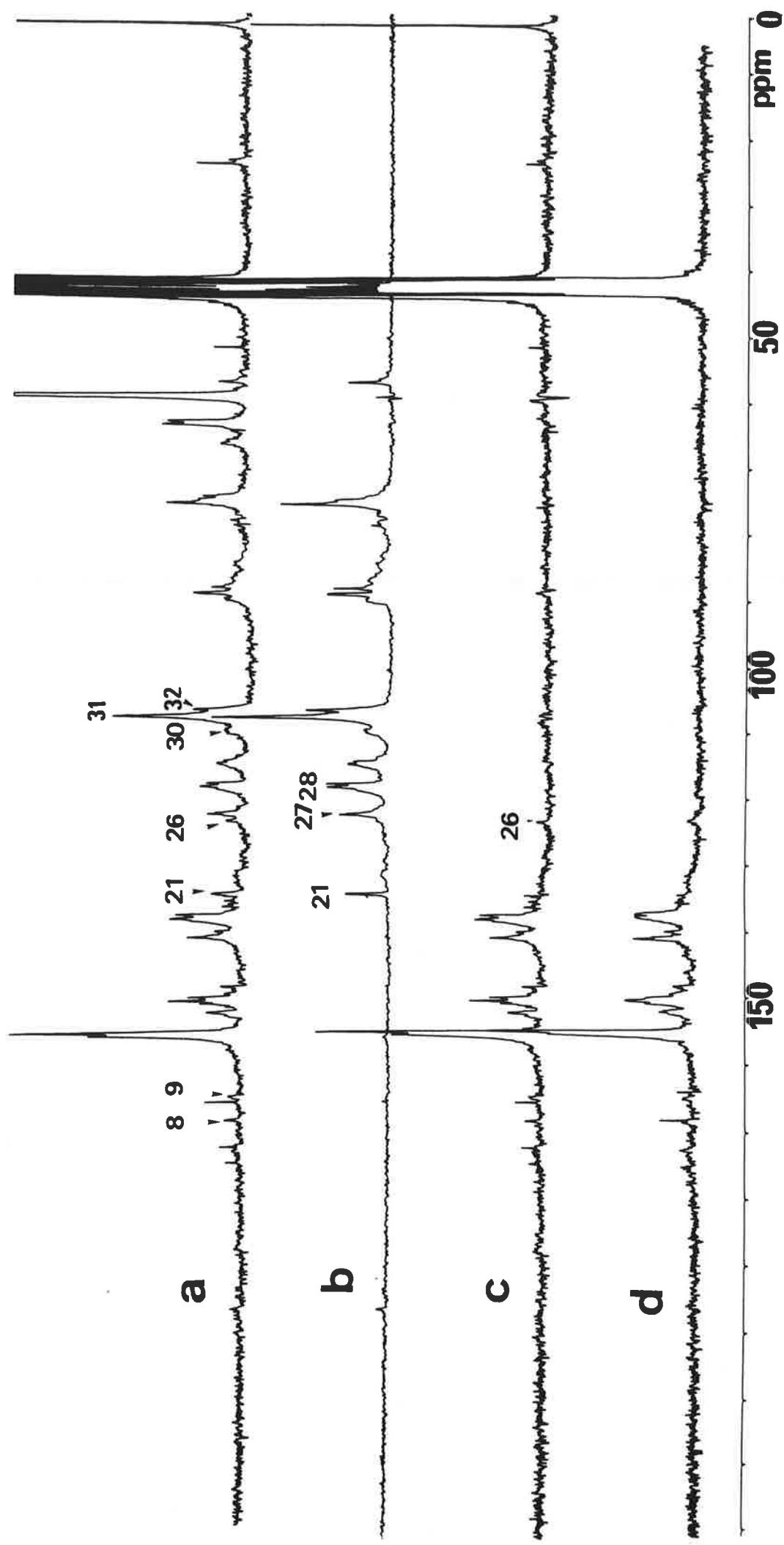


Figure 20 : Quantitativité des signaux ^{13}C de la lignine MWL de peuplier enregistrés avec l'expérience DEPT ; a) spectre total enregistré avec la séquence CI ; b) spectre CH obtenu avec l'expérience DEPT ; c) spectre obtenu par différence entre le spectre CI et le spectre somme des trois spectres DEPT (CH, CH₂ et CH₃) ; d) spectre des carbonates quaternaires enregistré avec la séquence QUAT.

II.223 Généralisation

Nous avons montré dans l'étude précédente qu'en optimisant certains des paramètres de l'expérience DEPT, les signaux des spectres spécifiques CH, CH₂ et CH₃ d'une lignine MWL de peuplier étaient quantitatifs.

En suivant la même méthode, nous avons enregistré les différents spectres CI, DEPT et QUAT d'une lignine MWL de sapin (figure 21) et d'une lignine synthétisée à partir d'alcool coniférylique, le DHP (figure 22). Comme le montrent les spectres résultant des différences entre le spectre CI et les sommes des spectres DEPT, les signaux des spectres DEPT sont tout à fait quantitatifs.

De la même manière, les signaux DEPT d'une lignine industrielle extraite de bois traité par autohydrolyse rapide (cf. § III.32) sont quantitatifs. Récemment nous avons également montré que les spectres DEPT des dérivés sulfonés de ces mêmes lignines sont quantitatifs (131).

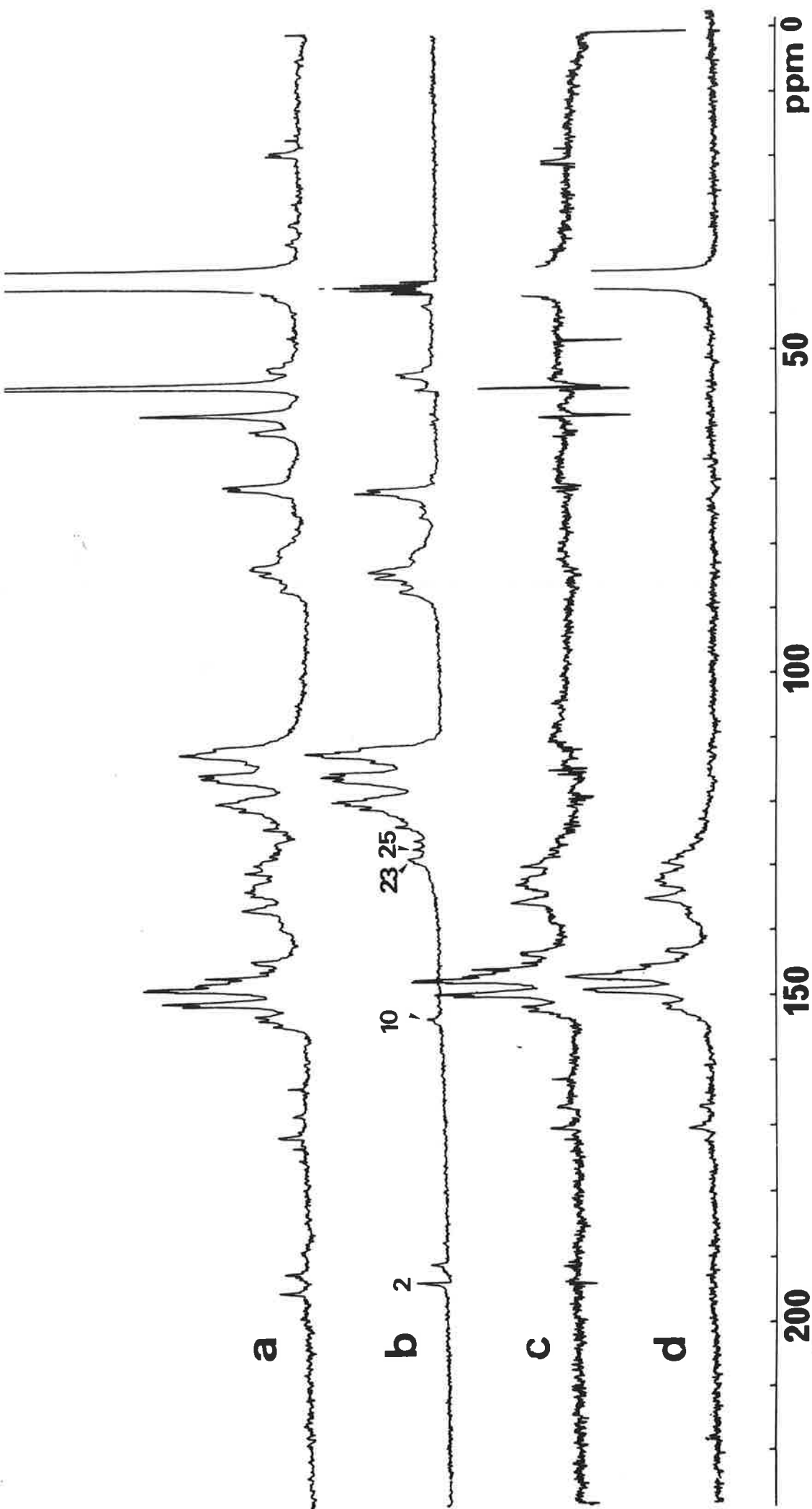


Figure 21 : Quantitativité des signaux ^{13}C de la lignine MWL de sapin enregistrés avec l'expérience DEPT ; a) spectre total enregistré avec la séquence CI ; b) spectre CH obtenu avec l'expérience DEPT ; c) spectre obtenu par différence entre le spectre CI et le spectre somme des trois spectres DEPT (CH, CH₂ et CH₃) ; d) spectre des carbones quaternaires enregistré avec la séquence QUAT

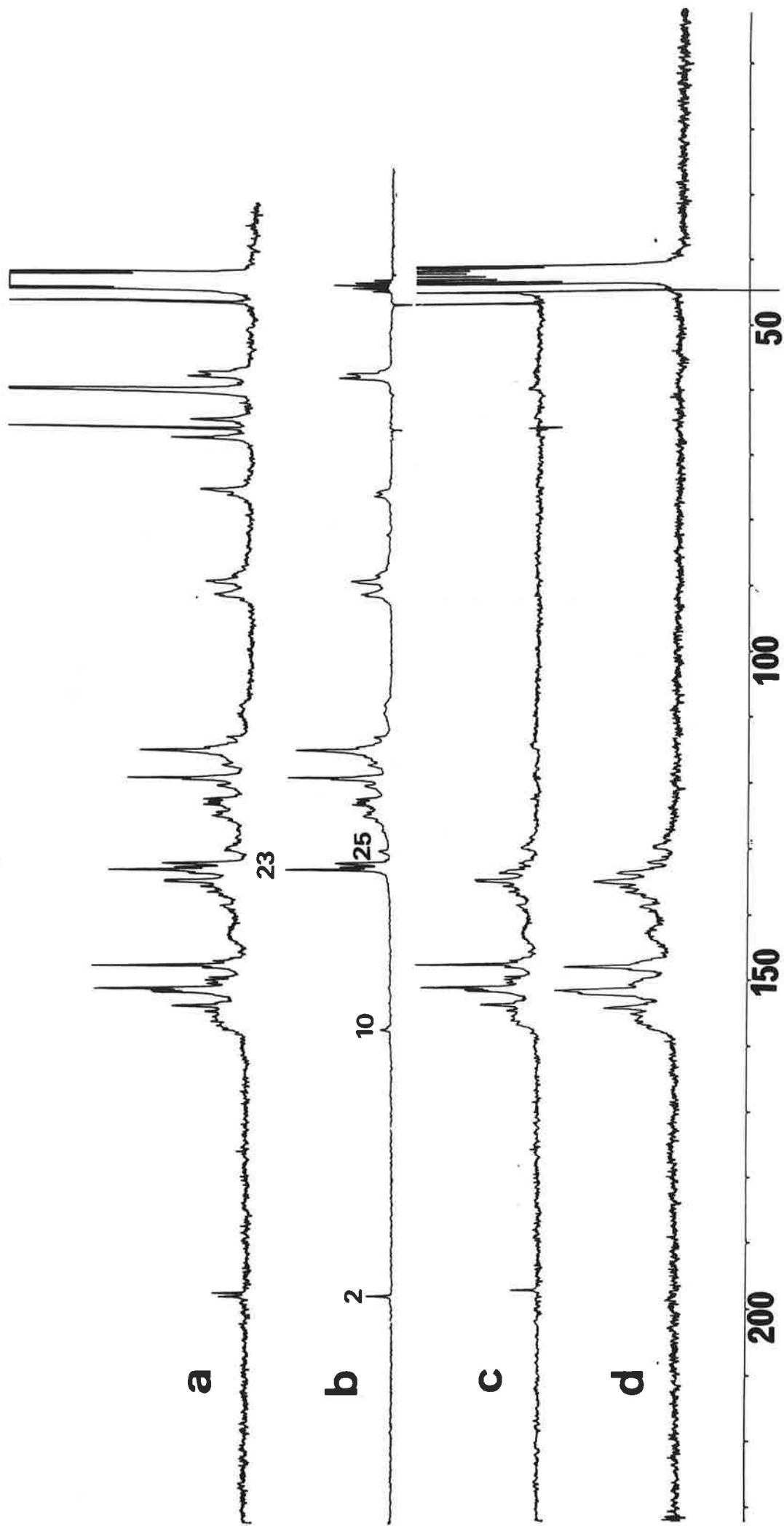


Figure 22 : Quantitativité des signaux ^{13}C du polymère artificiel (DHP) enregistrés avec l'expérience DEPT : a) spectre total enregistré avec la séquence CI ; b) spectre CH obtenu avec l'expérience DEPT ; c) spectre obtenu par différence entre le spectre CI et le spectre somme des trois spectres DEPT (CH , CH_2 et CH_3) ; d) spectre des carbones quaternaires enregistré avec la séquence QUAT

II.224 Etude du rapport signal sur bruit des spectres enregistrés avec la séquence DEPT

Pour compléter cette présentation de l'expérience DEPT appliquée à l'étude des lignines, nous devons souligner l'excellent rapport signal sur bruit des spectres enregistrés avec la séquence DEPT qui demeure même lorsque l'on utilise des conditions permettant l'exploitation quantitative des spectres.

Pour illustrer cet aspect, nous pouvons, pour la lignine de peuplier (Fig. 20), comparer le rapport signal sur bruit du massif 30 à 32 des carbones aromatiques tertiaires attribués aux carbones C-2 et C-6 des unités syringyles sur les spectres enregistrés avec l'expérience CI et DEPT. Sur le spectre CI ce signal a un rapport signal sur bruit $r_1 = 11,7$ pour 9372 accumulations.

Le rapport signal sur bruit r_2 de ce même signal sur le spectre CH est de 35,2. Le spectre CH étant obtenu par combinaison linéaire des 3 spectres de bases, il est impossible d'exprimer ce rapport pour une accumulation. En revanche, on peut exprimer le rapport r_1 pour une durée d'expérience équivalente à la durée totale de l'expérience DEPT, soit 15000 accumulations à raison d'un temps d'attente de 3,7 secondes, c'est-à-dire 55.500 secondes. Le temps d'attente dans l'expérience CI est de 12,7 secondes. Le rapport signal sur bruit peut être ainsi calculé $r'_1 = \sqrt{\frac{55.500}{109.652}} \times 11,7 = 8,3$.

On obtient ainsi un rapport $r_2/r'_1 = 4,2$.

Ainsi pour un temps d'expérience équivalent le rapport signal sur bruit de spectres DEPT est 4,2 fois meilleur que pour le spectre CI.

Si l'on considère toujours le même massif 30 à 32, le rapport signal sur bruit est 3,1 fois plus grand sur le spectre de base obtenu par l'expérience DEPT pour $\Theta = \pi/4$ (Fig. 15) que le spectre CI. En revanche si l'on compare ces rapports pour des durées d'expérience équivalentes le rapport obtenu sur le spectre de base est 5,7 fois plus grand que celui du spectre CI.

II.23 Autres méthodes pour séparer les signaux suivant le nombre de protons portés par les carbones

L'expérience de modulation des intensités des signaux en fonction des constantes de couplages $^1J \text{ } ^{13}\text{C}-^1\text{H}$, séquence JMOD, a été proposée par différents auteurs. Un seul exemple d'application pour l'étude des lignines apparaît dans la littérature, il a été développé par C. Lapierre et collaborateurs (132).

Nous présentons les spectres obtenus avec cette séquence JMOD pour une lignine MWL de peuplier enrichie en ^{13}C . C'est également de ce même bois de départ que C. Lapierre et coll. ont extrait leurs échantillons de lignines.

Le spectre de la figure 9 obtenu pour $D_2 = 1/J$ donne tous les signaux CH et CH_3 positifs tandis que les signaux des carbones quaternaires et secondaires sont négatifs. Pour $D_2 = 1/2J$, on obtient le spectre des signaux de carbones quaternaires uniquement.

Cette séquence est d'une mise en oeuvre facile puisqu'elle ne fait intervenir que des impulsions de 90° ou 180° sur les carbones treize, évitant ainsi le problème de calibrage des impulsions sur les ^1H . Elle présente pourtant trois inconvénients majeurs :

1) Variations des intensités suivant le type des carbones et sensibilité aux variations des constantes de couplage. Les auteurs ont montré que l'intensité des différents signaux obtenus par la séquence JMOD diffèrent suivant le type de carbones. En effet, si le signal d'un carbone primaire est d'intensité 1 pour $D_2 = 1/2J$, celle d'un carbone secondaire est -0,8. L'expérience JMOD est très sensible aux variations du délai D_2 . Pour illustrer ce point, nous montrons l'effet des variations de $D_2 = 1/2J$ sur les spectres des signaux de carbones quaternaires (fig. 24) on obtient un spectre de bonne qualité, sur lequel les signaux résiduels de carbones CH, CH_2 ou CH_3 sont de faible intensité, pour une valeur précise de $D_1 = 3,25 \text{ ms}$. Dès que l'on s'écarte de cette valeur on constate que les signaux résiduels grandissent très rapidement.

C'est là une différence essentielle avec la séquence QUAT qui permet également d'observer uniquement les signaux des carbones

quaternaires. Les spectres enregistrés avec cette séquence (Figures 20d, 21d, 22d) sont identiques et sans aucun signal résiduel pour des valeurs de D_2 comprises entre 0,033 et 0,037 s. C'est pourquoi nous avons choisi pour nos études la séquence QUAT.

2) La séquence JMOD ne fait intervenir aucun transfert de polarisation et les spectres ne présentent aucune exaltation de l'intensité des signaux par rapport à une expérience classique de RMN.

3) Mise à part une possibilité d'enregistrer le spectre spécifique des carbones quaternaires, les signaux des carbones tertiaires, secondaires et primaires ne sont pas obtenus sur des spectres différents. Nous ne pouvons pas séparer ainsi deux signaux superposés de carbones de type différent. De plus le déphasage entre les signaux rend leurs intégrations très difficiles. De toute façon, le développement quantitatif de ce type d'expérience ne peut être que très limité du fait des modifications d'intensité qu'elle entraîne.

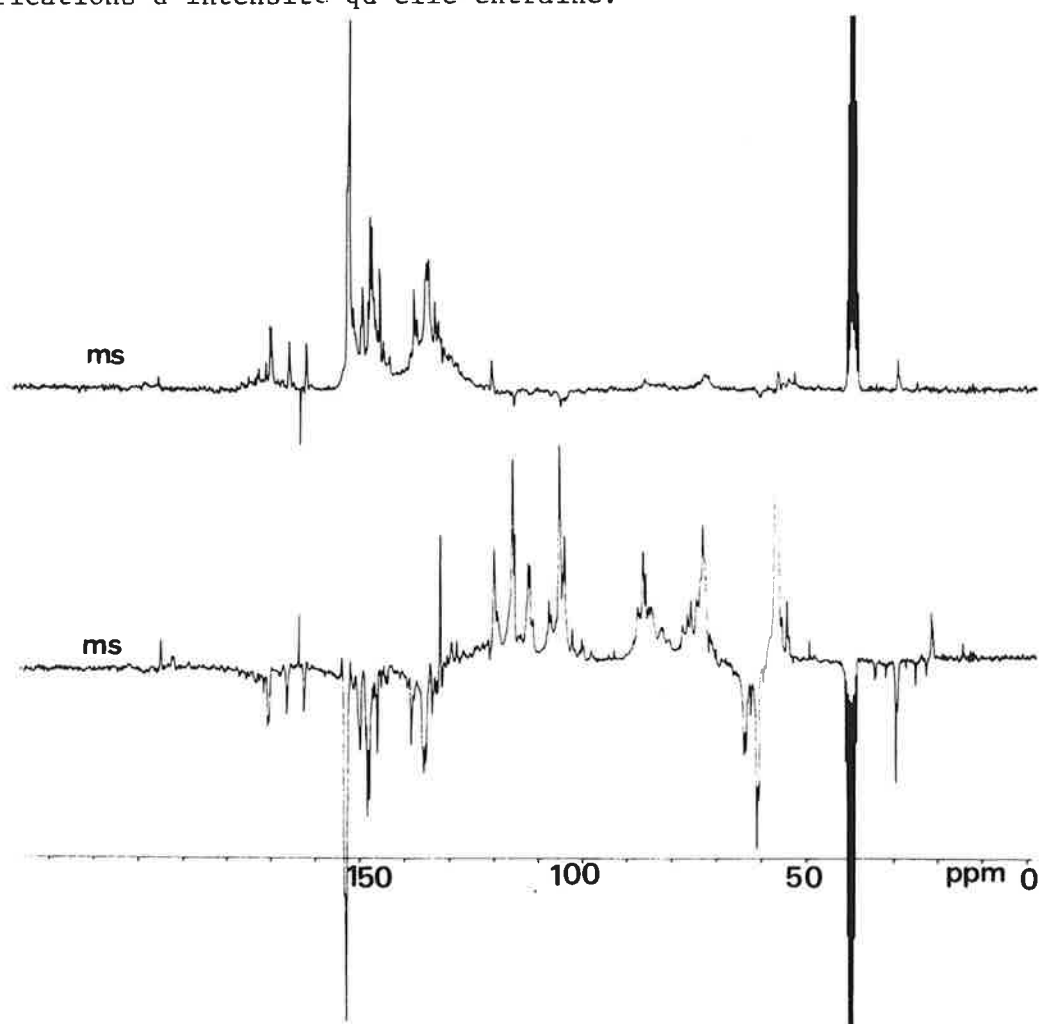


Figure 23 : Attribution des signaux d'une lignine MWL de bois de peuplier, enrichi en ^{13}C , avec l'expérience JMOD

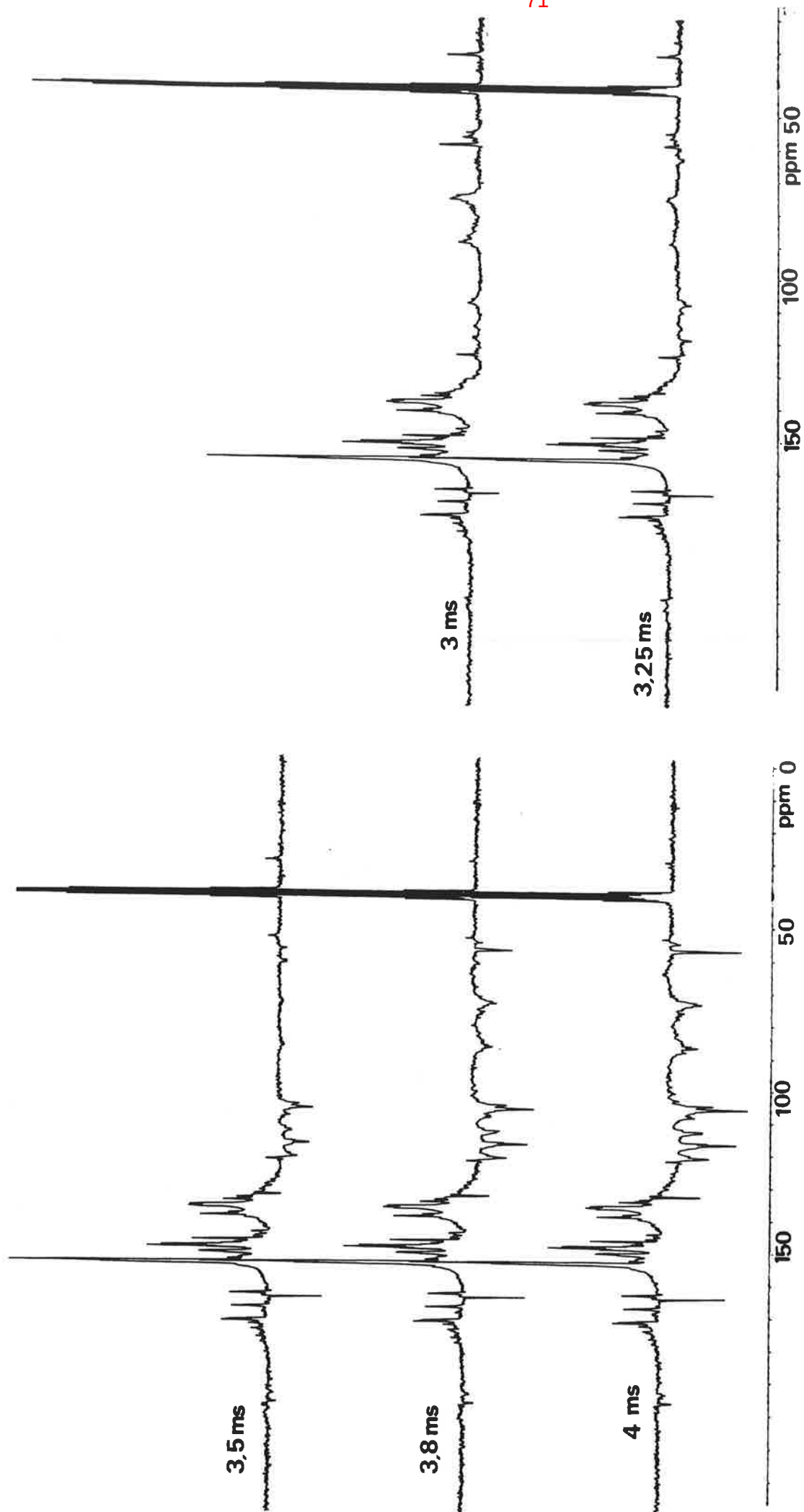


Figure 24 : Influence des variations de D2 sur la qualité des spectres des carbones quaternaires enregistrés avec la séquence JMOD ; illustration sur une lignine de bois de peuplier enrichi en ^{13}C .

II.3 APPORTS DES EXPERIENCES DEPT DANS L'ANALYSE STRUCTURALE PAR RMN DE LIGNINES NATURELLES (MWL) ET ARTIFICIELLES (DHP)

Dans ce chapitre, nous présentons les apports de l'expérience DEPT dans l'analyse structurale des lignines par rapport à la démarche classique pour interpréter les spectres de RMN ^{13}C de lignines, fondée uniquement sur la comparaison des déplacements chimiques des lignines étudiées avec ceux des composés modèles. La démarche classique du fait de l'éventail des structures rencontrées dans les lignines conduit à certaines ambiguïtés dans l'attribution des signaux des spectres RMN.

Nous présenterons enfin quelques exemples d'exploitation quantitative des informations obtenues par les expériences DEPT.

II.3.1 Choix des lignines étudiées

Pour cette étude, nous avons choisi 3 lignines naturelles MWL extraites selon le protocole de Björkman des bois de sapin, de bouleau, de peuplier et une lignine artificielle (DHP) synthétisée à partir d'alcool coniférylique.

Au niveau structural, ces lignines correspondent à une série de complexité croissante : DHP, MWL de sapin, MWL de bouleau, MWL de peuplier. Le DHP représente, en effet, un modèle de lignine gaiacyle bien défini en ce sens que c'est un polymère constitué strictement d'enchaînements phénylpropanoïques avec un seul groupement méthoxylique par unité aromatique. Le mode de polymérisation radicalaire étant bien établi, les principales structures possibles dans un DHP sont connues (fig. 4). Le DHP que nous avons synthétisé peut donc être comparé à la lignine MWL de sapin qui est, elle aussi constituée uniquement d'unités gaiacyles. Les lignines MWL de bouleau et de peuplier représentent des exemples d'une complexité structurale supérieure puisqu'aux unités gaiacyles se superposent les unités syringyles qui entraînent des déplacements chimiques supplémentaires. La lignine MWL de peuplier contient en plus des unités parahydroxybenzoïques. Le DHP du fait de l'unicité de son précurseur peut être un bon exemple pour illustrer l'intérêt d'une exploitation quantitative complète des spectres enregistrés par les expériences DEPT.

En effet, l'unicité du monomère de départ écarte une des causes d'hétérogénéité dans les déplacements chimiques due à la diversité des monomères constitutifs et simplifie l'interprétation des signaux.

Ainsi si l'on considère un signal caractéristique d'une structure donnée, l'intégration est généralement beaucoup plus délicate dans le cas des spectres lignines MWL où de nombreux signaux peuvent masquer la base du signal considéré. Cela est net si l'on considère les différents signaux des spectres CH_2 entre 58 et 62 ppm (fig. 26). La détermination d'une intégrale représentative d'une structure précise présente plus d'incertitude dans le cas des lignines MWL.

II.32 Rappels de quelques conditions expérimentales

II.321 Expériences utilisées

Les spectres CH , CH_2 et CH_3 ont été enregistrés avec la séquence DEPT de manière à obtenir des spectres quantitatifs en utilisant les conditions établies au chapitre précédent. Les spectres totaux ont été enregistrés avec la séquence CI. Toutes ces expériences ont été faites sur le même spectromètre (Bruker WM 200) en utilisant des conditions d'enregistrement identiques (solvant, concentration, température, largeur spectrale, valeurs des porteuses, résolution digitale, ...), ce qui légitime une comparaison directe des spectres entre eux. Pour cela nous avons utilisé au maximum les possibilités du calculateur Aspect - 2000 qui permet entre autre de superposer deux spectres sur l'écran cathodique. On peut alors comparer et combiner de manière très précise différents spectres entre eux.

II.322 Exploitation quantitative des spectres

Si l'on peut comparer directement les intégrales des spectres CH , CH_2 et CH_3 enregistrés par l'expérience DEPT pour une lignine donnée, la comparaison avec celles des spectres totaux quantitatifs enregistrés avec la séquence CI demande une normalisation. Pour ce faire, on prend comme référence l'aire des signaux entre 125 et 100 ppm qui est

uniquement due à des carbones aromatiques tertiaires. On peut de cette manière normaliser les aires mesurées sur les spectres enregistrés par l'expérience DEPT par rapport à celles mesurées sur les spectres totaux enregistrés avec l'expérience CI.

II.33 Résultats qualitatifs

II.331 Région des signaux entre 100 et 158 ppm

Les études de composés modèles (98 à 104) montrent toutes que cette région est largement dominée par les absorptions des carbones aromatiques. L'expérience DEPT permet de bien distinguer les carbones tertiaires des carbones quaternaires. Nous pouvons alors précisément déterminer la limite des carbones tertiaires au niveau des signaux des carbones aromatiques :

- 129,7 ppm pour le DHP (fig. 22b)
- 132 ppm pour la lignine MWL de sapin (fig. 21b)
- 131,6 ppm pour la lignine MWL de peuplier (fig. 20b)
- 129,4 ppm pour la lignine MWL de bouleau (fig. 25d)

Au-delà de ces limites, à champ faible, les signaux sont donc typiquement dus aux carbones quaternaires, excepté le signal n° 10 à 152,6 ppm facilement repérable sur les spectres CH du DHP et de la lignine MWL de sapin (fig. 21b). Ce signal est attribué au carbone C- α des structures cinnamaldehydes. La présence de ces structures est alors confirmée par les signaux n° 25 à 126,3 ppm et n° 2 à 194 ppm attribués respectivement à leurs carbones C- β et C- γ de ces mêmes structures. La présence de ces 3 signaux sur un spectre CH enregistré avec l'expérience DEPT est un moyen rapide de mettre en évidence des structures cinnamaldehydes dans des échantillons de lignines.

Pour étudier les recouvrements entre les signaux des carbones tertiaires et quaternaires dans cette région, on peut se reporter aux spectres ne donnant que les signaux des carbones quaternaires obtenus par des différences de spectres ou enregistrés avec la séquence spécifique QUAT.

Dans le cas des lignines MWL de peuplier (fig. 20) et de bouleau (fig. 25d) les signaux des carbones quaternaires et tertiaires ne se recouvrent pas. Ainsi, à partir d'un spectre classique on peut facilement distinguer les différents types de carbones aromatiques.

En revanche, dans le polymère artificiel (fig. 22) et la lignine de sapin (fig. 21) les signaux se recouvrent partiellement, entre 129 et 126 ppm.

Dans le DHP le recouvrement est dû aux trois signaux n° 23 très intenses à 129,3, 128,9 et 128,3 ppm, facilement attribuables aux carbones aliphatiques C- α et C- β de l'alcool coniférylique (133). Ces absorptions existent également dans le spectre CH de la lignine de sapin, mais sont nettement moins intenses et donnent un massif élargi. Ces signaux sont pratiquement inexistants dans les lignines de peuplier et de bouleau.

Sur le spectre CH (fig. 20b) de la lignine MWL de peuplier on repère très facilement le signal n° 21 des carbones C-2 et C-6 des unités parahydroxybenzoïques. Ce signal qui apparaît normalement dans un massif de signaux de carbones quaternaires (fig. 20a) est parfaitement isolé par l'expérience DEPT. Sur ce même spectre CH on repère alors le signal 28 carbones C-3 et C-5 correspondant. Si l'on se reporte aux spectres ne donnant que les carbones quaternaires (fig. 20cd) on observe le signal 26 à 121,5 ppm absent du spectre CH et attribué au carbone C-1 de ces unités.

Les signaux n° 8 et n° 9 à 165,1 et 162 ppm dus à des carbones quaternaires (fig. 20c, d) sont alors attribués aux carbones C- α et C-4 de ces unités.

Nous avons enregistré dans les mêmes conditions les spectres de l'acide parahydroxybenzoïque et de son ester éthylique. Les déplacements chimiques en ppm de ces molécules, sont les suivants :

	CH ₃	CH ₂	C- α	C-1	C-2 et C-6	C-3 et C-5	C-4
acide	-	-	167,3	121,5	131,6	115	161,7
ester	14,3	60	165,7	121	131,4	115,4	162

Le signal n° 8 correspond donc au carbone de la fonction carbonyle des esters parahydroxybenzoïques. Les unités parahydroxybenzoïques sont donc liées au polymère par des liaisons esters. Ce résultat est tout à fait en accord avec les résultats de D. Smith (134) et ceux de C. Lapierre (135).

Ces signaux sont absents des autres lignines étudiées et constituent la seule différence repérable en RMN¹³C entre les lignines MWL de peuplier et de bouleau.

Sur les spectres CH entre 110 ppm et 120 ppm les 4 lignines présentent des absorptions très similaires réparties en 3 massifs de signaux attribués dans la littérature respectivement aux carbones C-6, C-5 et C-2 des unités gaiacyles incluses dans les différentes structures possibles. Le massif entre 100 et 110 ppm, est dû aux absorptions carbones C-2 et C-6 dans des unités syringyles également incluses dans les différents types de structures. Compte tenu de l'absence d'unités syringyles des lignines MWL de sapin ces absorptions manquent sur le spectre CH de cette lignine. En revanche le DHP que nous avons synthétisé présente un massif large, de faible intensité dans cette région. Ce massif repérable sur le spectre CH enregistré avec l'expérience DEPT du fait de l'augmentation de sensibilité semble tout à fait général : on la retrouve sur les spectres des DHP synthétisés par O. Faix (136) et aussi sur les spectres publiés par Nimz. Malgré l'absence des composés modèles correspondants, nous avons attribué ces signaux aux carbones C-2/C-6 lorsque le carbone C-5 est substitué par un groupe -OR. L'étude quantitative nous permettra d'appuyer cette attribution.

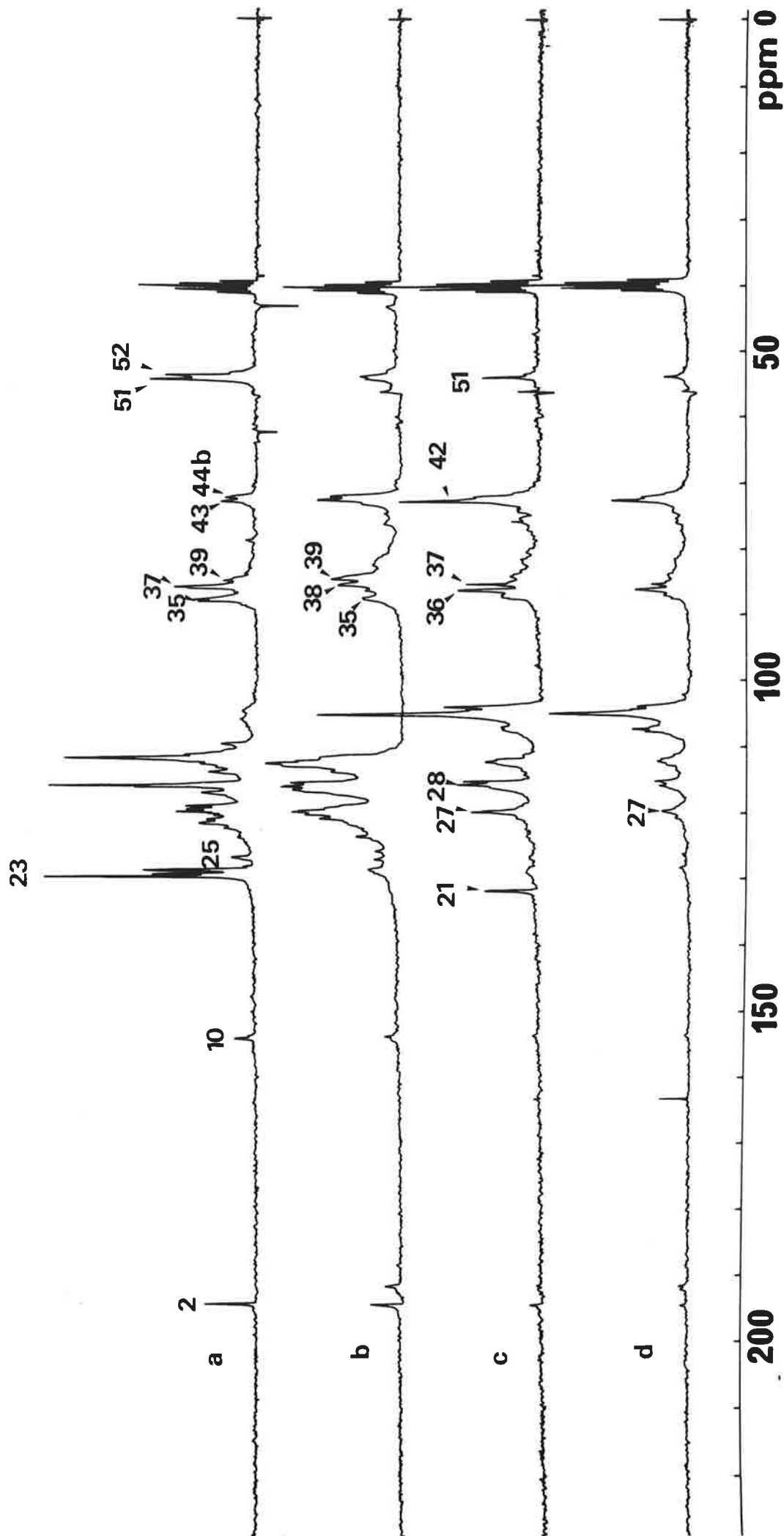


Figure 25 : Spectres des carbones CH de différentes lignines enregistrées avec l'expérience DEPT : a) lignine artificielle obtenue par polymérisation l'alcool coniférylique ; b) lignine MWL de sapin ; c) lignine MWL de peuplier ; d) lignine MWL de bouleau ;

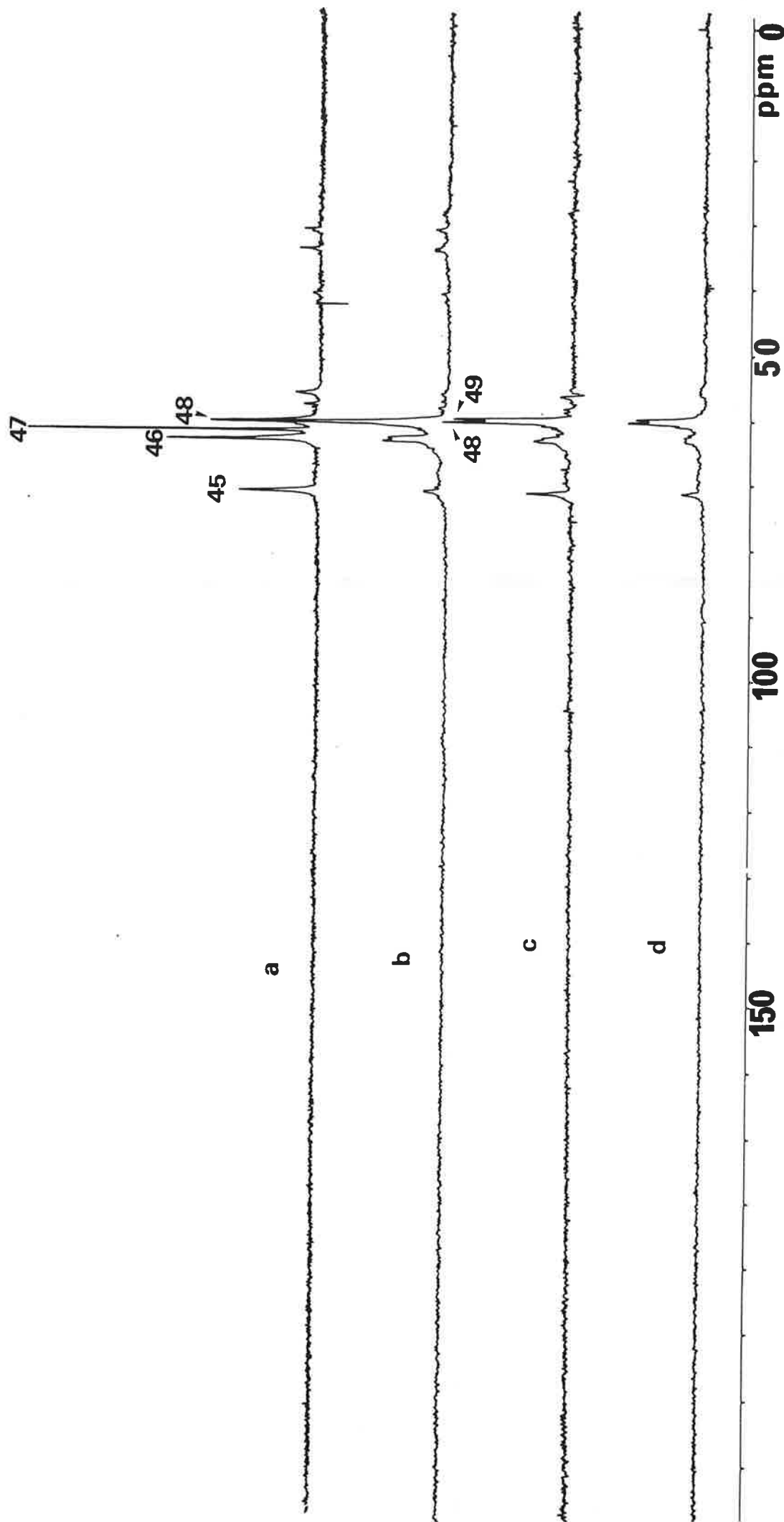


Figure 26 : Spectre des carbones CH_2 de différentes lignines enregistrées avec l'expérience DEPT : a) Lignine artificielle obtenue par polymérisation l'alcool coniférylique (DHP) ; b) lignine MWL de sapin ; c) lignine MWL de peuplier ; d) lignine MWL de bouleau ;

II.332 Région des signaux entre 100 et 50 ppm

Dans cette région spectrale les absorptions sont classiquement attribuées aux différents carbones de maillon propane liés généralement à des oxygènes et aux carbones des groupements méthoxyles. Les spectres spécifiques enregistrés par l'expérience DEPT améliore l'analyse des spectres et leur comparaison :

- les signaux CH entre 73 et 72 ppm, ne sont plus masqués par le signal d'un CH₂,
- les signaux n° 51 et 52 sont parfaitement observables par la suppression du signal des carbones des méthoxyles,
- la région CH entre 70 et 56 ppm masquée normalement par les absorptions de carbones CH₂ et CH₃ devient parfaitement observable.

II.3321 Etudes des principales structures du DHP

Pour le DHP que nous avons synthétisé à partir d'alcool coniférylique, quatre structures principales sont attendues d'après la littérature (fig. 4) :

- aryl-alkyl éther β-0-4
- phénylcoumarane β-5
- pinorésinol β-β
- alkyl-aryl β-1

Dans le tableau 6, nous donnons les déplacements chimiques de composés modèles possédant de telles structures. On repère alors sur le spectre CH du DHP les signaux de ces différentes structures.

TABLEAU 6 : Déplacements chimiques des carbones aliphatiques des principales structures des lignines

	C - α	C - β	C - γ
Structure β -0-4 série galacyle (a)			
forme thréo	71,6	85	60,5
forme érythro	72,2	84	
Structure β -0-4 série syringyle (b)	71,8	87,9	60,3
Structure β -1 (c)	72,6	55,1	62,8
Structure phénylcoumarane (d)	87	53,4	63,2
Structure β - β (e)	85,5	53,8	71,2

(a) : composé synthésé au laboratoire (§ III)

(b) : fourni par M. Hauteville (Lyon) : (hydroxy-4 diméthoxy-3,5 phenyl)-1 (diméthoxy-2,6 hydroxyméthyl-4 phenoxy)-2 propanediol 1,3

(c) : fourni par H.H. Nimz : di (hydroxy-4 methoxy-3 phenyl)-1,2 propanediol-1

(d) : fourni par H.H. Nimz,

(e) : pinorésinol et syringanerinol fournis par G. Gellersdet et K. Lundquist.

A champ fort les deux signaux n° 52 et n° 51 à 53,17 et 53,7 ppm d'intensité équivalente sont attribuables respectivement aux carbones C- β des structures phénylcoumarane et pinorésinol. La présence de ces deux structures est confirmée par l'observation des signaux de leur carbone C- γ spectre CH₂ (fig. 26a) :

- le signal n° 46 à 63,3 ppm des unités phénylcoumarane,

- le signal n° 45 à 71,3 ppm des unités pinorésinol.

Sur un spectre RMN classique il était jusqu'alors impossible d'observer les deux signaux 43 et 44b à 72,16 et 71,8 ppm puisqu'ils étaient masqués en partie par le signal n° 45 du carbone C- γ des structures pinorésinol.

On attribue sans problème ces deux signaux aux carbones C- α des deux formes diastéréoisomères des structures alkyl-aryl éther β -0-4. On peut estimer alors qu'elles sont présentes en quantité équivalente dans ce polymère. Sur le spectre CH_2 on observe un seul signal n° 48 à 60,36 ppm attribuable au carbone C- γ des deux formes diastéréoisomères de la structure β -0-4.

Le DHP présente une absorption n° 47 d'un carbone CH_2 à 61,74 ppm non repérable sur les spectres des autres lignines. Celle-ci est due au carbone C- γ des structures coniféryliques et confirme l'attribution des signaux n° 23 aux absorptions des carbones vinyliques C- α et C- β de ces structures.

L'observation du spectre CH montre que les signaux des structures pinorésinols et phénylcoumaranes ont des intensités nettement plus grandes que celle de la structure alkyl-aryl éther β -0-4. Sur la base des intensités des signaux et des déplacements chimiques donnés au tableau 6, on attribue facilement les deux signaux dominant le massif entre 80 et 90 ppm :

- le signal n° 37 à 85,3 ppm au carbone C- α des structures pino-résinol,
- le signal n° 35 à 88 ppm au carbone C- α des structures phénylcoumarane.

Le dédoublement observé pour le signal n° 35 n'a pas pu être expliqué sur la base de l'étude des composés modèles.

De par leur intensité plus faible les signaux n° 38 et 39 des carbones C- β des deux formes diastéréoisomères de la structure β -0-4 sont moins visibles : le signal correspond à la forme thréo, le signal 38 est en fait masqué par les signaux des carbones C- α des structures β - β .

Sur le spectre CH on ne distingue aucun signal entre 50 et 70 ppm. Cette constatation infirme la présence de structure β -1 dont le carbone C- β dans les composés modèles absorbe dans cette région. De même, le DHP ne présente pas d'absorption entre 55 et 48 ppm pouvant indiquer la

formation au cours de la polymérisation de structures épipinorésinol dont le carbone C- β ' absorberait à 49,4 ppm.

L'étude des spectres spécifiques enregistrés par l'expérience DEPT et notamment du spectre CH nous a permis de mettre en évidence les principales structures d'un DHP, décrites dans la littérature. L'exploitation quantitative développée au paragraphe II.342 permet de compléter cette étude.

II.3322 Etude des principales structures de la lignine MWL du sapin

En comparant le spectre CH de cette lignine avec celle du DHP, on retrouve les signaux n° 51 et 52 caractéristiques des carbones C- β structures β - β et β -5 et les signaux n° 38 et 39 des carbones C- α des formes diastéréoisomères des structures β -0-4. La présence de ces structures est confirmée par les signaux n° 45 et 46 du spectre CH₂. En revanche, il n'est pas possible de distinguer le signal des carbones C- γ des unités coniféryliques.

Si l'on retrouve exactement les mêmes signaux n° 51, 52, 43 et 44 sur les spectres CH de la lignine de sapin et du DHP, leurs intensités sont très différentes : Les structures β -0-4 minoritaires dans le DHP sont dominantes dans la lignine MWL de sapin. Cela explique tout à fait les différences dans la distribution des intensités des massifs CH entre 84 et 88 ppm alors que les déplacements chimiques sont identiques.

En ce qui concerne les structures β -1 et β - β épipinorésinol nous concluons à leur absence pour les raisons développées dans l'étude du DHP.

II.3323 Etude des principales structures de lignines MWL de bouleau et peuplier

Ces deux lignines ont des spectres CH et CH₂ parfaitement superposables dans cette région. Sur le spectre CH on retrouve les

signaux n° 51 et 52 dus aux carbones C- β des structures phénylcoumarane et pinorésinol.

Le signal n° 51 des structures pinorésinol est nettement plus intense que le signal n° 52 des structures phénylcoumarane. Il faut noter que l'on ne peut pas conclure si le signal n° 51 est dû aux structures pinorésinol ou syringarésinol.

Par rapport au DHP et à la lignine MWL de sapin la présence des unités syringyles devrait être visible au niveau des spectres CH et CH_2 des lignines MWL de peuplier et bouleau. On note effectivement un dédoublement du signal à 60 ppm sur le spectre CH_2 des carbones C- γ des structures β -0-4, et un signal n° 36 intense à 86,8 ppm dans la région des carbones C- α de ces mêmes structures. Mais ces deux signaux n° 36 et 49 ne correspondent pas aux déplacements chimiques du composé modèle syringyle (tableau 6) dont nous donnons les déplacements chimiques.

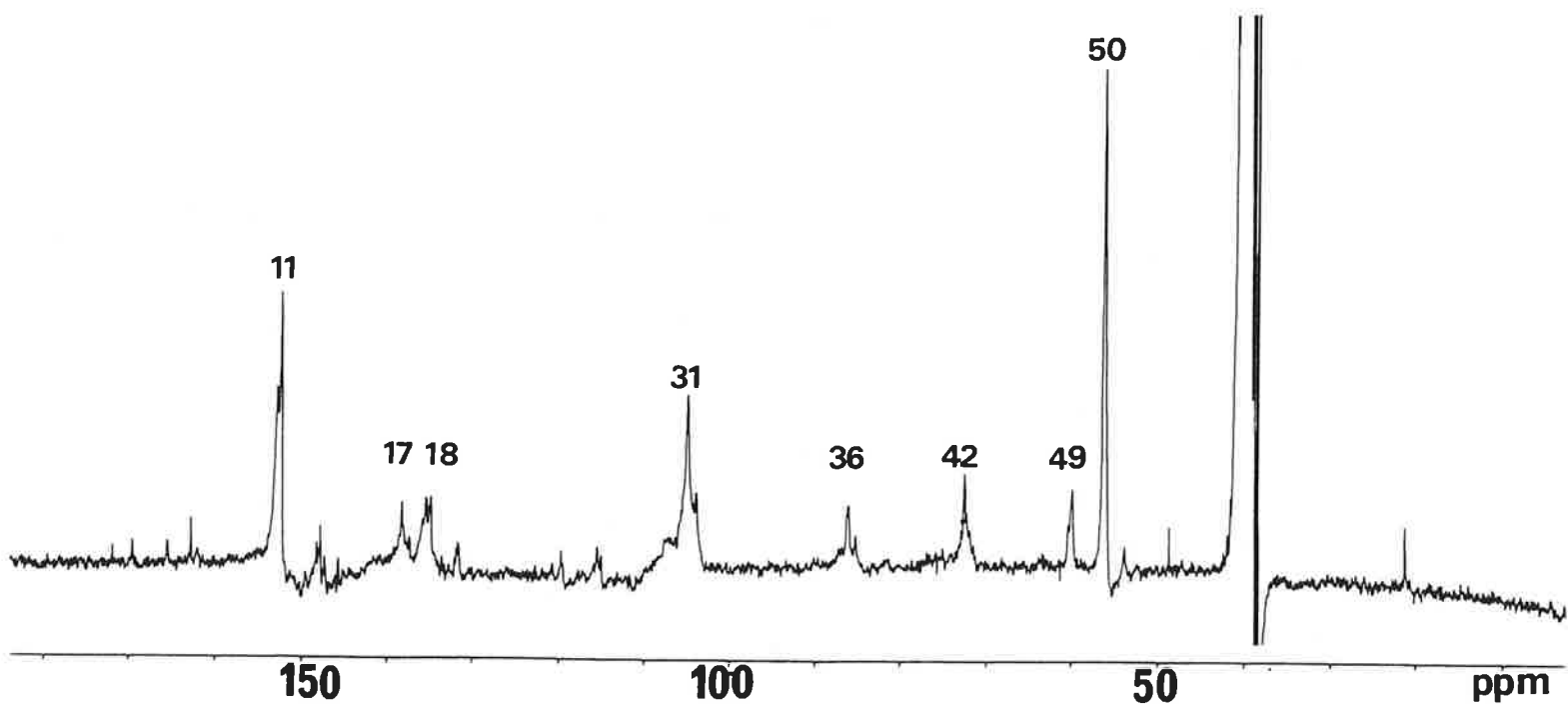


Figure 27 : Spectre obtenu par différence entre les spectres d'une lignine MWL de peuplier (fig. 20a) et d'une lignine MWL de sapin (fig. 21a) enregistrés avec la séquence CI.

En calculant le spectre différence entre les spectres des lignines MWL de sapin et de peuplier enregistrés tous les deux avec la séquence CI on doit obtenir un spectre caractéristique des unités syringyles. En effet, le spectre obtenu (fig. 27) s'interprète facilement comme celui de signaux de carbones d'unités syringyles : les signaux n° 11 sont ceux des carbones C-3 et C-5 de syringyles inclus dans des structures β -O-4, les signaux n° 31 étant dus aux carbones C-2 et C-6 de ces unités. Les trois signaux n° 36, 42 et 49 qui apparaissent à 86,8 ppm, 73 ppm et 59.6 ppm, repérables sur le spectre CH pour les 2 premiers signaux et le spectre CH₂ pour le dernier sont alors facilement attribuables aux carbones C- β , C- α et C- γ des chaînes propanes éthérifiées en position

par des unités syringyles. Par analogie avec les déplacements chimiques des structures β -O-4 dans la série gaïacyle, nous attribuons ces signaux à la forme érythro de la structure β -O-4 de la série syringyle et le composé modèle dont nous avons enregistré le spectre (tableau 6) à la forme thréo.

La forme érythro, compte tenu des spectres CH et CH₂, semble dominante dans ces lignines.

Dans les lignines MWL de bouleau et de peuplier, on constate également l'absence de tout signal pouvant démontrer la présence de structure β -1. De la même manière, il n'y a pas d'indication de signal de structure épipinorésinol ou épisyringarésinol en dessous de 51 ppm.

Sur les spectres CH des lignines MWL de sapin, peuplier et bouleau il existe des signaux larges de faible intensité (absent sur le spectre CH du DHP) entre les signaux des carbones C- β et C- α des structures β -O-4. Ces signaux ont diverses attributions dans la littérature mais l'expérience DEPT n'apporte aucun élément nouveau quant à leurs attributions.

II.34 Résultats quantitatifs

Nous développons deux exemples d'exploitation quantitatives des spectres enregistrés par l'expérience DEPT :

- à partir des différentes lignines étudiées, détermination et interprétation du rapport R, défini ainsi :

$$R = \frac{\text{aire des carbones aromatiques CH (spectre DEPT)}}{\text{aire des carbones aromatiques totaux (spectre CI)}}$$

- dosage des principales structures d'un polymère artificiel (DHP).

II.341 Détermination et interprétation du rapport R pour les différentes lignines étudiées

II.3411 Détermination du rapport R et du taux de condensation

Pour assurer la reproductibilité et par conséquent la fiabilité des calculs on doit chercher à optimiser la qualité des intégrales qui dépendent essentiellement de la définition de la ligne de base (cf. matériel et méthode). Ce problème technique résolu, il faut soustraire des différentes surfaces considérées les contributions (significatives) des aires des signaux des carbones non aromatiques.

- les carbones vinyliques, très importants dans le DHP et en faible quantité dans la lignine de MWL de sapin, et négligeables dans les lignines MWL de feuillus.

- les carbones des unités parahydroxybenzoïques présents uniquement dans la lignine de peuplier.

Pour les carbones vinyliques, on prend l'aire des signaux aromatiques dans le spectre CH attribués aux carbones de ces structures,

Pour les unités parahydroxybenzoïques, on intègre le signal n° 21 à 131 ppm des carbones C-2 et C-6. La contribution de ces unités à la région des aromatiques est l'aire déterminée précédemment multipliée par 2,5 pour le spectre total enregistré avec la séquence CI et par 2 pour le spectre CH.

On peut alors calculer le rapport R pour chaque polymère. (Tableau 7).

Compte tenu de nos connaissances sur la structure des lignines et du DHP on peut considérer que les positions 1 et 4 du noyau aromatique sont systématiquement substituées ; de ce fait, on peut calculer théoriquement le rapport,

$$R_{th} = \frac{\text{CH aromatique}}{\text{Total des carbones aromatiques}}$$

$$R_{th} = \frac{6 - (2 + T)}{6}$$

T représente le taux de méthoxyle par unité aromatique,
2 + T correspond au nombre des carbones aromatiques substitués.

On calcule T à partir du spectre total enregistré avec la séquence CI.

$$T = \frac{\text{aire des méthoxyles} \times 6}{\text{aire des aromatiques corrigée}}$$

II.3412 Résultats et interprétation

Le tableau 7 donne les valeurs de R et R_{th} pour les lignines MWL de peuplier, de sapin et le polymère artificiel (DHP).

Tableau 7 : Taux de condensation des lignines naturelles (MWL) et artificielles (DHP)

	MWL de peuplier	MWL de sapin	DHP
R	0,39	0,42	0,34
R _{th}	0,39	0,50	0,5
d*	0	0,48	0,96

* exprimé par unité aromatique

La différence entre le rapport R et R_{th} renseigne directement sur les substitutions du noyau aromatique en position 2,5 et 6 autres que par des groupes méthoxyles. Dans la chimie des lignines cela correspond aux structures dites condensées dans le polymère : phénylcoumarane, diphényle, aryl-aryl éther 4-0-5 ...

Si la lignine MWL de peuplier ne présente aucune condensation la lignine de sapin à un taux de condensation de 0,48. Le polymère artificiel apparaît quant à lui avoir un taux de condensation deux fois plus élevé.

Le taux de condensation que nous trouvons pour la lignine MWL de sapin correspond au chiffre (0,4-0,5) donné par Ludwig et collaborateurs (92) sur la base de résultats quantitatifs obtenus en RMN proton. Leur méthode nécessite en plus les résultats de l'analyse élémentaire, la détermination du taux de méthoxyle, mais aussi le dosage par d'autres méthodes des unités dont les protons absorbent dans la région des protons aromatiques (par exemple : les structures vinyliques).

De telles différences entre les lignines ont été déjà mises en évidence notamment par les études de dégradation chimique des lignines. En effet, les condensations sur le noyau aromatique sont liées à une chute des rendements en produits de dégradation lors de l'oxydation au nitrobenzène ou de l'acidolyse douce (70). C'est ainsi que les

lignines de conifères donnent des rendements en monomères beaucoup plus faibles que les lignines de feuillus.

La méthode développée par Glasser et coll. (65) basée sur l'oxydation au permanganate de potassium permet d'estimer le rapport des unités non condensées sur les unités condensées des lignines étudiées : ce rapport décroît de 10 à 5 lorsque l'on passe des lignines mixtes de feuillus constituées à la fois d'unités syringyle et gâacyle, aux lignines purement gâacyles des conifères ; il est encore plus faible et décroît à 2 pour le polymère synthétisé à partir de l'alcool coniférylique. Leur méthode basée sur un dosage par chromatographie en phase gazeuse est sûrement beaucoup plus sensible que la RMN et permet de détecter des traces de structures condensées ; en revanche, elle demande de nombreuses manipulations et les causes d'erreur sont nombreuses. Notre dosage par RMN a l'avantage d'être très reproductible dans la mesure où les déterminations des intégrales sont correctes.

Ce dosage n'entraîne pas la dégradation de l'échantillon. Le résultat étant exprimé par unité aromatique ou par méthoxyle peut être relié directement aux paramètres structuraux donnés dans la littérature.

II.342 Dosage des principales structures d'un polymère artificiel

II.3421 Dosage des structures β -0-4, β - β , β -5

Compte tenu des attributions établies au paragraphe II.3321, on peut doser les principales structures du DHP en intégrant leurs signaux spécifiques. Les résultats sont consignés dans le tableau 8.

TABEAU 8 : Exploitation quantitative des spectres CI et DEPT du polymère artificiel de l'alcool coniférylique

REGION SPECTRALE ET EXPERIENCE RMN CONSIDEREES	VALEURS DES INTEGRALES (unités arbitraires)
Total des carbones aromatiques (signaux entre 152 et 103 ppm, spectre (CI))	572
CH aromatique et vinyliques (signaux entre 130 et 103 ppm, spectre CH)	222
CH vinylique des unités coniféryliques (signaux n° 23, spectre CH)	39,7
Région des carbones C- β du maillon propane (signaux entre 88 et 80 ppm, spectre CI ou CH)	49
Région des carbones C- α du maillon propane (signaux entre 73 et 71 ppm, spectre CI)	24,5
C- α des structures β -0-4 (signaux n° 43 et 44, spectre CH)	13
C- γ des structures β - β (signal n° 45, spectre CH ₂)	10,4
Région des carbones C- γ du maillon propane (signaux entre 63 et 60 ppm, spectre CI ou CH ₂)	57
C- γ des structures β -5 (signal n° 46, spectre CH ₂)	21
C- γ des unités coniféryliques (signal n° 47, spectre CH ₂)	19,5
C- γ des structures β -0-4 (signal n° 48, spectre CH ₂)	17
CH ₃ des méthoxyles (signal n° 49, spectre CI)	88
C- β des structures β - β et β -5 (signaux n° 51 et 52, spectre CH)	29
Carbones non repérés	60

Nous pouvons alors établir quelques comparaisons :

- Pour les signaux n° 23, attribués aux carbones C- α et C- β des unités coniféryliques on retrouve une aire équivalente à deux carbones si l'on considère l'intégrale du signal n° 47 attribué au carbone C- γ de ces mêmes structures.

- Si l'on considère l'aire du signal n° 45 attribué aux carbones C- γ des structures pinorésinol égale à 10,4 on peut calculer l'aire du carbone C- β des structures phénylcoumaranes par déduction à partir des signaux n° 52 et n° 51 attribués aux carbones C- β des structures phénylcoumarane et pinorésinol : on trouve $(29 - 10,4) = 18,6$.

Cette aire est équivalente à l'aire du signal n° 46 confirmant que ce signal est principalement dû aux structures phénylcoumaranes. Par conséquent les structures β -1 ne sont pas du tout des structures représentatives dans ce polymère.

Si l'on ajoute aux aires des signaux n° 46 et 48 attribués aux carbones C- γ des structures phénylcoumarane et alkyl-aryl éther, l'aire du signal n° 45 des carbones C- γ dans les structures pinorésinols on obtient ainsi une estimation (48,4) des carbones C- γ dans les principales structures de ce DHP. On retrouve ainsi tout à fait l'aire du massif entre 88 et 84 ppm attribué aux carbones C- β des structures β -0-4 et aux carbones C- α des structures pinorésinol et phénylcoumarane.

Les résultats de l'analyse quantitative avec la séquence DEPT sont donc tout à fait cohérents avec les attributions de signaux et montrent ainsi la validité de cette analyse quantitative.

II.3422 Mise en évidence et dosage de structures diphenyle et aryl-aryl éther

Au paragraphe III.3412 nous avons calculé un taux de condensation pour le DHP de 0,96 par unité aromatique.

Les structures β -5 (0,2 unité par aromatique) ne fournissent qu'une explication partielle de ce degré de condensation élevé. On détermine alors le taux des différents hydroxyles du DHP selon la méthode en RMN ^{13}C développée par D. Robert et G. Brunow (110) sur des échantillons acétylés.

Tableau 9 : Taux de différents hydroxyles du polymère artificiel (DHP) (exprimé par unité aromatique).

Total	Primaire CH_2OH	Secondaire CHOH	Phénolique ArOH
1,10	0,64	0,16	0,26

L'échantillon dérivatisé a été récupéré en évaporant les réactifs afin d'éviter toute perte de matériel et permettre ainsi l'exploitation conjointe des résultats quantitatifs obtenus sur les lignines acétylées et non acétylées. Pour cela les fréquences des différentes structures sont exprimées par unité aromatique.

A partir de l'analyse quantitative du DHP non dérivatisé (tab.8) nous déterminons 0,19 structures alkyl-aryl éther β -0-4 et 0,24 structures phénylcoumarane soit 0,43 structures dans lesquelles les hydroxyles phénoliques ne sont plus libres.

A partir du spectre du DHP acétylé, on dose 0,26 hydroxyle phénolique libre, 0,74 ($1 - 0,26$) structures n'ont donc plus leur hydroxyle phénolique libre. Les structures β -0-4 et β -5 constituent 0,43 de ces 0,74 structures. Compte tenu de la formation du DHP les seules possibilités pour les autres structures 0,31 ($= 0,74 - 0,43$) sont des structures aryl-aryl éther, 5-0-4 ou 6-0-4. Nous avons mentionné au paragraphe II.331 que les signaux observés entre 100-105 ppm pouvaient être dus aux structures 5-0-4 par exemple ; l'analyse quantitative confirme tout à fait cette hypothèse.

Un autre type de structure décrit et justifié par la polymérisation radicalaire est celui représenté par les structures diphényle.

Celles-ci peuvent être estimées à partir du taux de condensation (0,96) et du total des structures condensées déterminées jusque-là, c'est-à-dire les structures β -5 (0,24) et aryl-aryl éther (0,31). On obtient alors le taux de structures diphényle en effectuant la différence.

$$0,96 - 0,31 - 0,24 = 0,41$$

Les fréquences des différentes structures du DHP déterminées par l'analyse RMN sont récapitulées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Dosage des principales structures du DHP
par unité aromatique

Diphényle	(Ar-Ar)	0,41
Aryl-aryl éther	(Ar-O-Ar)	0,31
Phénylcoumarane	(β -5)	0,24
Alkyl-aryl éther	(β -O-4)	0,19
Pinorésinol	(β - β)	0,06

Les conditions que nous avons utilisées pour synthétiser les DHP devaient favoriser la polymérisation "en ligne" par rapport à la polymérisation "en bloc" (55). L'étude structurale quantitative met en évidence l'importance des structures condensées. La dimérisation des radicaux suivie d'une polymérisation en bloc des dimères peut rendre compte de ces résultats et indique que la polymérisation a été plutôt du type "en bloc". K. Lundquist et G. Brunow (137) concluent de même en étudiant en RMN ^1H des DHP acétylés. Par rapport à leur étude nous avons pu interpréter les faibles taux d'hydroxyles phénoliques libres, en mettant en évidence l'importance des structures condensées dans ces polymères artificiels.

Par rapport aux structures rencontrées dans la lignine MWL de sapin (78) nous avons mis en évidence dans le DHP des différences quantitatives fondamentales : les structures condensées Ar-Ar, Ar-O-Ar et β -5 sont très largement majoritaires dans le DHP alors que les structures Ar-Ar et Ar-O-Ar sont tout à fait minoritaires pour la lignine MWL de sapin dans laquelle dominent les structures β -O-4 (78).

II.4. APPORTS DE L'EXPERIENCE 2D INADEQUATE DANS L'ANALYSE STRUCTURALE D'UNE LIGNINE MWL DE PEUPLIER

L'étude structurale de lignines en RMN du ^{13}C repose sur l'analyse des composés modèles. On extrapole ainsi au polymère les résultats établis sur des molécules de taille beaucoup plus réduite. L'expérience de RMN bidimensionnelle INADEQUATE en donnant les corrélations $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ par les couplages scalaires permet de reconstruire les enchaînements carbonés des différentes structures. On vérifie ainsi la validité de la méthode basée sur l'analyse de composés modèles. La présentation des résultats sous la forme d'une carte à deux dimensions permet de distinguer des enchaînements superposés sur le spectre 1D et de préciser certaines attributions.

II.4.1. Rappels expérimentaux

Ce type d'expérience repose sur les couplages scalaires $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ et ne peut s'effectuer en ce qui concerne les lignines que sur des échantillons enrichis en ^{13}C . Nous avons donc utilisé une lignine MWL extraite de bois de peuplier cultivé en atmosphère enrichie en $^{13}\text{CO}_2$ à l'Institut National Agronomique de Grignon. L'enrichissement isotopique a été estimé à 10 % environ (135).

B. Monties et coll. (138) ont également utilisé cette expérience RMN. Ils affirment que pour mener à bien l'expérience d'INADEQUATE sur une largeur spectrale aussi grande que celle couvrant les déplacements chimiques (150 ppm) des carbones de la lignine, il est indispensable d'utiliser des impulsions composites pour réaliser une impulsion de 180° sur les ^{13}C .

L'utilisation d'impulsions composites alourdit considérablement les programmes de phases et son intérêt est parfois discutable. C'est pourquoi nous préférons utiliser le programme proposé par la société Bruker sans le modifier et déterminer très précisément les impulsions à 90°C et 180°C sur les ^{13}C , directement sur l'échantillon à analyser. Les cartes bidimensionnelles obtenues sont de très bonne qualité, avec

très peu de signaux résiduels le long de la diagonale. Le spectre 1D correspondant est donné au bas de la figure 29.

Sur les cartes bidimensionnelles (fig.29, 30) nous avons repéré chacune des corrélations par deux numéros correspondant aux numéros des signaux du spectre 1D dont les attributions sont données dans le tableau général.

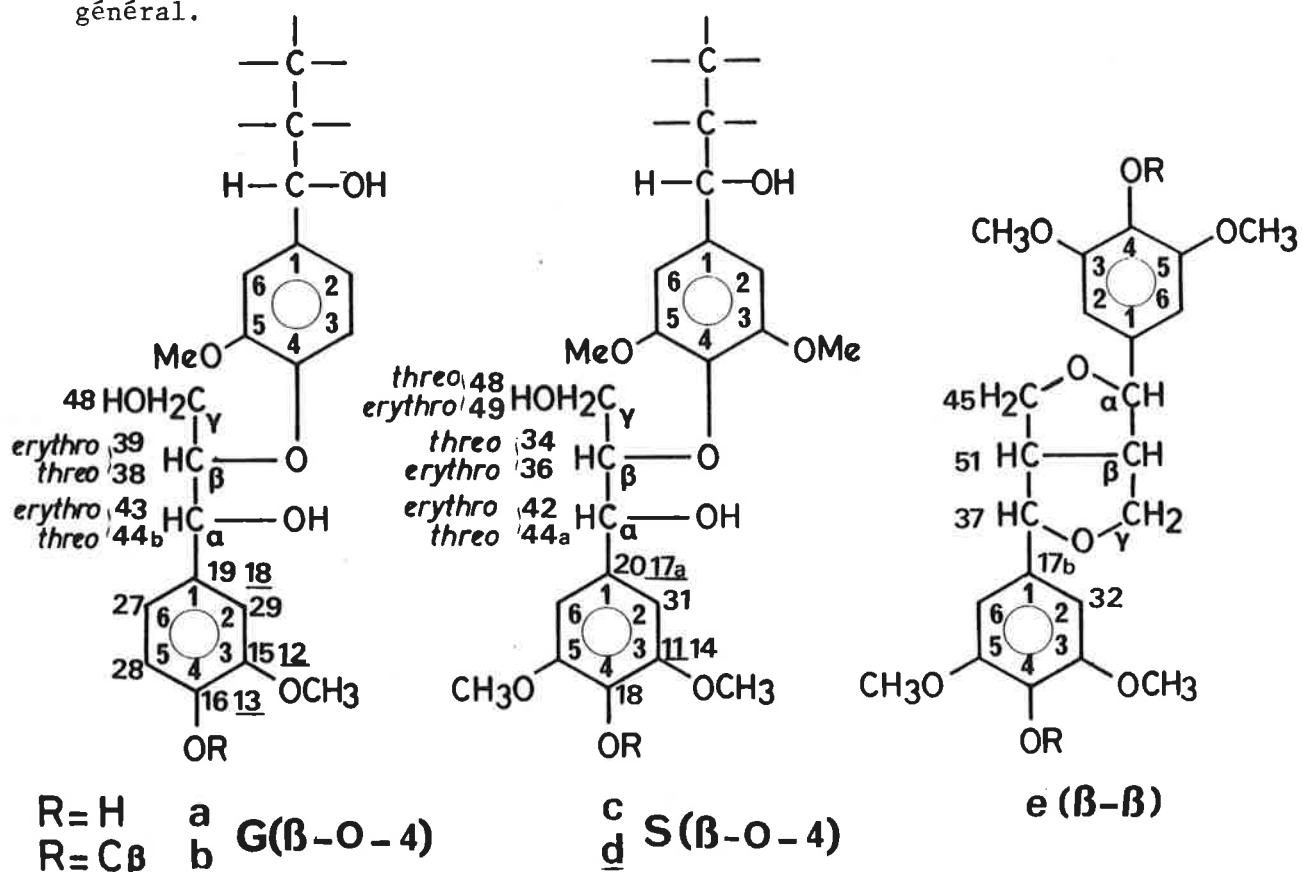


Figure 28: Attribution des carbones des structures alkyl-aryl éther β -O-4, pinorésinol et syringarésinol.

La figure 28 permet d'expliciter les différentes attributions concernant plus particulièrement les structures β - β et les formes diastéréoisomères des structures β -O-4 dans les séries gaiacyles et syringyles. Nous avons considéré les attributions de la littérature (99 à 104), et les résultats que nous avons établi plus spécialement pour la région entre 100 et 50 ppm à partir des spectres enregistrés par l'expérience DEPT. Nous avons tenu compte des corrections apportées par Hassi et Coll. (139) en ce qui concerne les signaux 12 et 13 attribués

aux carbones C-3 et C-4 des galactyles dans les structures 30b (fig. 30) et celles apportés par E. GUITTET pour l'attribution des signaux 18 aux carbones C-4 des structures 30c ou 30d. Pour cet échantillon de lignine MWL nous n'avons pas appliqué les étapes finales de purification (afin d'éviter toute perte de matériel) pour éliminer les contaminants osidiques. Cela explique les signaux bien visibles entre 90 et 102 ppm attribués aux différents types de carbones C-1 dans les unités xyloses. Les attributions des différents signaux ayant été déjà faites par E. Guittet et Coll., nous les avons noté "X" sur les cartes 2 D.

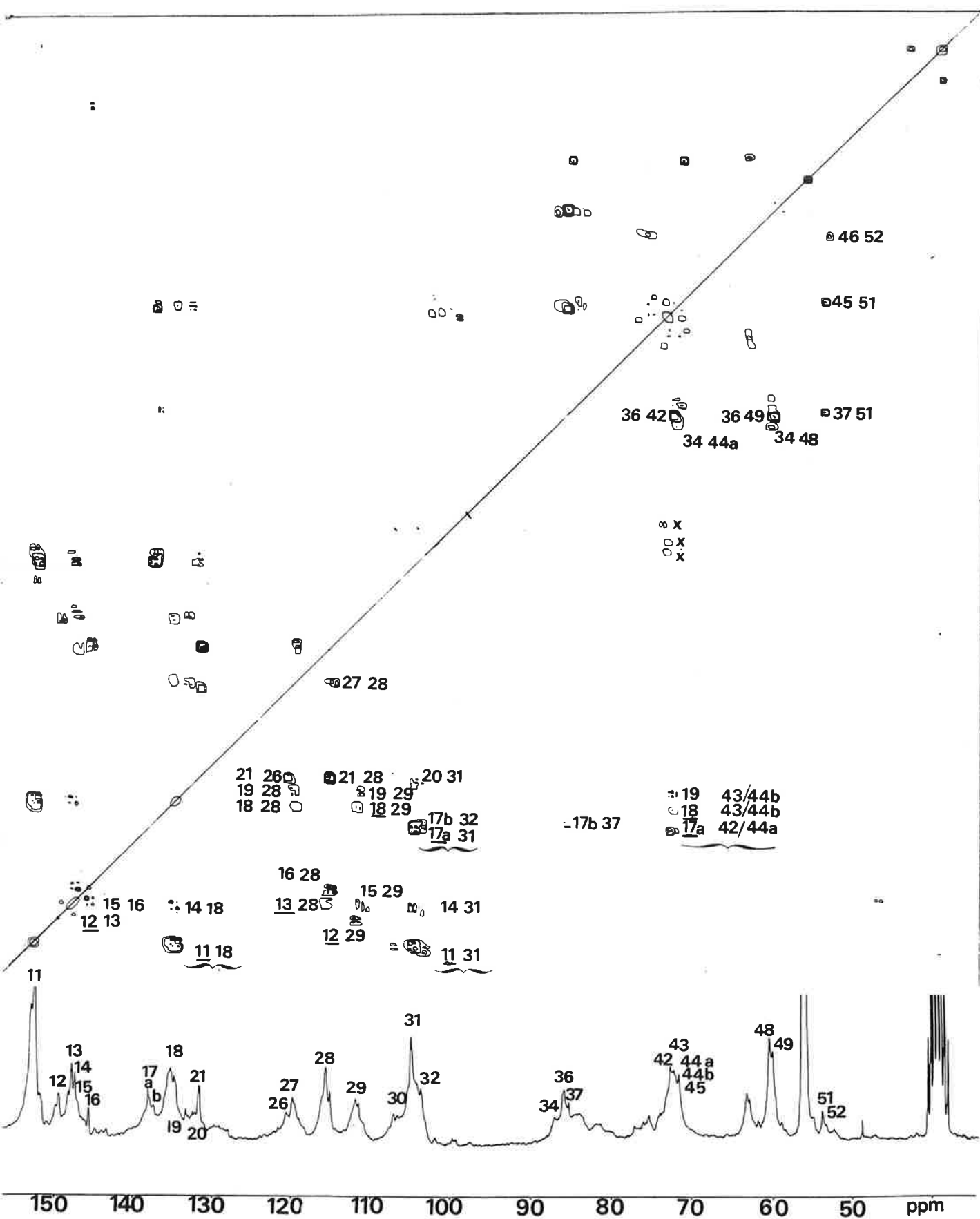


Figure 29 : Lignine MWL de peuplier enrichie en ^{13}C , spectre de corrélation ^{13}C - ^{13}C par les couplages scalaires (2D INADEQUATE).

II.4.2. Résultats et discussion

L'analyse détaillée de la carte 2 D va nous permettre de confirmer ou préciser certaines attributions concernant les signaux des structures pinorésinol et phénylcoumarane. De la même manière nous pouvons analyser les enchaînements des carbones aliphatiques des différentes formes diastéréoisomères des structures alkyl-aryl éther β -O-4 et en apprécier d'une manière quantitative l'importance relative dans chacune des séries gâiacyles et syringyles.

II.4.2.1. Structures syringarésinol (β - β) et phénylcoumarane (β -5)

Quand on peut associer la carte bidimensionnelle à un spectre 1 D bien résolu (fig.29) on améliore la précision de l'analyse. Tel est le cas pour les signaux 17b et 32 présents généralement comme des épaulements ou non visibles. On corrèle ainsi le signal 17b de la région des carbones C-1 d'unités syringyles au signal 37 attribué au carbone C- des structures pinorésinol ou syringarésinol (§ II.332) et au signal 32 à 103,6 ppm dans la région classiquement attribuée aux carbones C-2 et C-6 des syringyles. Cet enchaînement démontre que les structures β - β dans la lignine de peuplier se font majoritairement entre des unités syringyles puisque l'on ne repère aucune corrélation entre le signal 37 le signal du carbone C-1 aromatique gâiacycle. L'attribution précédente du signal 32 est intéressante car elle apporte une attribution supplémentaire au massif entre 103 et 109 ppm attribué à deux types de carbones seulement, aux carbones C-2 et C-6 des syringyles en général et plus particulièrement à ceux ayant un carbonyle en position (épaulement 30).

En ce qui concerne les structures β -5, la corrélation entre le signal 46 du carbone C- γ à 63,3 ppm avec le signal 52 à 53,4 ppm confirme l'attribution de ce signal au carbone C- β de structure β -5. En revanche on ne repère la corrélation entre le signal 52 et le signal 35 du carbone C- α des structures β -5 que sur une carte 2 D (fig. 31) correspondant à trois fois plus d'accumulations que la carte de la figure 28.

II.4.2.2. Structures alkyl-aryl éther β -0-4

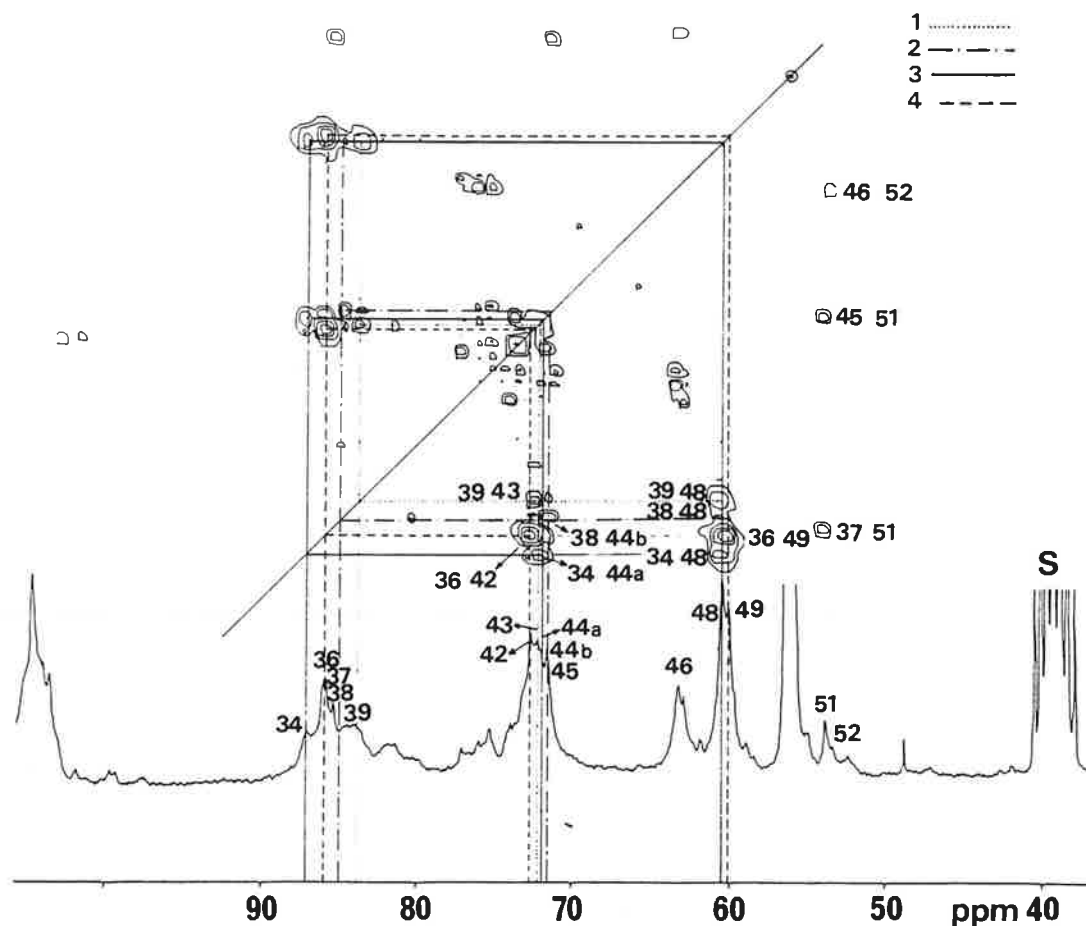


Figure 30 : Agrandissement de la figure 28 au niveau des corrélations entre les carbones du maillon propane (100 à 50 ppm).

La carte de la figure 30 correspond à un agrandissement de la région entre 40 et 100 ppm avec un niveau minimum de coupe plus bas que celui de la figure 29. On repère ainsi deux groupes de corrélations qui permettent de corrélérer les massifs de signaux centrés à 60,72 et 85 ppm attribués aux carbones C- γ , C- α et C- β des structures alkyl-aryl éther β -0-4. Les structures fines de ces deux groupes de corrélations permettent de distinguer quatre enchaînements répertoriés sur la figure 28. On constate que les signaux des carbones C- α centrés sur 72 ppm sont groupés dans un intervalle inférieur à 1,4 ppm, (figure 30).

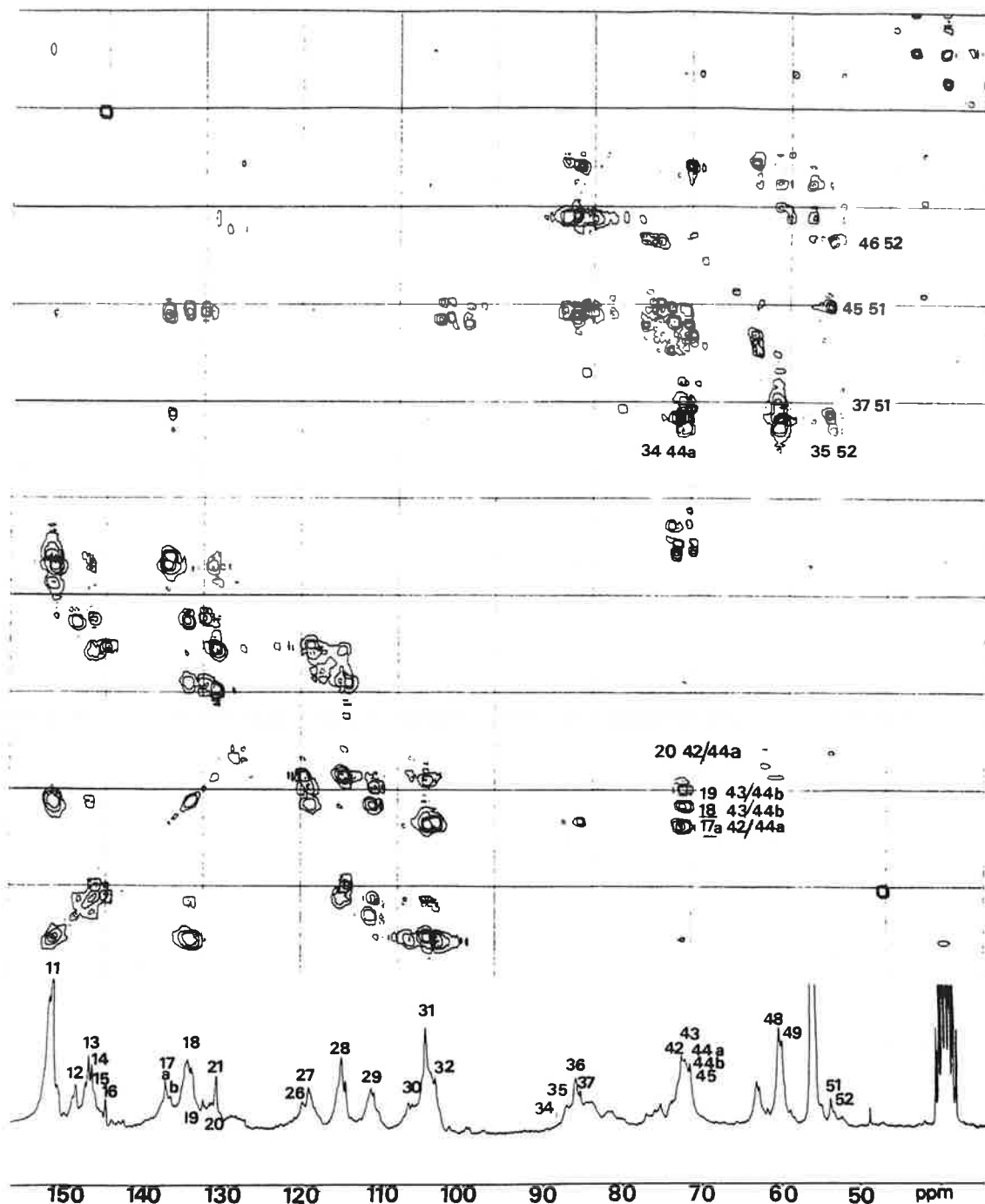


Figure 31 : Lignine MWL de peuplier enrichie en ^{13}C , spectre de corrélation $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ par les couplages scalaires (2D INADEQUATE). Cette carte 2D correspond à 3 fois plus d'accumulations que la carte 2D de la figure 29.

Sur la carte 2D de la figure 31, qui présente un meilleur rapport signal sur bruit que celle de la figure 29, les carbones C-4 donnent quatre corrélations distinctes avec les carbones C-1 des unités galactyle et syringyle éthérifiées ou non (fig. 28 et 31) :

17a - 42/44a

18 - 43/44b

19 - 43/44b

20 - 42/44a (visible uniquement sur la figure 31).

Si l'on considère chacun des enchaînements de carbones aromatiques auxquels participent les carbones C-1 repérés précédemment, on peut les attribuer d'après les études classiques sur les composés modèles (99 à 104), aux unités éthérifiées et non éthérifiées en position 4 dans chacune des séries gaiacyle ou syringyle. Par exemple sur la figure 29 les corrélations entourées par un rectangle correspondent aux carbones des unités syringyles incluses dans une structure β -O-4 et éthérifiées en 4.

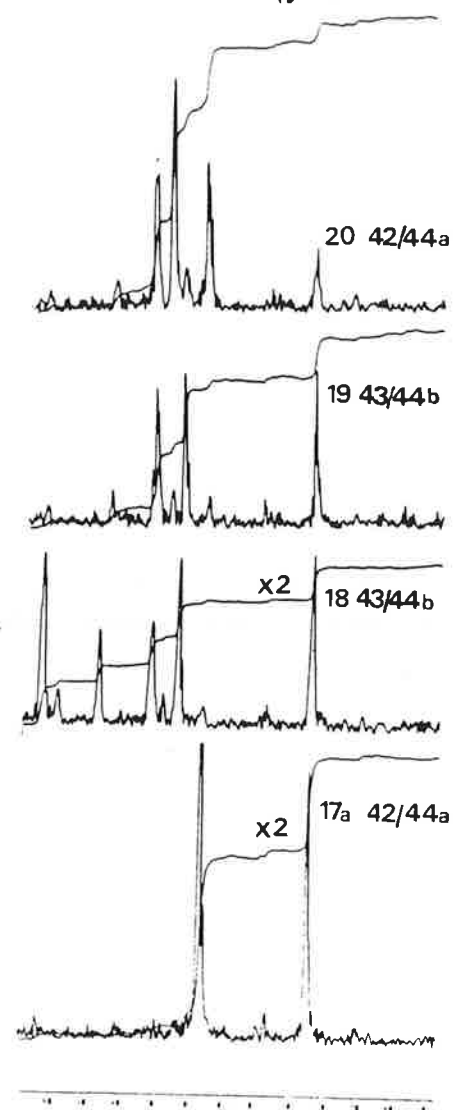
On démontre ainsi que la présence ou l'absence d'un méthoxyle en position 5 n'a pratiquement pas d'effets sur les déplacements chimiques des carbones C- α des structures β -O-4. Il en est de même que l'hydroxyle phénolique soit libre ou inclus dans une liaison éther. Les effets stéréochimiques dus aux carbones asymétriques C- α , C- β (tableau 6) justifient à eux seuls l'hétérogénéité de déplacements chimiques observée (1,4 ppm) pour chacun des carbones C- α .

En revanche, les signaux des carbones C- β apparaissent beaucoup plus dispersés (fig. 30) puisque les différents signaux sont dispersés sur 4 ppm. La nature du noyau aromatique inclus dans la liaison éther, la configuration des carbones C- α et C- β influent donc beaucoup plus sur les déplacements chimiques du carbone C- β , que sur ceux des carbones C- α .

Si l'on considère les déplacements chimiques des composés modèles (tab. 6, § II-3321) on retrouve trois des quatre schémas de corrélation établis sur la figure 30 qui correspondent respectivement aux formes thréo et érythro des structures β -O-4 dans la série gaiacyle et à la forme thréo dans la série syringyle. En effet dans la série syringyle nous avons enregistré un seul composé modèle (synthétisé par Mlle M. Hauteville à Lyon). Au paragraphe II.3323 nous avons déduit que les signaux 36, 42 et 49 totalement absents des spectres de lignines du type gaiacyle pouvaient être le fait des carbones C- β , C- α et C- γ de la forme érythro des structures β -O-4 dans la série syringyle. Le schéma de corrélation 4 confirme tout à fait que ces trois signaux sont ceux de carbones d'une même chaîne propane.

On démontre également que le signal 49 des spectres 1D est caractéristique du carbone C- γ de cette forme puisque l'on observe une seule corrélation notée 49-36 entre les carbones C- γ et C- β .

Figure 32 :
Coupes transversales réalisées au niveau des corrélations entre les carbones C-1 et C- α sur la carte 2D de la figure 31.



Dans une telle expérience à deux dimensions l'intensité des corrélations dépend des valeurs de T1 et T2 des ^{13}C liés à un autre ^{13}C ainsi que de la valeur de la constante de couplage. $^1\text{J } ^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$. On peut donc raisonnablement comparer les intensités des corrélations entre des carbones de même nature. Cette comparaison peut être effectuée rapidement en comparant le nombre de niveaux des différentes corrélations. D'une manière plus précise on peut intégrer les signaux ou les coupes effectuées au niveau des corrélations étudiées. Nous avons utilisé cette dernière méthode. La figure 32 montre pour exemple les coupes transversales effectuées au niveau des corrélations entre les carbones C-1 et C- α . Le tableau 11 donne les intégrales des

corrélations entre les carbones C-1 et C- α d'une part et les carbones C- α et C- β d'autre part dans les structures β -0-4. Ces déterminations ont été faites à partir de la carte 2D présentant le meilleur rapport signal sur bruit (fig. 31).

TABEAU 11 : INTENSITES DES CORRELATIONS ENTRE LES CARBONES C-1, C- α ET C- β DANS LES DIFFERENTES STRUCTURES β -0-4.

CORRELATION		ATTRIBUTION		INTEGRALE	
C- β	C- α				
39	43	dans β -0-gaiacyle, forme érythro		19	12 %
38	44b	dans β -0-gaiacyle, forme thréo		32	20 %
36	42	dans β -0-syringyle, forme érythro		84	53 %
34	44a	dans β -0-syringyle, forme thréo		23	15 %
C-	C-1				
:42/44a	20	de syringyle non éthérifié en 4		9	8 %
:43/44b	19	de gaiacyle non éthérifié en 4		21	20 %
:43/44b	18	de gaiacyle éthérifié en 4		32	31 %
:42/44a	17a	de syringyle éthérifié en 4		44	41 %

Ainsi, si l'on considère le groupe de corrélations entre les carbones C- β et C- α on constate que la corrélation (36-42) attribué à la forme érythro dans la série syringyle est largement dominante. L'intégrale de cette corrélation est du même ordre que la somme des trois autres. Cela est tout à fait en accord avec les attributions faites pour les signaux 47 et 49 des spectres 1D. Les autres corrélations (39/43, 38/44b, 34/44a) présentent des intégrales du même ordre de grandeur et peuvent être considérées en quantité équivalente. Ces résultats confirment tout à fait l'étude de M. Hauteville et coll. (140) en RMN ^1H sur des lignines de feuillus acétylées et l'étude de H. Nimz et coll. (118) en RMN du ^{13}C qui concluent toutes deux à la dominance des structures érythro dans les lignines de feuillus.

De la même manière on peut comparer les intensités des différentes corrélations entre les carbones C-1 des noyaux aromatiques syringyles ou gaïacyles et les carbones C-4 du maillon propane. On constate ainsi que les syringyles éthérifiés en position 4 sont très largement majoritaires par rapport à ces mêmes unités avec un hydroxyle libre (le rapport entre les intégrales des deux corrélations 17a - 42/44a et 20-42/44b est de 5). Au niveau des unités gaïacyles un peu plus de la moitié de ces unités sont éthérifiées en position 4. Cette analyse quantitative nous amène à conclure qu'au niveau de la chaîne propane les carbones C- β sont majoritairement éthérifiés par des unités syringyles qui sont alors pratiquement toujours éthérifiées au niveau du carbone C-4. On met ainsi en évidence des enchaînements d'unités syringyles liés par des liaisons β -O-4.

Ce point est intéressant car il suggère l'existence d'enchaînements $(\beta$ -O-4)_n de manière beaucoup plus fréquente que ne pouvait le laisser prévoir les seules études de dégradation chimique. Nimz a néanmoins isolé par hydrolyse acide de la lignine un tétramère ayant 2 liaisons β -O-4 successives (73).

TROISIEME PARTIE

AUTOHYDROLYSE RAPIDE DU BOIS DE PEUPLIER ET CARACTERISATION
STRUCTURALE DES LIGNINES EXTRAITES

Dans cette partie nous présentons les résultats concernant la caractérisation structurale des lignines extraites des bois de Populus tremuloïdes traités par autohydrolyse rapide.

Les différentes voies de préparation des échantillons sont présentées et discutées dans un premier chapitre (III.1). La caractérisation structurale des lignines est alors effectuée essentiellement par spectroscopie RMN du ^{13}C . L'exploitation qualitative (III.2) et quantitative (II.3) des spectres enregistrés permet de dégager finalement les modifications structurales dues aux conditions de traitement appliquées. Au chapitre III.4 nous abordons l'analyse qualitative et quantitative des composés de faible masse moléculaire formés au cours du traitement, afin de proposer des mécanismes chimiques rendant compte des changements structuraux des lignines extraites (chapitre III.5).

III.1. EXTRACTION DES BOIS DE PEUPLIER TRAITES PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE.

BILAN EN MATIERE

III.11 Généralités

Dans toute la chimie de la lignine la préparation des échantillons, donc leur extraction, est un aspect fondamental. Quoique les solvants pour solubiliser chacun des constituants pariétaux, une fois isolés, soient connus il est toujours impossible de solubiliser du bois par des extractions répétées avec ces mêmes solvants. En outre, il est très difficile pour ne pas dire impossible d'obtenir des lignines débarrassées de tout hydrate de carbone et vice versa. Ces deux points corroborent deux idées générales.

1) Les techniques de séparation du bois en ces principaux constituants s'accompagnent toujours de modifications chimiques plus ou moins importantes.

2) Les auteurs acceptent finalement l'idée que les lignines ne sont pas simplement déposées dans le réseau constitué par les hydrates de carbone mais qu'elles sont liées et associées chimiquement, tout au moins en partie, à ces derniers. La nature et l'importance de ces liaisons restent encore mal connues. Les complexes lignine-hydrates de carbone en sont un exemple et font l'objet actuellement de nombreuses études (87,141).

L'obtention de lignines pures est également une opération délicate lorsqu'on les extrait de bois traités par les procédés papetiers conventionnels (procédé Kraft) ou non conventionnels (autohydrolyse, organosolve ...). En effet, si ces lignines sont facilement extraites, elles apparaissant souvent contaminées par les extractibles (pigments, graisses, tanins, ...), leurs produits de dégradation et ceux des autres constituants du bois. De ce fait, il n'existe donc pas un protocole d'extraction type mais des protocoles qui peuvent être modifiés selon les études envisagées. C'est ainsi que pour l'étude des lignines extraites des bois traités par autohydrolyse rapide nous avons été amenés à utiliser différents protocoles que l'on peut résumer sur la figure 33. Nous pouvons ainsi étudier les rendements en produits extraits selon ces protocoles suivis.

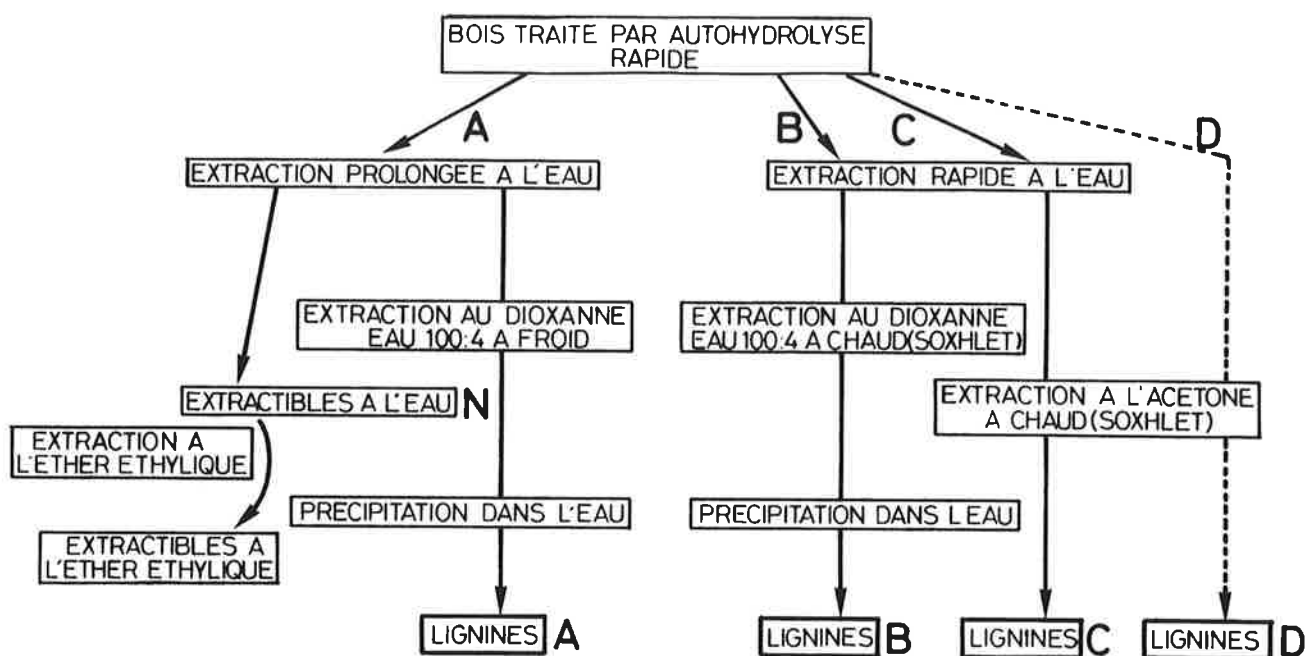


Figure 33: Voies de préparation des échantillons de Lignines

Pour des raisons chronologiques, les échantillons du plan d'expériences PI (pression constante = 40 bars, durée du traitement variable) ont été extraits selon la voie A, ceux du plan d'expériences PII (pression et durée du traitement variables) ont été préparés selon la voie B, les voies C et D ont été suivies pour des études ponctuelles à partir de certains échantillons des plans I et II.

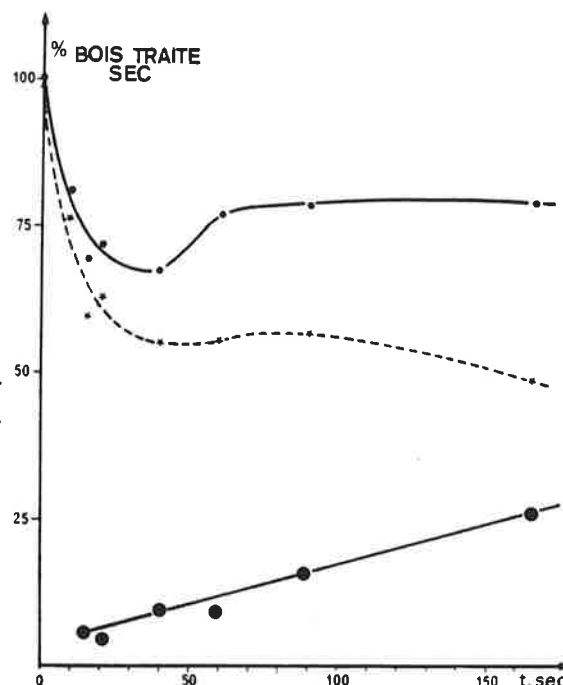
III.12 Bilan en matière des échantillons du plan d'expérience PI

III.121 Justification du protocole suivi

Pour les échantillons de ce plan d'expérience PI nous avons adopté une extraction intensive à l'eau pour extraire le maximum des produits solubles à l'eau : les hydrates de carbone et leurs produits de dégradation, les composés phénoliques de faible masse moléculaire. Les extraits aqueux sont ensuite extraits à l'éther éthylique ; on peut estimer ainsi la quantité de phénols de faible masse moléculaire solubles à l'eau. Nous avons utilisé le mélange dioxanne-eau (100 : 4) à froid afin d'éviter des conditions thermiques pouvant entraîner des réactions chimiques secondaires. Les lignines A sont récupérées par précipitations dans l'eau.

III.122 Résultats

Figure 34 :
 Bilan en matière des échantillons de bois de peuplier traité selon le plan d'expérience PI (pression constante = 40 bars, durée variable).
 ● résidu lignocellulosique extrait à l'eau ;
 * extrait au dioxanne-eau ;
 ● résidu lignocellulosique extrait à l'eau puis au dioxanne-eau.



Le graphe de la figure 34 donne le bilan pondéral des différentes extractions en fonction de la durée du traitement. Les produits solubles à l'eau atteignent un maximum vers 40 secondes, puis décroissent. Les produits extractibles à l'éther éthylique de ces fractions aqueuses N constituent jusqu'à 4 % du bois le plus sévèrement traité, (tab. 12). La chromatographie sur couche mince (CCM) ainsi que la RMN¹³C révèle que l'acide parahydroxybenzoïque est l'élément dominant dans la majorité des échantillons. Lorsque les conditions de traitement sont sévères, les chromatogrammes sur couches minces (CCM) révèlent également des quantités importantes d'hydroxyméthylfurfural. Les quantités de lignine A extraites par le mélange dioxanne-eau augmentent linéairement avec la durée du traitement. Les lignines A ont des spectres RMN¹³C typiques de lignine (fig. 38).

TABLEAU 12 : Pourcentage en extrait lipophile et pH des eaux d'extraction des échantillons de bois traités selon le 1er plan d'expérience.

:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	Echantillon	:	E70	:	E60	:	E69	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	Durée du traitement :	:	:	:	:	:	:	:
:	(pression constante):	10 s	:	15 s	:	20 s	:	40 s
:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	Extrait lipophile :	:	:	:	:	:	:	:
:	(% du bois traité :	1,1	:	1,3	:	1,4	:	1,85
:	sec)	:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	pH des eaux :	:	:	:	:	:	:	:
:	d'extraction :	4,2	:	4,12	:	4	:	4,1
:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:

III.13 Bilan en matière des échantillons du plan d'expérience P II

III.131 Justification du protocole suivi

Le protocole précédent (fig. 33, voie A) présente l'inconvénient d'être long (12 jours) et nécessite de nombreuses manipulations (une dizaine de filtrations par échantillon). En étudiant les spectres RMN des lignines A (figure 33), on s'aperçoit que ce sont déjà des lignines très dégradées par rapport à la lignine MWL du même bois. L'extraction par le mélange dioxanne-eau à froid peut être remplacée par une extraction à chaud au Soxhlet sans entraîner de modifications chimiques. Ainsi un protocole plus rapide (voie B, figure 33) a été suivie pour extraire les échantillons du plan P II.

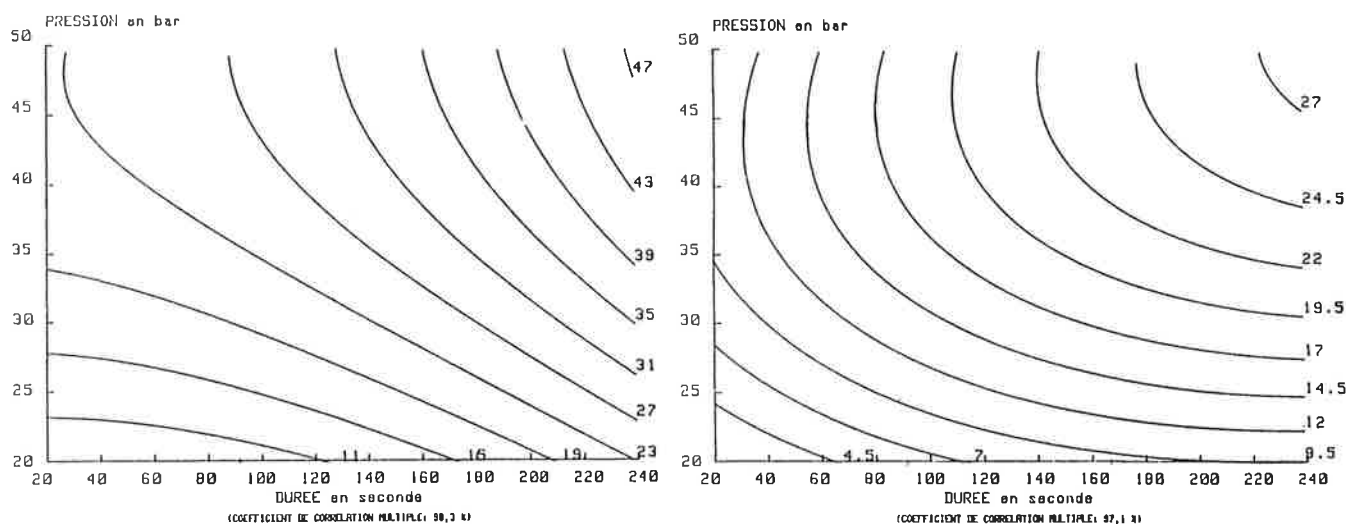
Les échantillons ont été préparés dans le laboratoire de Chimie des Procédés Papetiers à l'Ecole Française de Papeterie. Les échantillons de bois traités extraits à l'eau ainsi que les extraits B au dioxanne-eau ont été distribués aux différents laboratoires travaillant sur le projet afin qu'une comparaison rationnelle des résultats obtenus par les différents laboratoires puisse être faite.

III.132 Résultats

Les graphes que nous reproduisons avec l'aimable autorisation de M. Froment et M. Lachenal (169) montrent l'évolution des rendements en lignines par rapport au bois traité sec (figure 35a) et par rapport au bois de départ sec (figure 35b) en fonction des paramètres expérimentaux. Ces courbes sont le résultat de l'étude statistique des corrélations multiples existant entre la variable considérée et les paramètres expérimentaux (pression et durée du traitement). Si l'on compare ces données à celles de la figure 34, l'extraction de la lignine au soxhlet apparaît plus efficace que l'extraction à froid effectuée pour extraire les lignines A du plan d'expérience PI. Les spectres RMN ^{13}C , (fig. 39) des extraits B ainsi préparés sont caractéristiques de lignines.

Figure 35:

A) LIGNINE EXTRAITE (en % du bois explosé) , **B) LIGNINE EXTRAITE (en % du bois initial)**



III.14 Extraction à l'acétone

III.141 Justification du protocole suivi

Les lignines A et B extraites au dioxanne-eau selon les deux protocoles précédents s'avèrent très solubles dans le mélange acétone-eau (9-1), une partie des extraits peut être également solubilisée par l'acétone seule. L'extraction des bois traités par l'acétone est donc tout à fait envisageable. Les polysaccharides et la plupart des oses sont connus pour leur insolubilité dans l'acétone. C'est pourquoi

l'extraction à l'acétone pure, au soxhlet des échantillons préalablement extraits à l'eau (voie C, fig. 33) a été envisagée. A la suite de cette extraction, une extraction supplémentaire du résidu par le mélange dioxanne-eau est réalisée.

III.142 Résultats

Nous obtenons ainsi des quantités importantes (Tab. 13) de produits ayant des spectres IR et RMN caractéristiques de lignines qui contiennent de plus très peu de contaminants osidiques.

Tableau 13 : Bilan des extractions à l'acétone (voie C)

Conditions expérimentales	3 40 bars, 45 sec.	1 40 bars, 205 sec.
Extrait à l'acétone (lignines C)		
% du bois de départ sec	19	34
% du bois traité sec	18	27
teneur en sucres (b)		
% lignine extraite	0,8	0,4
extrait au dioxanne-eau		
avant purification	3	1,5
après purification (a)	2	1
lignine résiduelle		
% du résidu cellulosique	8	4

a : purification par partage de phase (142)

b : détermination faite par le CTP (169).

Les spectres infrarouges (l'attribution des bandes est rappelée au tableau 14) illustrent bien l'efficacité de l'extraction à l'acétone. Sur le spectre IR (fig. 36b) du bois traité n°3 extrait uniquement à l'eau, on repère les bandes caractéristiques à 1600, 1515, 1330 et 1275 cm^{-1} de la lignine C (fig. 36a) extraite de ce bois. Ces bandes diminuent nettement sur le spectre IR (fig. 36c) du résidu 3 après l'extraction à l'acétone et, elles disparaissent pratiquement, excepté

un épaulement à 1515 cm^{-1} , sur le spectre IR du résidu 1 (fig. 36d). On démontre ainsi que le traitement 1 plus sévère que le traitement 3 permet de solubiliser une quantité plus importante de lignine et justifie les chiffres du tableau 13. Ces spectres IR indiquent clairement que les quantités de lignines résiduelles (surtout pour le résidu 1) sont très faibles.

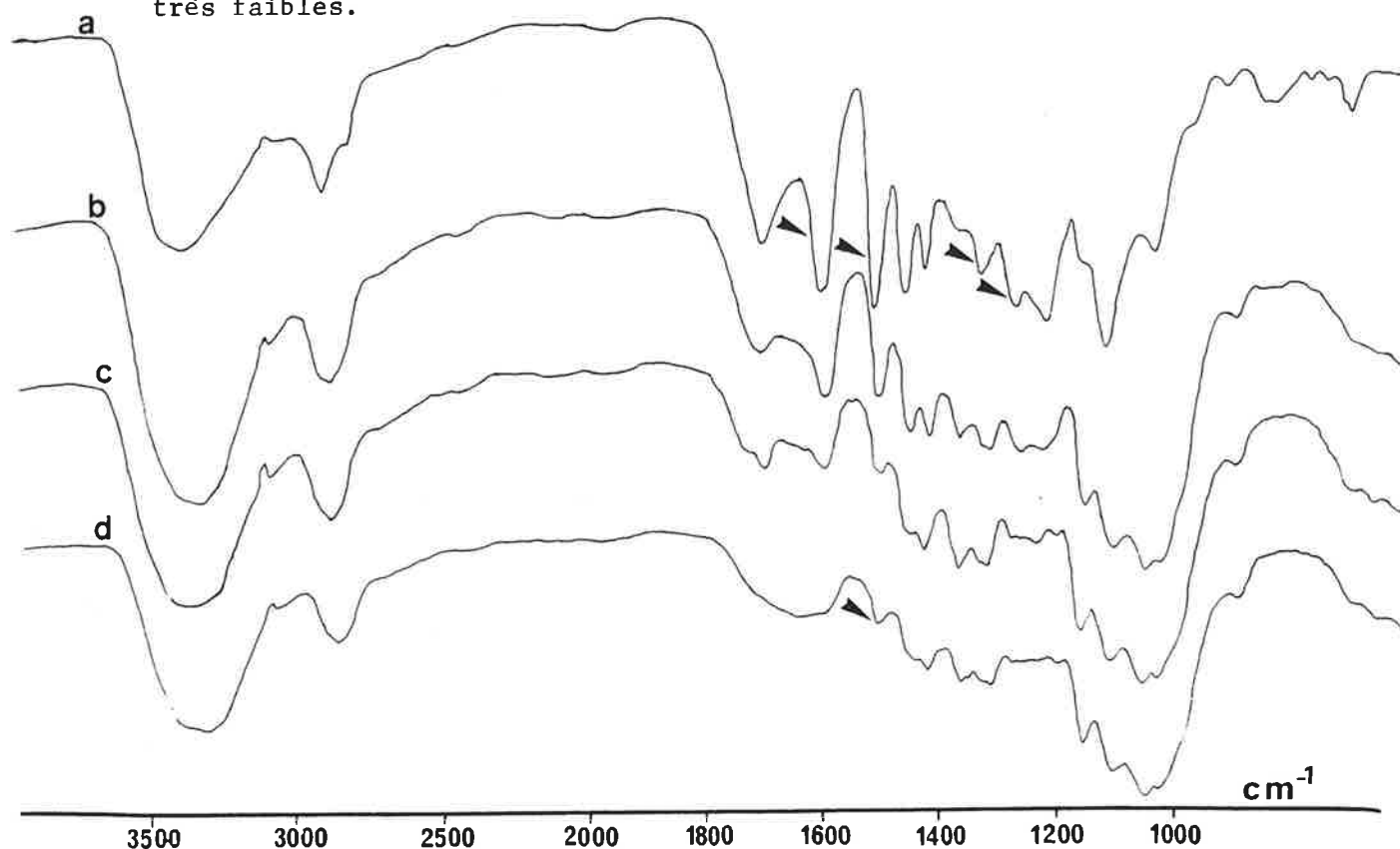


Figure 36 : Spectres infrarouges des résidus lignocellulosique 3 et 1 extraits ou non à l'acétone. a) extrait à l'acétone (lignine C) ; b) résidu 3 extrait à l'eau ; c) résidu 3 extrait à l'eau puis à l'acétone ; d) résidu 1 extrait à l'eau puis à l'acétone

A la suite de l'extraction par l'acétone, des extractions répétées par le mélange dioxanne-eau permettent d'obtenir quelques pour cents de matériel supplémentaires. L'épaulement à 1515 cm^{-1} que l'on observe sur le spectre IR du résidu n° 1 extrait à l'acétone devient à peine discernable après les extractions au dioxanne-eau. Les spectres infrarouges (fig. 37) des produits ainsi extraits par le dioxanne-eau indiquent la présence d'hydrates de carbone repérables par des bandes intenses et larges à 1700 et 1050 cm^{-1} . La séparation par partage de phases mise au point par K. Lundquist et coll (142) permet de séparer par centrifugation une phase aqueuse riche en contaminants osidiques libres et une phase organique contenant la lignine. Les spectres IR de

la figure 37 se rapportant à l'échantillon 3 illustrent l'efficacité de ce protocole de purification.

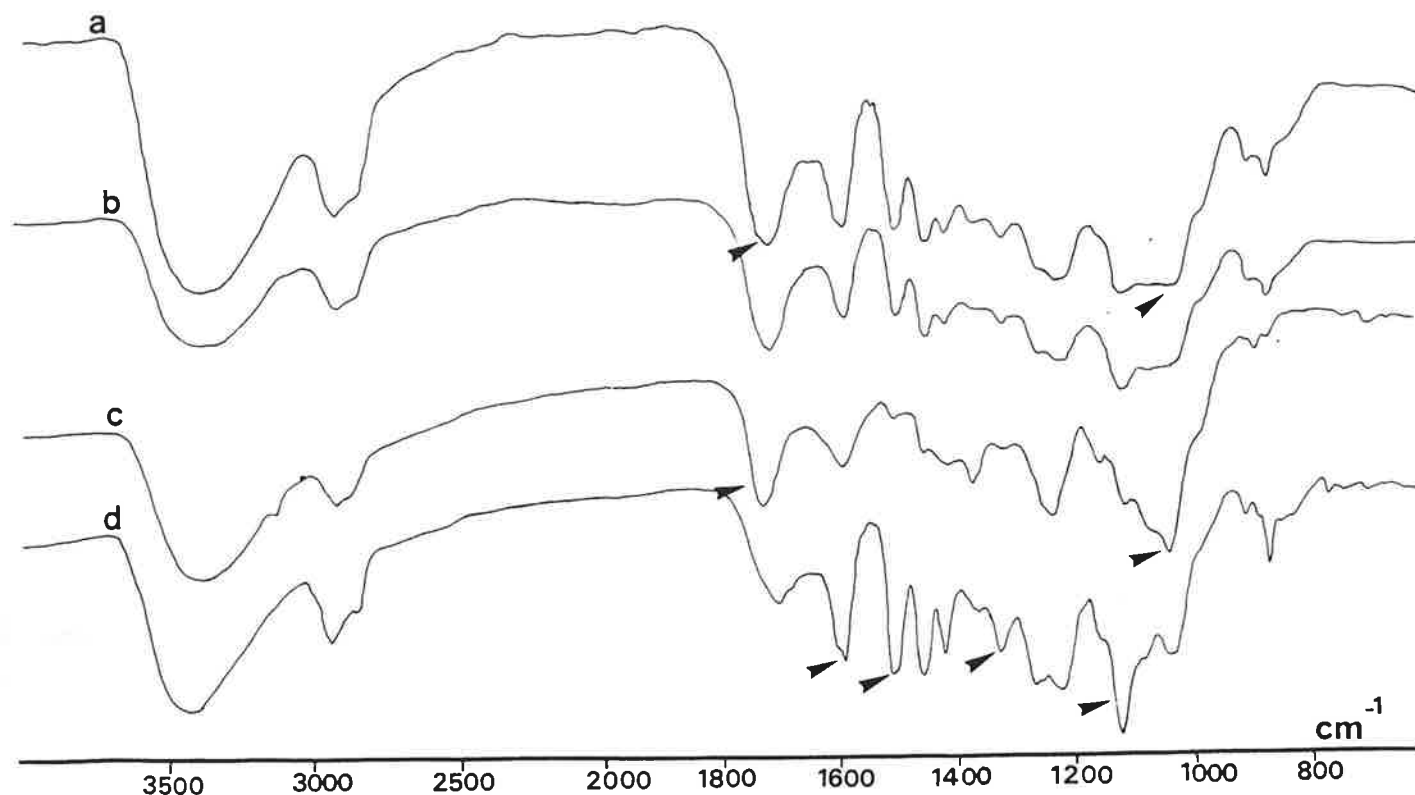


Figure 37 : a et b spectres infrarouges des extraits au dioxanne-eau du résidu n° 3 pré-extrait à l'eau puis à l'acétone, c et d spectres IR de la phase aqueuse et de la phase organique obtenues par séparation par partage de phase (142) des extraits au dioxanne-eau.

La lignine ainsi préparée a un spectre IR (fig. 37d) plus proche de la lignine MWL du peuplier non traité (fig. 57a) que de la lignine C du même échantillon n° 3 extrait à l'acétone (fig. 36a). En effet, les bandes (IR) caractéristiques des unités syringyles, des liaisons éthers et des unités gâïacyles non condensées (voir le tableau 14 pour ces différentes attributions) sont plus importantes, si l'on considère la bande $1500 - 1510 \text{ cm}^{-1}$ comme référence, sur le spectre IR 37d que sur le spectre 36a. De ce fait son spectre est très similaire à celui de la lignine MWL de peuplier.

Nous pouvons conclure que l'acétone permet d'extraire la quasi totalité de la lignine, la lignine extraite C apparaît très peu contaminée par les hydrates de carbone. Une fraction de la lignine résiduelle

peut être extraite par le mélange dioxanne-eau mais nécessite une étape de purification afin d'en séparer les hydrate de carbones qui sont également solubilisés.

L'extraction directe par l'acétone (voie D) des bois traités n'a pas été retenue pour l'extraction des lignines car elle présente l'inconvénient de solubiliser une partie des monosaccharides essentiellement du xylose (tab. 25) et demande alors une étape de purification. De plus, l'étude du résidu cellulosique nécessite une étape d'extraction à l'eau pour le débarrasser des sucres solubles.

II.15 Fractionnement des extraits de lignines par précipitation dans l'éther éthylique

Dans une étude préliminaire effectuée par G. Escoffier et coll. (143) au CERMAV (Centre d'Etude et de Recherche des Macromolécules Végétales) il apparaissait qu'une partie du bois traité pouvait être solubilisée par l'éther éthylique. De la même façon, nous avons montré qu'une partie des extraits (acétylés ou non) à l'acétone ou au dioxanne-eau reste en solution lors de leur précipitation dans l'éther éthylique. Nous constatons que les extraits solubles dans l'éther éthylique constituent 30 à 40 % des extraits totaux (tab. 17).

Les fractions ainsi définies solubles (SE) et insolubles (IE) dans l'éther éthylique ont des spectres en RMN de ^{13}C nettement différents (fig. 41). L'analyse en chromatographie sur gel perméable effectuée au paragraphe III.421 montre que les fractions IE contiennent les polymères tandis que les monomères, dimères, trimères et oligomères restent en solution dans l'éther éthylique. Cette simple précipitation dans l'éther éthylique permet donc de définir deux fractions distinctes.

III.2 ANALYSE QUALITATIVE EN RMN DU ^{13}C DES LIGNINES EXTRAITES DE BOIS TRAITES PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE. APPORTS DE LA RMN ^1H ET DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

L'attribution des signaux d'absorption en RMN du ^{13}C des échantillons de lignines étudiées a été menée, pour l'essentiel, à partir des analyses RMN de composés modèles de lignines. Différentes

tables pour l'attribution des signaux RMN de lignines extrêmement diverses (MWL, industrielles, ...) ont été ainsi établies. Basées sur les travaux antérieurs, les attributions (tableau 28, p. 190 à 195) que nous proposons sont enrichies des renseignements structuraux apportés par les nouvelles séquences multi-impulsionnelles présentées au chapitre précédent, et des attributions discutées dans le présent chapitre.

III.21 Analyse qualitative des spectres en RMN ^{13}C

Evolution générale des échantillons selon la sévérité du traitement

Les figures 38 et 39 présentent des spectres RMN du ^{13}C découplés des protons des échantillons de lignines A et B extraites de bois traités selon les deux plans d'expériences PI et PII. Ces deux plans et la préparation des échantillons ont été décrits précédemment. Rappelons simplement que ces échantillons représentent des extraits au dioxanne-eau des bois traités. Les lignines sont récupérées par précipitation dans l'eau. Le spectre MWL est celui d'un échantillon de lignine du même bois de peuplier extrait et purifié selon le protocole de Björkman (61). Cette lignine est généralement considérée d'un point de vue structural comme représentative d'une partie de la lignine "in situ". Nous utilisons son spectre RMN comme référence. Les spectres présentés, enregistrés de manière quantitative, sont tout à fait caractéristiques de lignines. Nous pouvons en distinguer les principales régions classiquement attribués.

- la région des signaux des carbones aromatiques entre 156 et 100 ppm.

- la région des signaux des carbones aliphatiques liés à des oxygènes entre 90 et 56 ppm.

- le signal des carbones méthoxyliques à 56 ppm.

- une région à champ fort de signaux, plus ou moins intenses selon les échantillons, attribuée aux carbones aliphatiques saturés.

- une région à champ faible due aux signaux des carboxyles (env. 170 ppm) et des carbonyles (env. 190 ppm) parfois difficiles à repérer.

En première approximation, on retrouve tous les signaux du spectre MWL caractéristiques d'unités phénylpropanoïques incluses dans des structures alkyl-aryl éther β -0-4. En revanche, les intensités des signaux varient fortement d'un spectre à l'autre, en particulier ceux attribués aux structures alkyl-aryl éther, aux unités parahydroxybenzoïques, et aux chaînes aliphatiques saturées. On note également un élargissement des signaux lorsque les conditions deviennent plus sévères.

Nous allons préciser ces différents points.

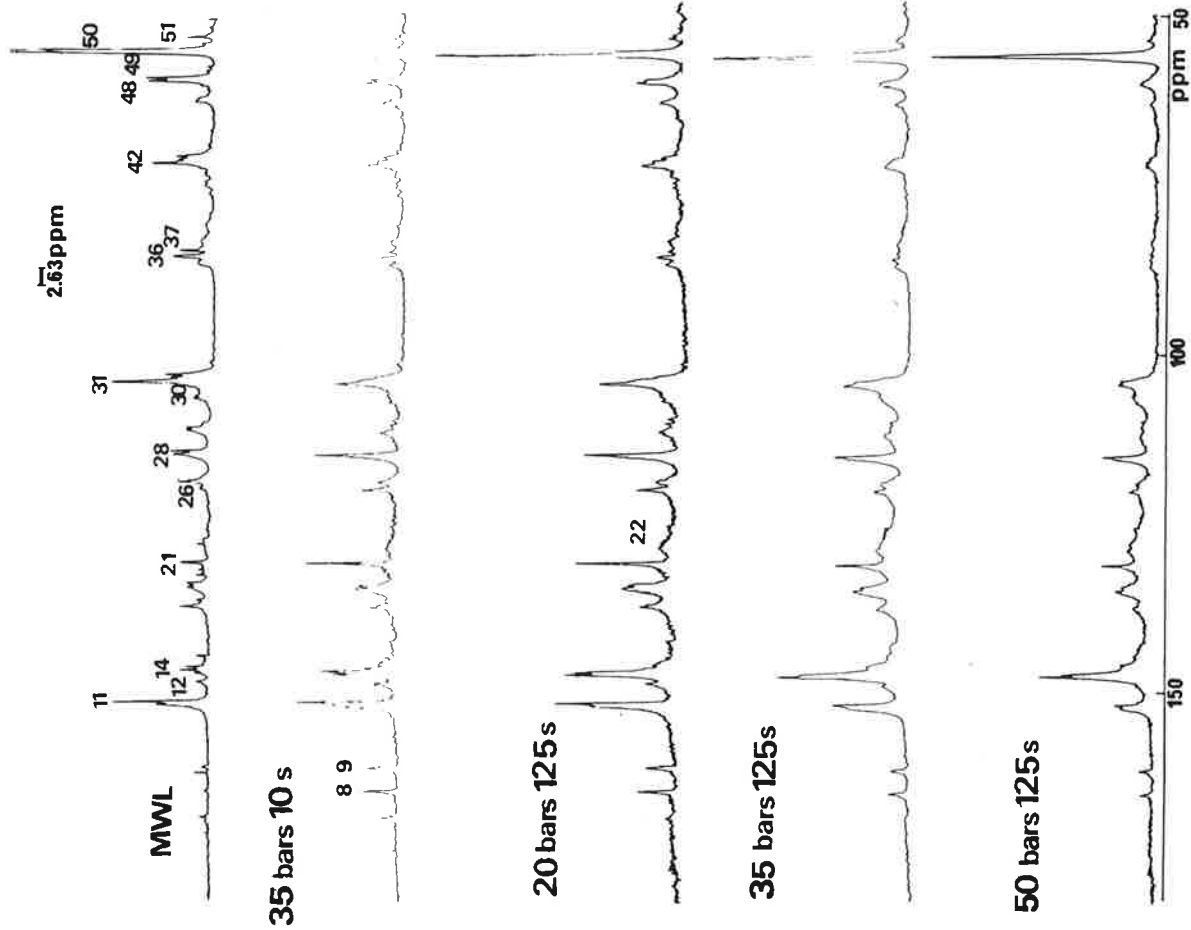


Figure 38 : Spectres RMN ^{13}C , enregistrée avec la séquence CI, des lignines A (fig. 33) extraites des bois traités selon le plan d'expérience PI (pression constante = 40 bars, durée des traitements variables).

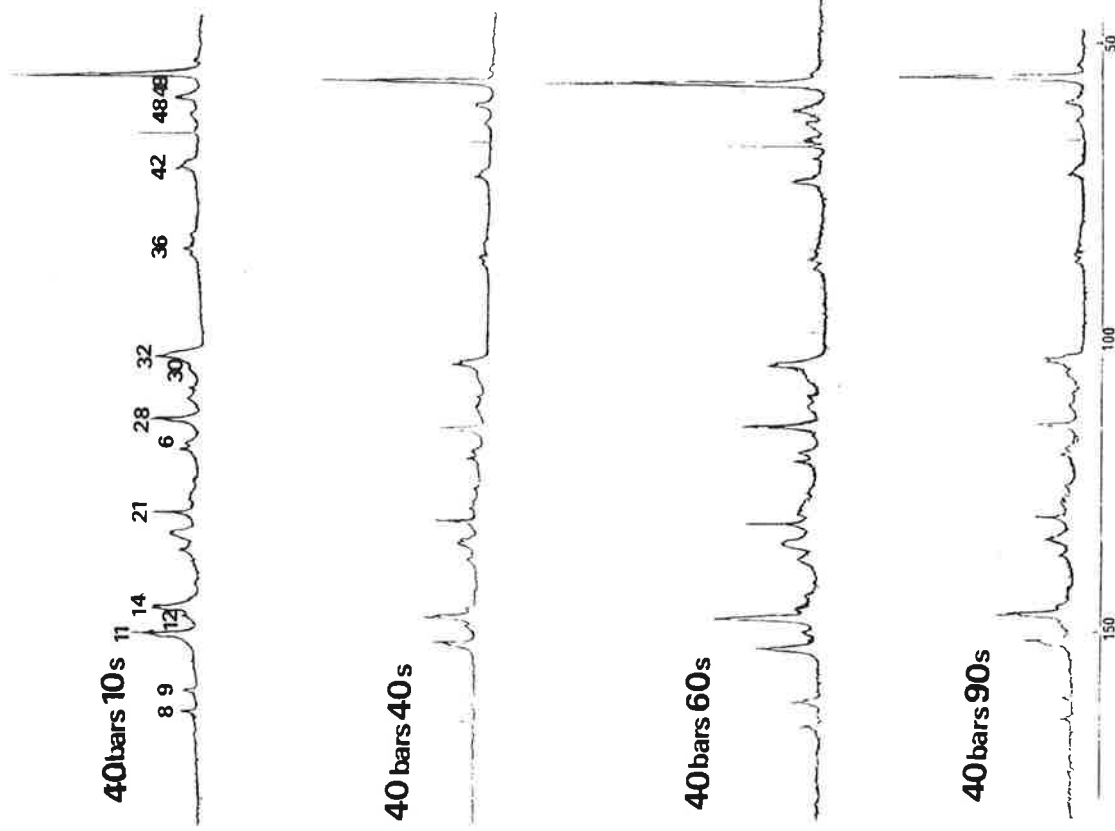


Figure 39 : Spectres RMN ^{13}C , enregistrés avec la séquence CI, des lignines B (fig. 33) extraites de bois traités selon le plan d'expérience PII (pression et durée des traitements variables).

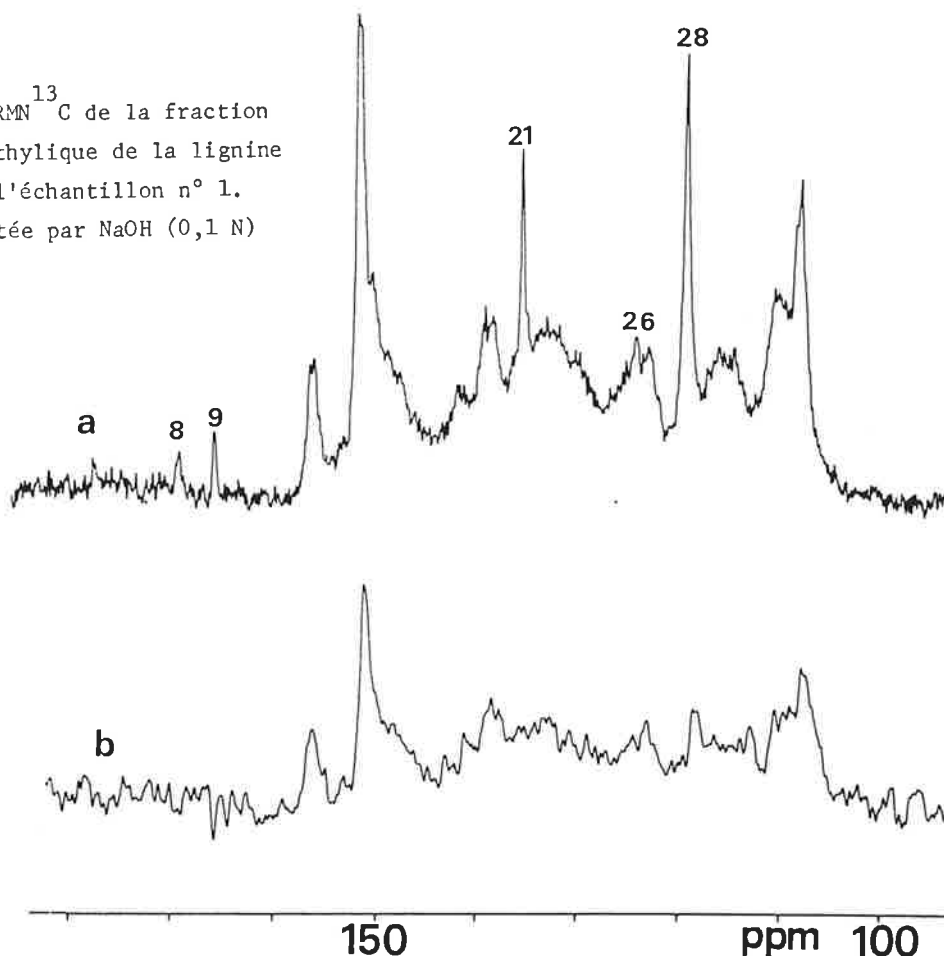
III.211 Structures alkyl-aryl éther

Les signaux (n° 36 à 49) des carbones de la chaîne aliphatique décroissent fortement lorsque les conditions de traitement deviennent plus sévères. Cela traduit une diminution du nombre des carbones aliphatiques inclus dans les liaisons alkyl-aryl éther β -O-4. Ce point est confirmé par la diminution du signal n° 11 des carbones C-3 et C-5 des unités syringyle éthérifiées en position 4, et une augmentation très nette du signal n° 14 attribué, entre autre, à ces mêmes carbones, mais avec un hydroxyle libre en position 4.

III.212 Structures parahydroxybenzoïques

Les spectres ^{13}C des lignines extraites de bois modérément traités (n° 4, n° 5) présentent 2 signaux n° 21 et 28 à 131 et 115,1 ppm, plus intenses que dans le spectre de référence. Ces signaux sont attribuables pour le signal n° 21 aux carbones C-2 et C-4 et pour le signal 28 aux carbones C-3 et C-5 des unités parahydroxybenzoïques. Les signaux 8,9 et 26 attribuables aux carbones C-G, C-4 et C-1, évoluent de la même façon. Il est important de déterminer, dans les échantillons étudiés, si

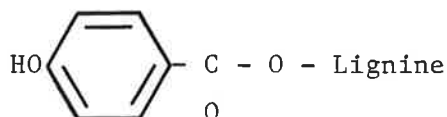
Figure 40 : Spectres RMN ^{13}C de la fraction insoluble dans l'éther éthylique de la lignine extraite à l'acétone de l'échantillon n° 1.
a) non traitée ; b) traitée par NaOH (0,1 N)



ces structures sont libres ou liées, et dans ce dernier cas, quel est le type de la liaison (éther ou ester).

Une partie de ces structures se trouve en fait sous la forme d'acide libre. En effet les extraits aqueux des bois traités mais aussi les extraits au dioxanne-eau (lignines A et B sur les figures 38 et 39) réalisés ensuite révèlent la présence d'acide parahydroxybenzoïque libre en chromatographie sur couche mince ($R_f = 0,32$, éluant : toluène - dioxanne - acide acétique (90 : 25 : 4)). Le signal n° 7 bien visible surtout sur les spectres RMN des lignines B (extraction à l'eau rapide) peut donc être attribué au carbone C-1 de l'acide parahydroxybenzoïque libre. Après précipitation dans l'éther de ces extraits totaux, on identifie l'acide parahydroxybenzoïque libre uniquement dans la fraction soluble dans l'éther éthylique (fig. 41b et d). La partie insoluble centrifugée et lavée plusieurs fois à l'éther éthylique ne révèle en chromatographie sur couche mince aucune trace de l'acide parahydroxybenzoïque libre. Malgré la disparition du signal n° 7 les autres signaux caractéristiques sont toujours présents dans les spectres RMN de ces fractions précipitées dans l'éther.

Sur ces fractions précipitées dans l'éther éthylique, seul un traitement à la soude de 2N pendant une nuit, suivi d'une précipitation dans l'eau puis dans l'éther éthylique entraîne la disparition des signaux (fig. 40b). Dans l'extrait à l'éther éthylique des eaux de précipitation, on identifie alors en CCM l'acide parahydroxybenzoïque. Cette hydrolyse démontre ainsi que les unités parahydroxybenzoïques présentes dans les fractions insolubles à l'éther sont liées au polymère par des liaisons esters du type :



Les déplacements chimiques de l'ester éthylique de l'acide parahydroxybenzoïque (§ II.331) confirme cette conclusion.

III.213 Signaux de carbones aliphatiques saturés à haut champ

Les extraits totaux de lignines présentent de nombreux signaux dans la région des carbones aliphatiques saturés (40 à 10 ppm). De tels signaux ont déjà été signalés par R.H. Marchessault (30) sur les spectres RMN de lignines de bois de peuplier traité par autohydrolyse rapide et par J.A. Hemmingson (32) sur des échantillons provenant du traitement du bois de pin par autohydrolyse rapide. Les échantillons qu'ils étudient sont des extraits totaux, aucune étape de fractionnement ou purification par précipitation n'est mentionnée. J.A. Hemmingson avance néanmoins l'hypothèse selon laquelle de tels carbones se formeraient au cours du traitement à partir du maillon propane : or, quelque soit l'échantillon de bois extrait, on constate que seules les fractions de lignines (acétylées ou non) solubles dans l'éther éthylique, présentent de tels signaux (fig. 41).

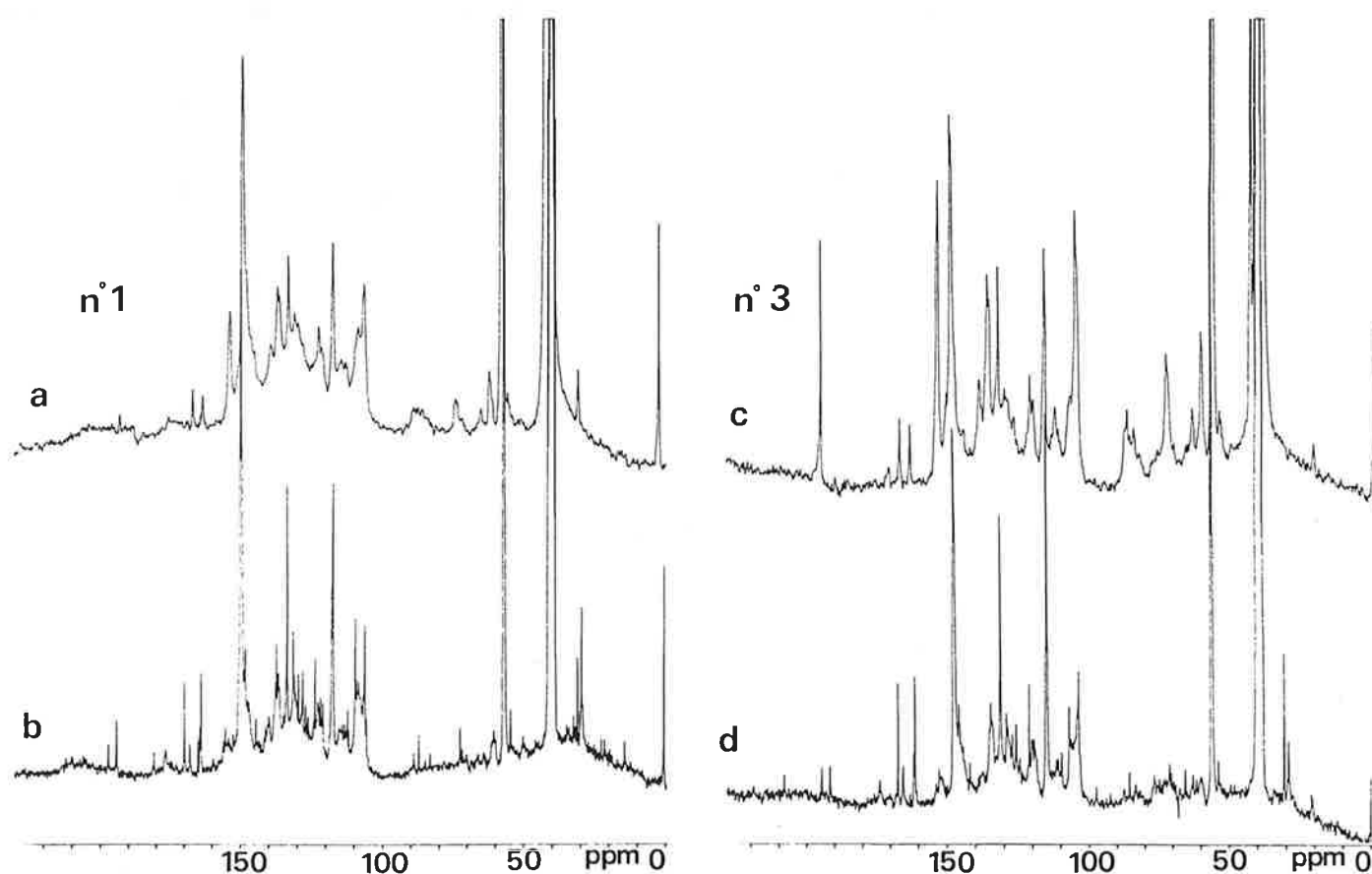


Figure 41 : Spectres RMN¹³C des fractions IE et SE obtenues par précipitation dans l'éther-éthylique des lignines C (fig. 33) des échantillons 1 et 3. a) fraction IE de l'échantillon 1 ; b) fraction SE de l'échantillon 1 ; c) fraction IE de l'échantillon 3 ; d) fraction SE de l'échantillon 3.

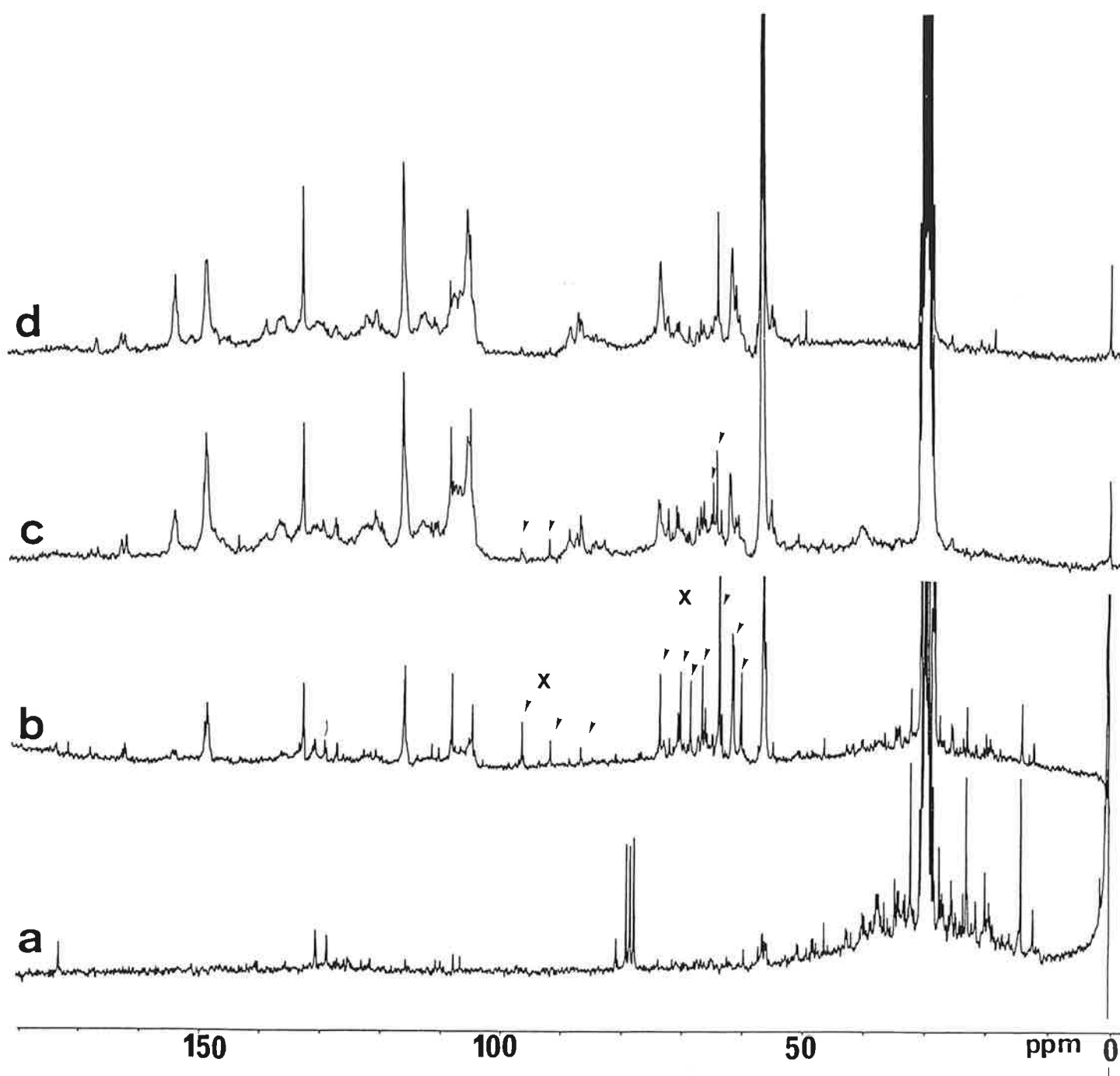


Figure 42 : Spectres RMN^{13}C des fractions obtenues en extrayant successivement la lignine D (fig. 33) de l'échantillon E_{56} (40 bars, 90 sec.) par l'hexane (a), le dichlorométhane (b), l'éther éthylique (c) et le méthanol (d).

En outre, sur l'extrait D au dioxane-eau de l'échantillon de bois traité E₅₆ (40 bars pendant 90 secondes) non précipité dans l'eau, nous avons procédé à un fractionnement de l'échantillon en l'extrayant successivement à froid par différents solvants de polarité croissante hexane, dichlorométhane, éther éthylique, méthanol. Les spectres RMN de ces fractions sont présentés sur la figure 42. Il apparaît clairement que ces structures s'accumulent principalement dans la fraction extraite par l'hexane et en partie dans celle extraite par le dichlorométhane. En revanche aucun signal de ce type de carbone n'apparaît dans les spectres ¹³C des fractions extraites à l'éther éthylique et au méthanol (fig. 42c,d).

Nous démontrons ainsi que les signaux fins, apparaissant, à champ fort, dans les extraits totaux sont dus aux absorptions de carbones qui n'appartiennent pas aux enchaînements phénylpropanoïques caractéristiques des lignines, et doivent être considérés comme des contaminants. En effet, les données de la littérature (108, 144) permettent d'attribuer ces signaux à ceux d'enchaînements $(CH_2)_n - CH_3$ typiques d'acide gras d'hydrocarbures saturés. De plus, on retrouve un spectre identique lorsque l'on analyse en RMN la fraction extraite du bois de *Populus trémuloïdes* par le mélange éthanol-benzène 1:2), et insoluble dans le mélange dioxane-eau (acides gras). D'une manière générale, les spectres d'extractibles donnés dans la littérature (145) présentent également de tels signaux à champ fort. On remarque que la fraction extraite au dichlorométhane contient de nombreuses absorptions, notées X, attribuées aux hydrates de carbone.

III.22 Interprétation de l'élargissement des signaux en RMN ^{13}C des lignines extraites de bois traités par autohydrolyse rapide

Si l'on compare les spectres des échantillons de lignines des bois traités par autohydrolyse avec le spectre de la lignine MWL, on constate une perte de résolution des signaux des premiers. Des raies larges apparaissent par exemple entre 120 et 130 ppm. Ces raies larges se superposent aux raies fines attribuables aux carbones de structures connues. Cette allure des spectres est d'autant plus marquée que les conditions de traitement des bois sont plus sévères (fig. 38, 39).

Dans le cas des lignines que nous étudions nous pouvons proposer deux interprétations à l'observation de raies larges sur les spectres RMN ^{13}C :

- mise en évidence de temps de relaxation transversale (T_2) courts,
- mise en évidence d'une hétérogénéité importante des déplacements chimiques.

La largeur à mi-hauteur ($\Delta_{1/2}$) d'un signal d'absorption qui se présente sous la forme d'une courbe de Lorentz dépend théoriquement du temps de relaxation transversale intrinsèque T_2 avec $\Delta_{1/2} = 1/\pi T_2$

En fait, en raison des effets d'inhomogénéité du champ magnétique B_0 on a un temps de relaxation effectif T_2^* qui diffère généralement du temps de relaxation intrinsèque et on a une largeur de raie telle que $\Delta_{1/2} = 1/\pi T_2^*$. Pour des T_2^* courts les raies observées sont larges et au contraire pour des T_2^* longs les raies observées sont fines. Au paragraphe nous avons décrit l'expérience d'écho spin qui permet de déterminer les différentes valeurs de T_2 . On peut par cette même expérience séparer des raies fines de raies larges. Pour ce faire, nous avons utilisé le programme (CPMG.AU 1985) proposé par la compagnie BRUKER pour mesurer les T_2 des protons en ajoutant le découplage large bande des protons pendant la durée d'acquisition.

Nous avons par ce programme cherché à supprimer les raies larges en augmentant progressivement la durée totale des échos. Les figures 43 et 44 montrent l'évolution des spectres d'une lignine MWL de peuplier enrichie en ^{13}C et d'une lignine extraite de bois traité par autohydrolyse rapide, lorsque la durée des échos de spins est progressivement allongée

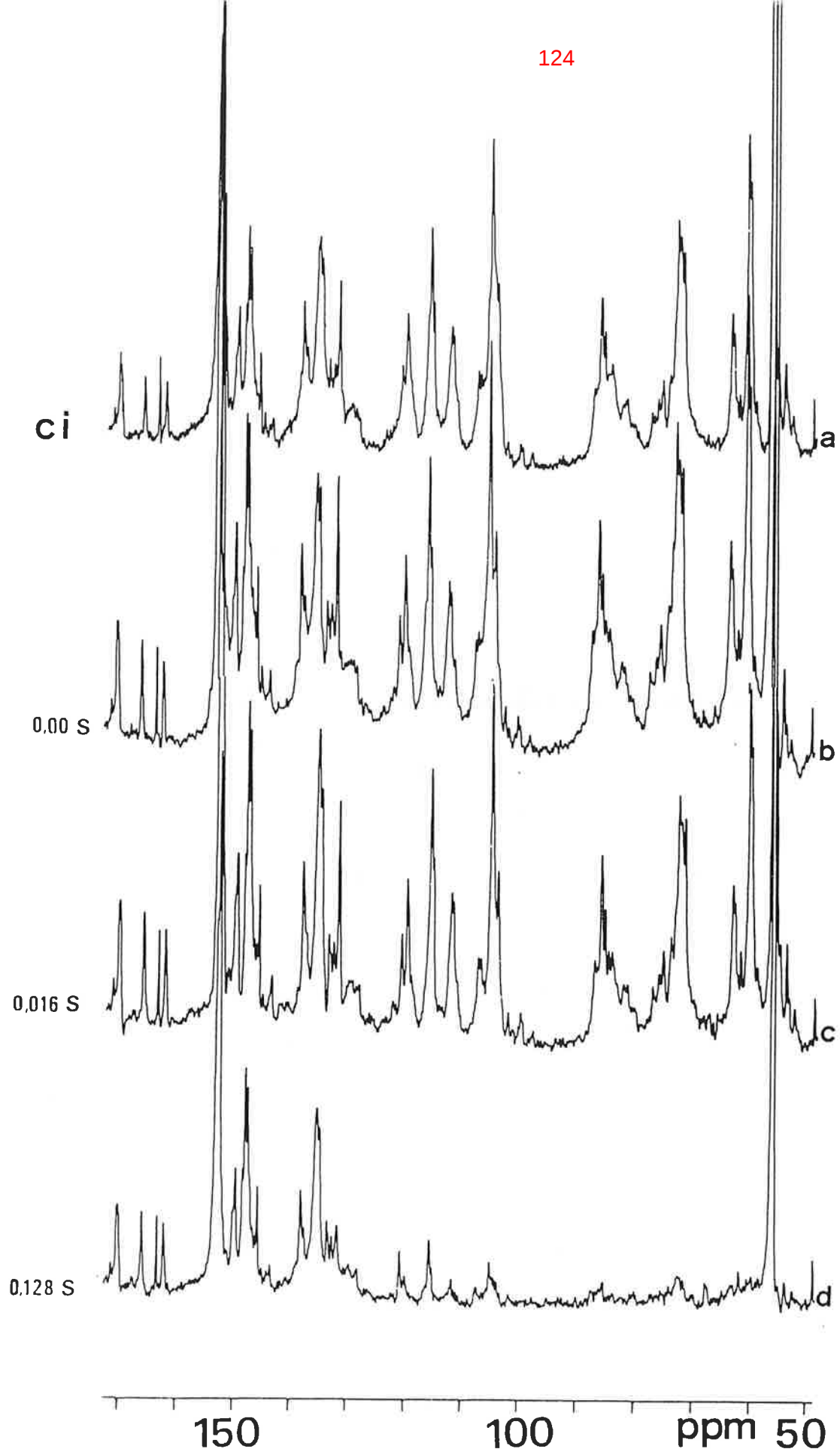


Figure 43 : Expérience d'écho de spin en RMN¹³C sur une lignine standard MWL. b-d) spectres RMN¹³C enregistrés pour des échos de durée différente ; a) spectre enregistré avec la séquence CI.

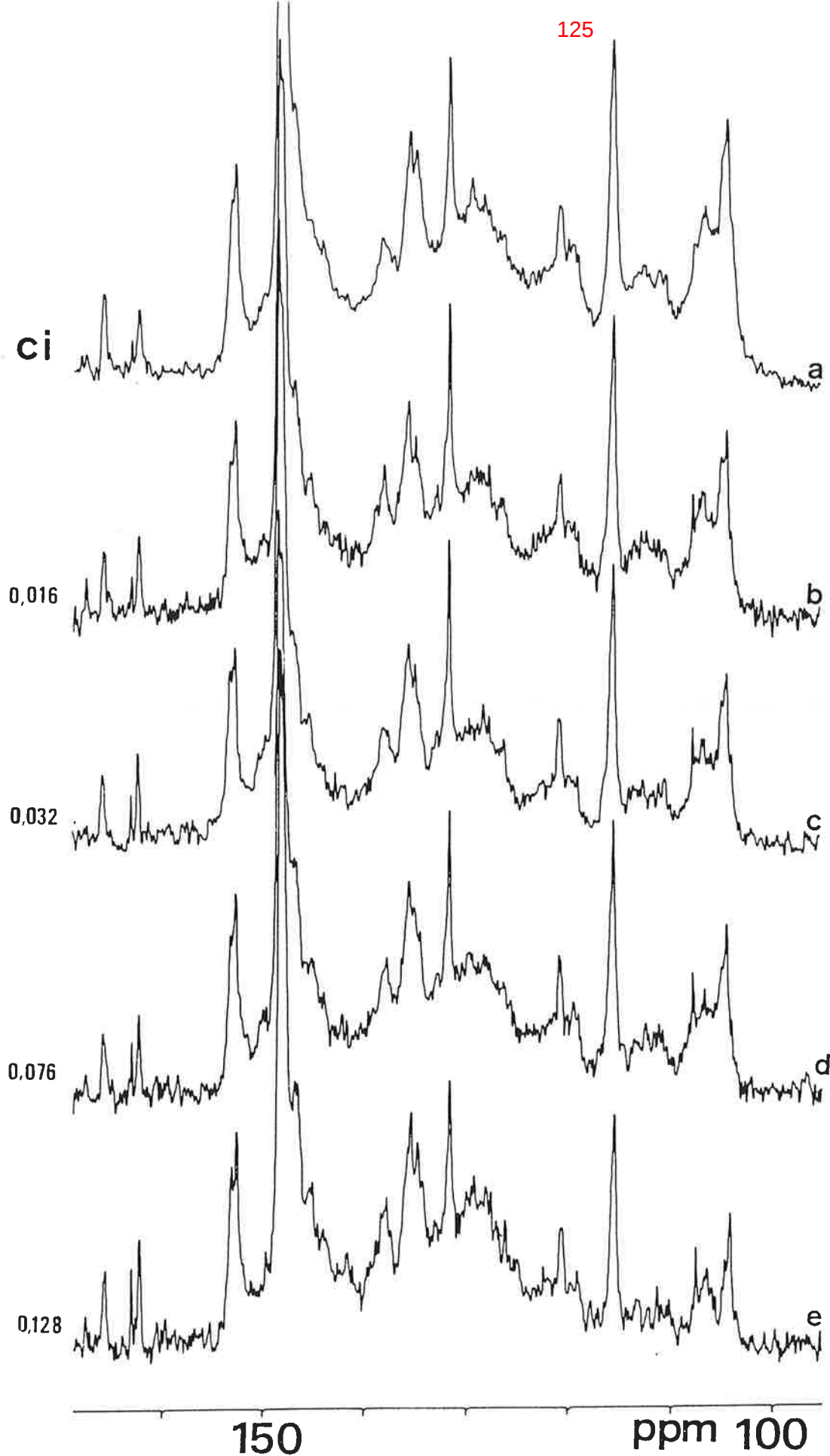


Figure 44 : Expérience d'écho de spin en RMN ^{13}C sur la lignine B de l'échantillon n° 2 (35 bars, 240 secondes). b-e) spectres RMN ^{13}C enregistrés pour des échos de durée différente ; a) spectre enregistré avec la séquence CI.

Sur l'échantillon de lignine enrichie en ^{13}C , il est possible par cette méthode de supprimer les bases larges des signaux des carbones aromatiques pour un délai total de 16 ms. Nous mettons en évidence deux types de carbones aromatiques : ceux à T_2 courts qui donnent des raies élargies et ceux à T_2 plus longs qui donnent les raies fines.

Cela traduirait l'existence de carbones appartenant respectivement à des structures plus rigides, plus réticulées dans la macromolécule et à des structures plus mobiles, des extrémités de chaînes par exemple. En revanche, tous les essais faits sur des lignines extraites de bois traités par autohydrolyse rapide n'ont pas donné ce résultat et montrent un comportement homogène des signaux : lorsque l'on augmente la durée des échos de spins, l'intensité des signaux décroît jusqu'à s'annuler, mais on n'observe pas de modification de la largeur de ces raies.

Les raies larges observées sur les spectres de lignines de bois traités par autohydrolyse rapide ne sont donc pas le fait de l'absorption de carbones à T_2 courts mais celui d'une large distribution d'absorption de carbones à T_2 longs.

Nous montrons ainsi que les lignines libérées par l'autohydrolyse rapide des bois présentent une grande variété d'environnements chimiques qui se traduit par la distribution des signaux d'absorption en massifs larges.

On constate que cette méthode permet également de discerner les signaux des carbones quaternaires entre environ 125 et 158 ppm, des autres types de carbones qui ont des temps de relaxation T_2 et T_1 nettement plus courts, donc des signaux qui s'annulent rapidement.

III.23 Contaminants osidiques - Apport de la RMN ^1H

Les spectres des lignines A et B (fig. 38 et 39) ne permettent pas de repérer entre 90 et 104 ppm les signaux classiquement attribués aux carbones des hydrates de carbone, notamment au carbone anomère C-1 du xylose (132), constituant majoritaire des hémicelluloses du peuplier. De tels signaux sont visibles sur les spectres RMN ^{13}C des complexes

lignine - hydrates de carbone (LCC) isolés par R. Kesraoui de bois de peuplier traité par autohydrolyse rapide (87). Pour notre part, nous avons vérifié que les eaux d'extraction des bois traités et les eaux de précipitation des extraits au dioxanne-eau présentent des absorptions dans cette région. Lorsque l'on omet l'étape de précipitation dans l'eau on retrouve évidemment ces signaux sur les spectres ^{13}C des extraits totaux. On peut alors obtenir une fraction dans laquelle les contaminants osidiques dominant en extrayant par le dichlorométhane le précédent extrait séché (fig. 42b).

L'extraction préalable à l'eau des échantillons de bois traité et la précipitation dans l'eau des extraits de lignines permettent donc d'éliminer efficacement les hydrates de carbones libres et les éventuels complexes lignine - hydrates de carbone.

La RMN du proton beaucoup plus sensible que la RMN du ^{13}C ne fait que confirmer la quasi absence des unités xyloses dans les échantillons. En effet, sur la figure 45 nous présentons les spectres ^1H des lignines n° 1 et 3 acétylées et précipitées dans l'éther éthylique. Le xylose est repérable dans l'échantillon de lignines MWL par le signal à 5,05 ppm attribué par K. Lundquist et coll. (95, 96) aux protons H_3 de la xylane acétylée. Il est beaucoup moins intense sur le spectre de la lignine n° 3 et inexistant pour la lignine n° 1.

Cela confirme tout à fait le dosage des sucres dans les échantillons de lignines B extraites effectué à l'Ecole Française de Papeterie qui montrent que pour des conditions de traitement supérieures à (25 bars pendant 45 secondes) le taux des sucres identifiés est inférieur à 1,5 % ; le xylose est dans tous les cas le sucre majoritaire.

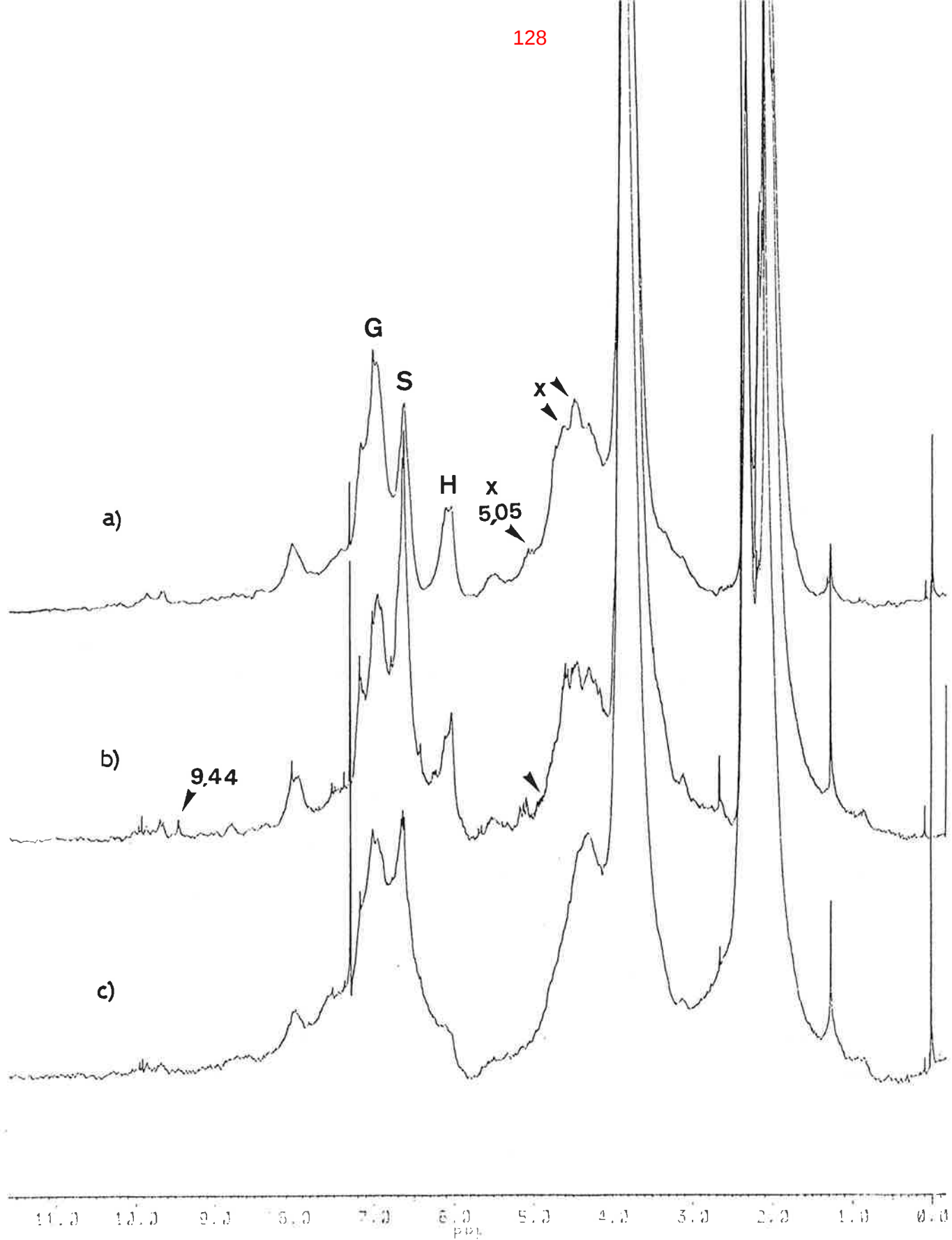


Figure 45 : Spectres RMN ^1H des lignines acétylées, solubilisées dans CDCl_3 ; a) lignine standard MWL ; b) échantillon n° 3 ; c) échantillon n° 1.
X signaux des unités xylose ; H, G, S signaux des unités parahydroxybenzoïques, gâiacyles et syringyles.

III.24 Apports des expériences DEPT dans l'étude qualitative des lignines extraites des bois traités par autohydrolyse rapide

En RMN du ^{13}C l'expérience DEPT permet d'enregistrer sélectivement les spectres des carbones tertiaires, secondaires, ou primaires. Les spectres des carbones quaternaires sont obtenus par différence ou en utilisant une séquence spécifique QUAT.

III.241 Région des signaux de carbones aromatiques

a) carbones des unités aromatiques

Les figures 46-47 présentent les différents spectres enregistrés pour deux échantillons de lignines représentatifs du plan d'expérience PII ; l'échantillon 4, dont les conditions de traitement sont modérées (25 bars, 45 sec.) et l'échantillon 8 traité nettement plus sévèrement (50 bars, 125 sec.).

On distingue ainsi parfaitement les signaux des carbones quaternaires des signaux de carbones tertiaires dans la région attribuée aux carbones aromatiques. Le massif 22 entre 128 et 134 ppm est donc principalement constitué des signaux de carbones quaternaires.

La figure 48 donne les spectres des carbones quaternaires enregistrés avec la séquence QUAT de la lignine de référence et de quelques lignines de bois traités par autohydrolyse rapide. Le massif 22 apparaît d'autant plus important que les conditions de traitement sont sévères. Il est d'ailleurs insignifiant sur le spectre de la lignine MWL de référence.

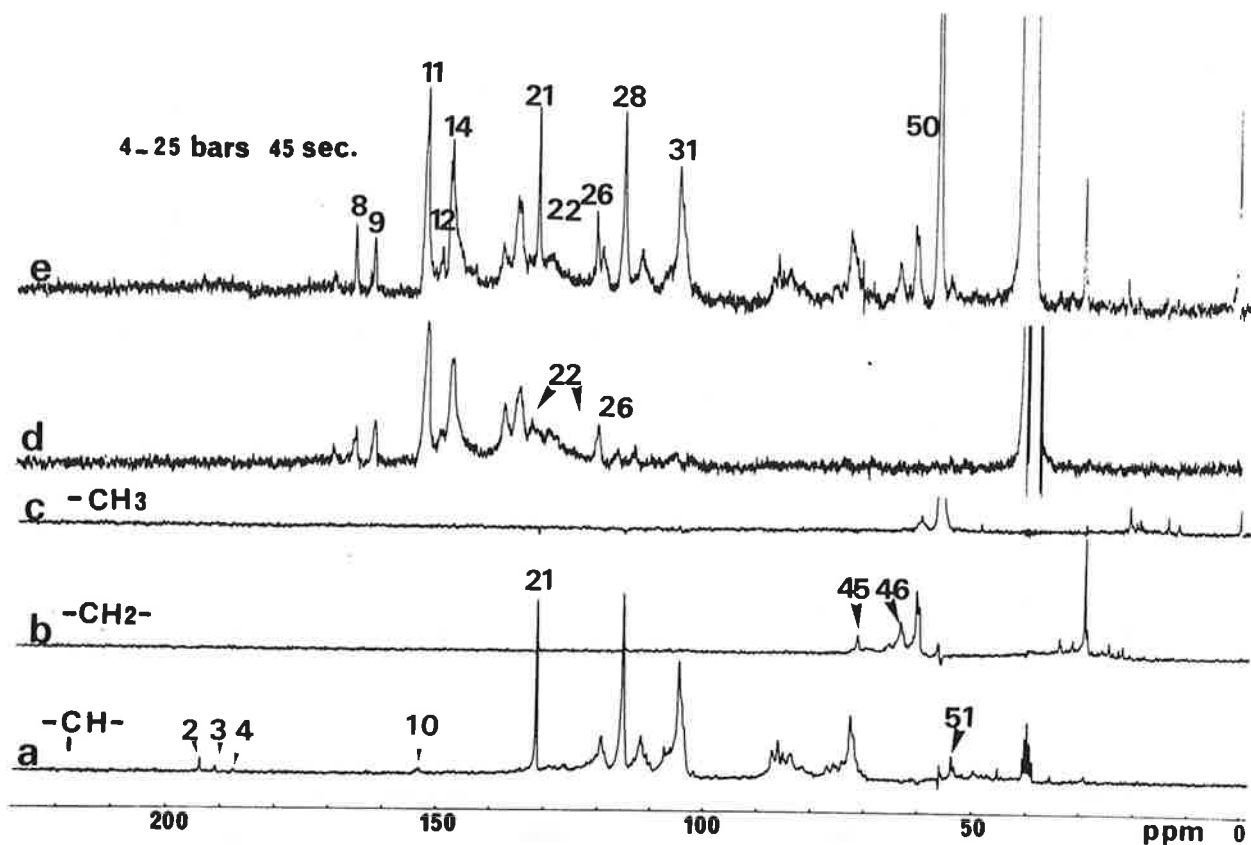


Figure 46 : Lignine B (fig. 33) de l'échantillon 4 (25 bars, 45 sec.). a, b et c : spectres CH, CH₂ et CH₃ enregistrés avec l'expérience DEPT ; d : spectre des carbones quaternaires enregistré avec l'expérience QUAT ; e : spectre total enregistré avec la séquence CI.

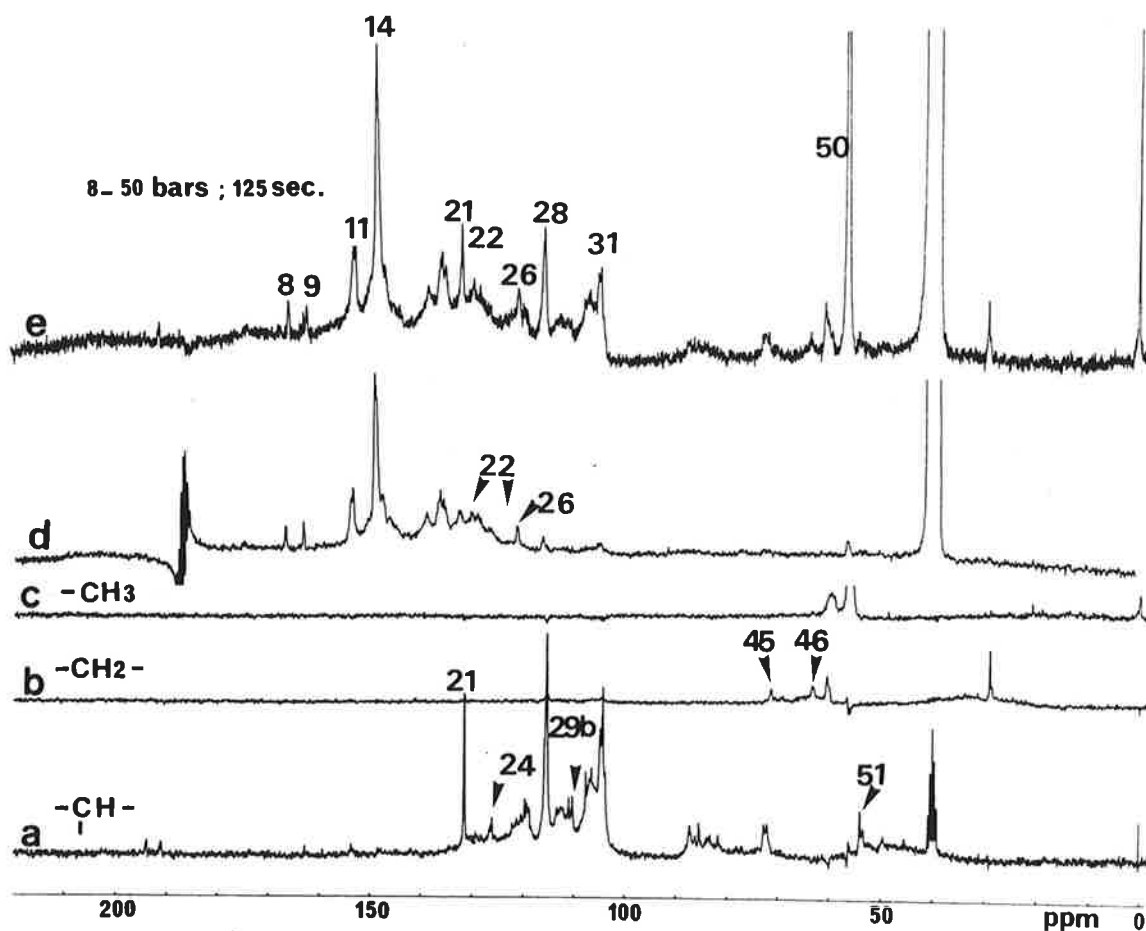


Figure 47 : Lignine B (fig. 33) de l'échantillon n°8 (50 bars, 125 sec.). a, b et c : spectres CH, CH₂ et CH₃ enregistrés avec l'expérience DEPT ; d : spectre des carbones quaternaires enregistré avec l'expérience QUAT ; e : spectre enregistré avec la séquence CI.

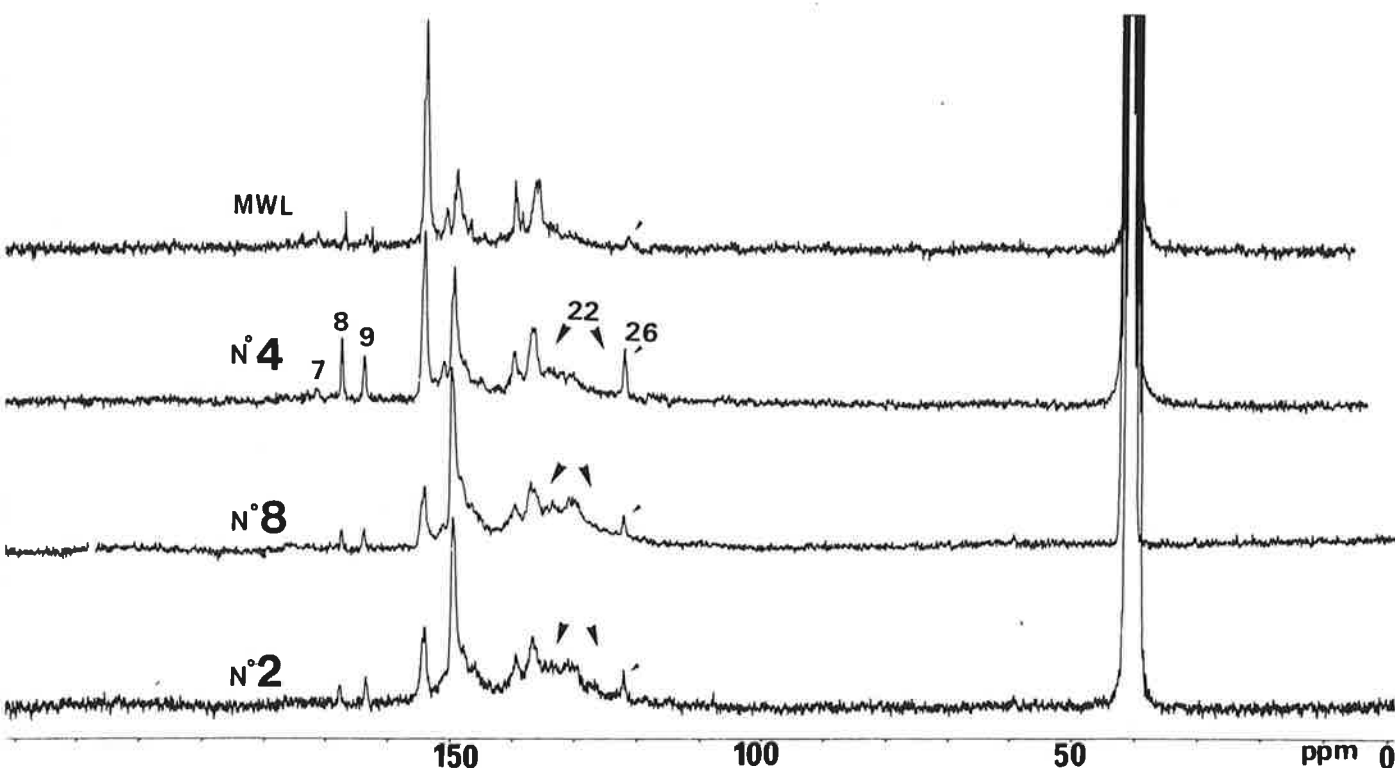
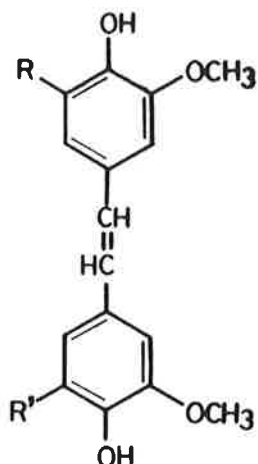


Figure 48 : Spectres de carbones quaternaires, enregistrés avec la séquence QUAT, de la lignine de référence MWL et de lignines B (fig. 33) extraites de bois traité n° 8, 4 et 2.

b) unités stilbènes

Le massif 22 des signaux de carbones quaternaires masquait une région nettement moins intense de signaux CH. Parmi ces signaux apparaissent les signaux 24 plus intenses à 130-128 ppm (fig. 46-47). Ils sont d'autant plus intenses que les conditions de traitement sont sévères. L'intensité de ces signaux varie avec celle du signal 29b à 110,9 ppm. Ces signaux disparaissent lors de l'hydrogénation des échantillons.

Nous attribuons respectivement les signaux 24 et 29b aux carbones vinyliques et aux carbones aromatiques C-2 des stilbènes du type suivant :



$R = R' = H$
 $R = H, R' = OCH_3$
 $R = R' = OCH_3$

Cette attribution est confirmée par le fait que l'on retrouve de telles structures parmi les dimères isolés des lignines extraites (§ III.423b).

c) unités parahydroxybenzoïques

L'absorption n° 21 des carbones C-3 et C-5 des unités parahydroxybenzoates est parfaitement distincte sur les spectres CH. On repère alors très bien le signal 26 de leur carbone C-1 sur les spectres de la figure 48 ne donnant que les signaux des quaternaires.

III.242 Région des signaux des carbones du maillon propane

a) Structures résinol (β - β), phénylcoumarane (β -5), alkyl-aryle (β -1) et maillon aliphatique libre

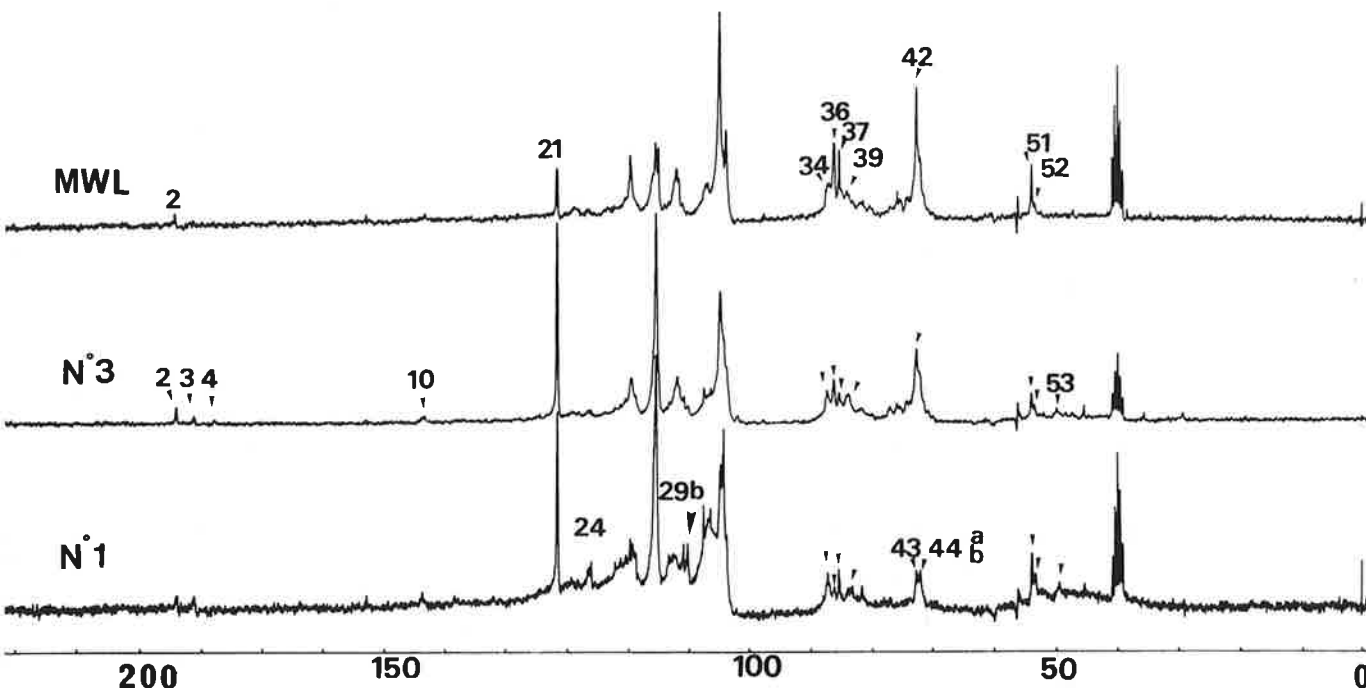


Figure 49 : Spectres CH, enregistrés avec la séquence DEPT, de lignine de référence MWL et de lignines B extraites des bois traités n° 1 et 3.

Sur les spectres CH (fig. 49) la suppression des signaux des carbones méthoxyliques rend très visible les absorptions 51 et 52 des carbones C- β des structures résinol (pinorésinol ou syringarésinol) et phénylcoumaranes. Les substituants méthoxyliques sur le noyau aromatique n'induisent aucune modification suffisante des déplacements chimiques des carbones aliphatiques pour distinguer des structures syringarésinol et pinorésinol. Sur les spectres CH des lignines de bois traité on note l'apparition d'un signal N° 53 à 49,4 ppm. En revanche, le spectre CH de la lignine MWL extraite du bois de peuplier ne présente aucune absorption à cette fréquence. Ce signal peut être attribué aux carbones C- β' des formes épimères des structures syringarésinol et épipinorésinol. Nous avons isolé ces molécules des fractions solubles dans l'éther éthylique (§ III.423b). Le signal 53 se retrouve à la fois sur les spectres RMN des extraits totaux (fig. 49) et sur les spectres (fig. 41) des fractions IE insolubles dans l'éther éthylique. Il apparaît nettement sur le spectre CH (fig. 50) de la fraction IE de

l'extrait total à l'acétone (lignine C) de l'échantillon n° 1. Les produits de faible masse moléculaire sont éliminés par la précipitation dans l'éther éthylique, nous démontrons ainsi que ces structures font partie du polymère. De la même façon les signaux 24 et 29b présents sur le spectre de la figure 50 indiquent que les structures stilbènes sont liées au polymère. L'absence de tels signaux sur les spectres CH de la lignine MWL infirme l'existence de ces structures dans le polymère non traité.

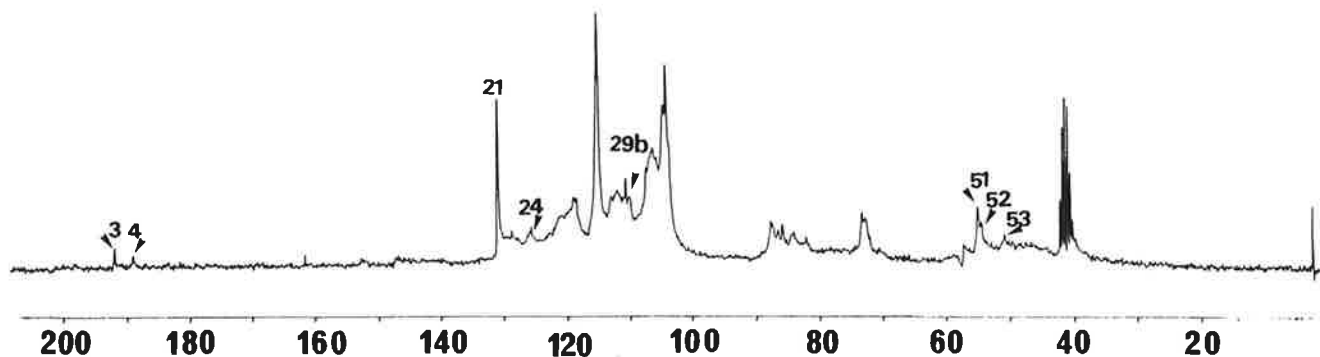
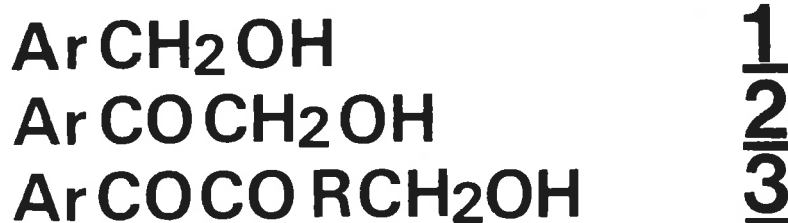


Figure 50 : Spectres CH, enregistré avec la séquence DEPT, de la fraction insoluble dans l'éther éthylique de la lignine (fig. 33) extraite du bois traité n° 1.

La présence de structures β -5 et β - β est confirmée par les absorptions 45 et 46 de leurs carbones C- γ repérables sur les spectres CH₂, à 71,3 ppm pour les structures résinol et à 62,9 ppm pour les structures phénylcoumaranes (fig. 45 et 46). Pour les structures pinorésinols l'intensité du signal 51 des carbones C- β est équivalente à celui des carbones C- γ sur le spectre CH₂. En revanche, le signal 46 à une intensité nettement plus grande que l'absorption 52 du carbone C- β des structures phénylcoumarane. Ce signal est également attribué aux absorptions de carbones CH₂ dans d'autres structures, β -1 par exemple. Cependant, nous infirmons la présence de ces structures du fait de l'absence de tout signal CH à 55,1 ppm, attribué au carbone C- β dans les structures β -1, si l'on considère les déplacements chimiques du composé modèle correspondant. Les attributions proposées sont les absorptions de carbones d'alcools primaires benzyliques (1), ou alors de carbones d'alcools primaires à proximité de carbonyles (2) (3).



L'absence de signaux de carbonyle bien définis à champ faible rend la deuxième attribution peu probable. C'est pourquoi nous préférons attribuer le signal à 62,9 ppm aux carbones d'alcools secondaires benzyliques.

b) Structures alkyl-aryl éther β -0-4

La séparation des signaux des carbones CH et CH₂ permet d'étudier l'évolution des carbones C- α et C- β dans les structures alkyl-aryl éther β -0-4 en fonction des conditions de traitement. (fig. 51). On observe ainsi la diminution très nette des signaux des carbones C- α et C- β de la forme érythro des structures β -0-4 dans la série syringyle (l'attribution de ces signaux ayant été faite au chapitre II.3). Les spectres CH₂ (fig. 52) indiquent que cette forme disparaît complètement lorsque les conditions de traitement deviennent sévères puisque l'on ne repère plus le signal attribué à son carbone C- γ . Les absorptions des carbones tertiaires C- α et C- β de l'autre forme diastéréoisomère dans la série syringyle et des deux formes diastéréoisomères dans la série gailacyle diminuent fortement sans toutefois disparaître complètement.

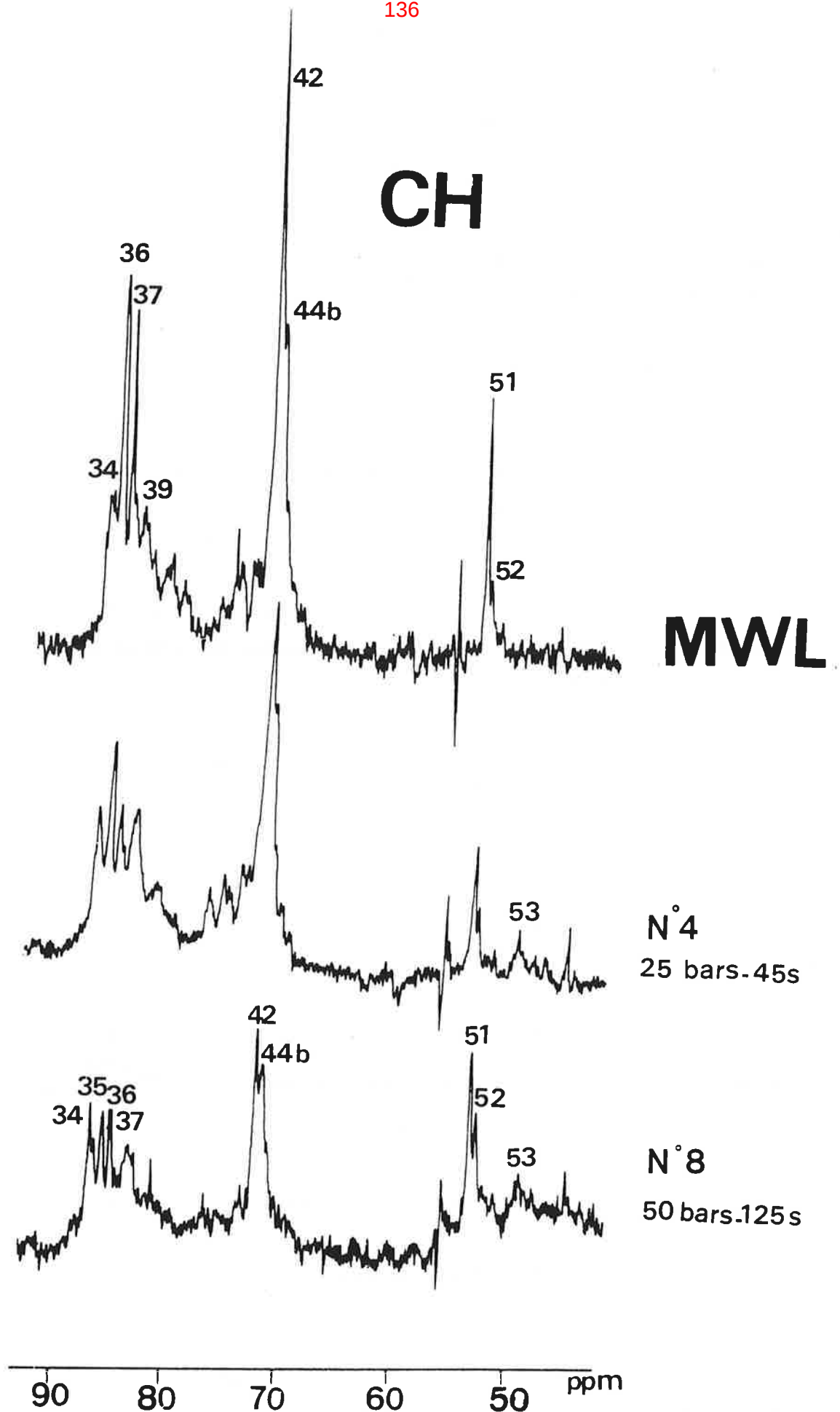


Figure 51 : Agrandissement de la région des signaux de carbones aliphatiques de spectres CH, enregistrés avec la séquence DEPT, de la lignine de référence MWL et de lignines B (fig. 33) extraites des bois traités n° 4 et 8.

c) Carbones saturés en dessous de 50 ppm

L'expérience DEPT permet d'attribuer les signaux fins à champ fort (en-dessous de 40 ppm) aux absorptions de carbones CH_2 et CH_3 . Ces signaux sont visibles sur les sous spectres CH_2 et CH_3 des lignines A ou B, surtout pour des conditions de traitement peu sévères (Fig. 18) mais ils disparaissent de ces spectres si l'on précipite les lignines dans l'éther éthylique. (fig. 41).

Lorsque la sévérité du traitement croît, ces signaux ont tendance à disparaître également des spectres CH_2 et CH_3 des extraits totaux (fig. 47). Nous avons vu que ces signaux étaient dus aux extractibles, or, la quantité de lignines extraite croît avec la sévérité des conditions de traitement, et il se produit une dilution des molécules contaminantes. Dans tous les cas, les molécules contaminantes sont facilement séparées par l'hexane des extraits totaux secs.

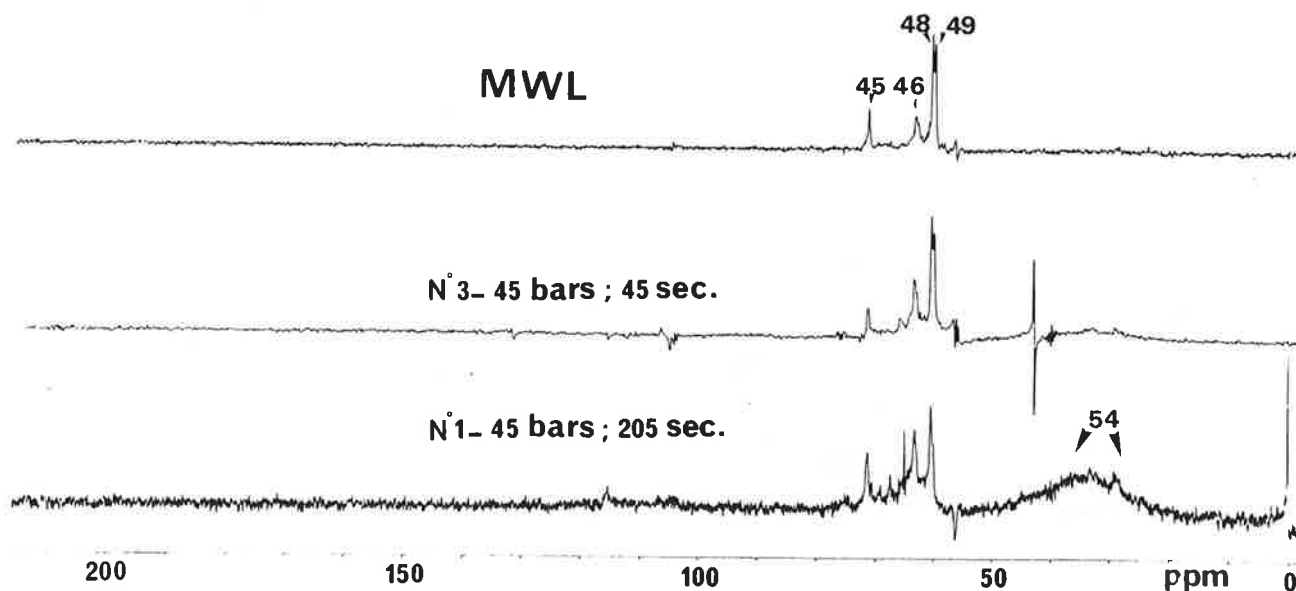


Figure 52 : Spectres CH_2 , enregistrés avec la séquence DEPT, de la lignine de référence MWL et des fractions insolubles dans l'éther éthylique des lignines C extraites des bois traités n° 1 et n° 3.

Les spectres CH_2 des fractions précipitées dans l'éther éthylique présentent néanmoins des massifs larges 54 entre 25 et 48 ppm, ces massifs sont d'autant plus nets que les lignines ont été extraites de bois sévèrement traités (fig. 52). Il faut souligner l'intérêt de l'expérience DEPT qui permet d'isoler ce massif de signaux, celui-ci n'avait jamais été ni repéré ni décrit dans les études précédentes. En

effet, ce massif large et peu intense est masqué dans les spectres RMN classiques par l'absorption des carbones du solvant (DMSO).

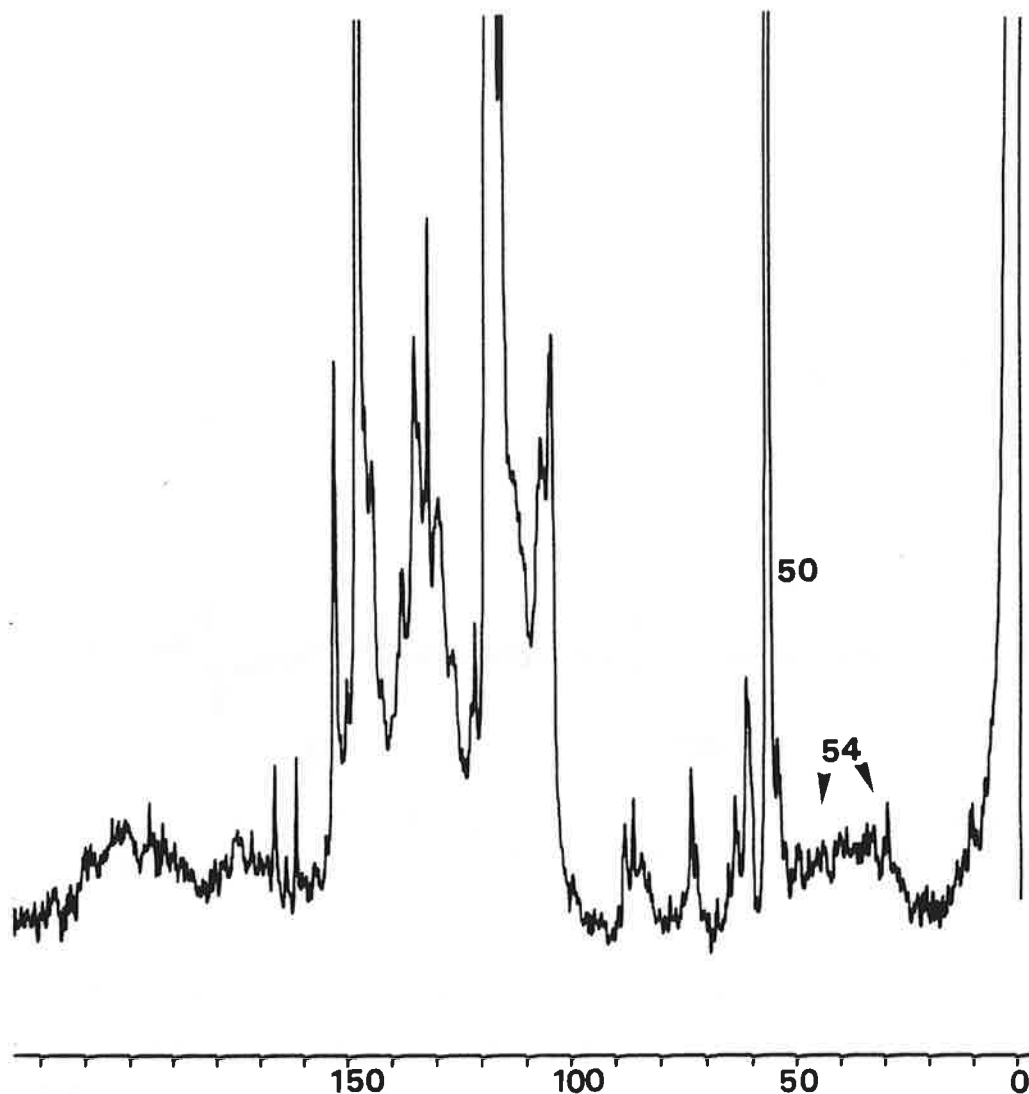


Figure 53 : Spectre total, enregistré avec la séquence CI, de la fraction insoluble dans l'éther éthylique de la lignine C extraite du bois traité n° 1 solubilisée dans le mélange acétonitrile deutéré-eau.

En solubilisant une fraction précipitée dans l'éther éthylique (celle de l'échantillon 1 par exemple), dans le mélange acétonitrile-eau (9 : 1), au lieu du DMSO, nous vérifions que ce massif n'est pas un artéfact. En effet, sur le spectre CI (figure 53) nous retrouvons le massif de signaux mis en évidence et attribué à des carbones CH_2 par l'expérience DEPT.

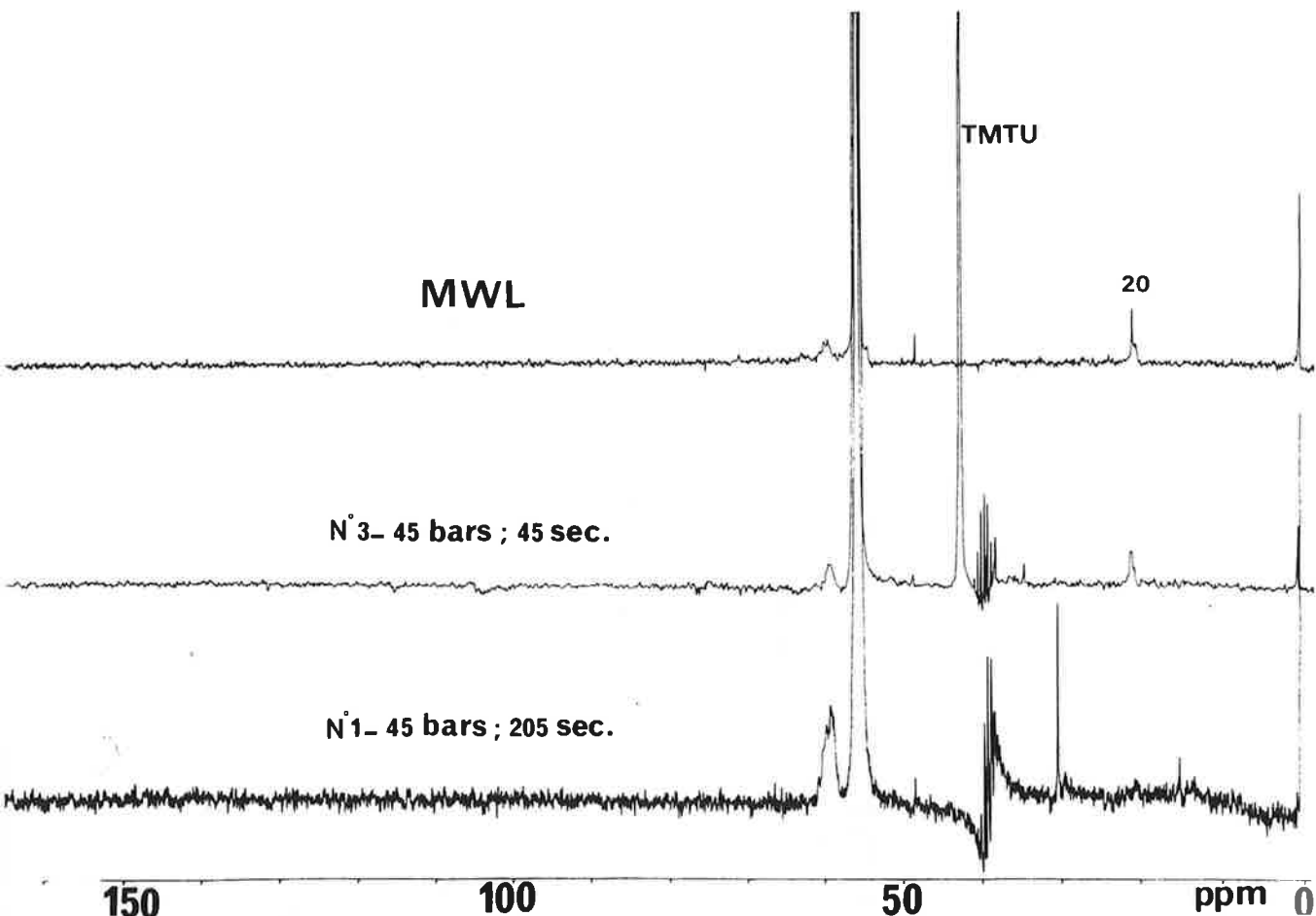


Figure 54 : Spectres CH_3 , enregistrés avec la séquence DEPT, de la lignine de référence MWL et des fractions insolubles dans l'éther éthylique des lignines C (fig. 33) extraites des bois traités n° 1 et n° 3.

Les spectres des carbones CH_3 (fig. 54) de ces mêmes fractions ne révèlent aucun signal à champ fort, excepté le signal 55 à 20 ppm attribué aux méthyles de groupe acétoxyle. On peut donc conclure que les groupements CH_2 n'appartiennent pas à des enchaînements saturés CH_2-CH_3 . Sur les spectres des carbones CH de ces mêmes fractions on devine un "un bombement" de la ligne de base vers 50 ppm mais l'intensité et la surface de cette région sont nettement inférieures à celle du massif de carbones CH_2 . Nous avons vérifié que le massif CH_2 est présent même après les traitements à la soude qui permettent de libérer les unités parahydroxybenzoïques liées aux polymères par des liaisons ester. Ces carbones CH_2 n'appartiennent donc pas à des enchaînements $(CH_2)_n$ liés aux lignines par des liaisons ester ni à des extrémités de chaînes CH_2-CH_3 .

Nous proposons de les attribuer à des carbones CH_2 inclus dans des structures du type :

ArCH₂Ar

Les déplacements chimiques des carbones CH₂ de composés modèles donnés dans la littérature (108) s'accordent avec cette attribution. De plus les signaux des carbones quaternaires aromatiques apparaissant entre 120 et 130 ppm peuvent être alors attribués au carbones aromatiques substitués par le groupe CH₂R (108).

Sur les spectres des fractions solubles dans l'éther éthylique (fig. 41) on retrouve évidemment les signaux fins observés dans les spectres des extraits totaux, mais également les massifs larges dus aux absorptions de carbones CH₂. Ce massif large n'est donc pas caractéristique de fractions polymères insolubles dans l'éther éthylique.

Pour compléter cette partie descriptive et comparative, il faut signaler l'absorption à 60 ppm visible sur les spectres CH₃ (fig. 54). Elle est masquée sur les spectres classiques par les absorptions de différents carbones C-γ dans cette région. Cette absorption est d'autant plus nette que la sévérité du traitement est importante. L'attribution de ce signal n'a pas pu être faite.

III.25 Résumé des principaux résultats établis

L'analyse qualitative en RMN du ¹³C de lignines extraites des bois traités par autohydrolyse rapide nous a permis d'établir les principaux effets du traitement appliqué sur la structure des lignines et de conclure :

- à la diminution du nombre des carbones aliphatiques liés à des oxygènes,

- à la diminution du nombre de structures alkyl-aryl éther β -0-4,
- à la persistance de structures phénylcoumarane (β -5) et résinol (β - β),
- à la formation de structure épisyngarésinol ou épipinorésinol,
- à une réorganisation chimique du polymère conduisant à l'hétérogénéité des déplacements chimiques observée.
- à l'obtention de fractions de lignines ayant un contenu osidique non détectable en RMN du ^1H .
- à la contamination des extraits au dioxanne-eau par les extractibles du bois, que l'on peut éliminer par précipitation dans l'éther éthylique ou par extraction à l'hexane. Les fractions solubles dans l'éther ainsi définies sont très semblables d'un échantillon à l'autre et représentent des lignines faiblement polymérisées.

III.26 Apport de la spectroscopie infrarouge dans l'analyse structurale des lignines extraites de bois traités par autohydrolyse rapide

Dans les études conduites jusque-là, nous avons utilisé la spectrométrie infrarouge (IR) pour caractériser rapidement les échantillons isolés et pour suivre l'efficacité des extractions sur les résidus pariétaux. Néanmoins, nous avons pu dégager certains renseignements structuraux en comparant les spectres IR des lignines extraites des bois traités avec ceux de la lignine standard MWL et des composés modèles. Cette comparaison porte sur les lignines 1 et 3 extraites à l'acétone des bois traités n° 1 et 3 (cf. page ...) et précipitées dans l'éther éthylique. Les deux lignines diffèrent par la sévérité des traitements appliqués aux échantillons de bois (45 bars pendant 205 secondes pour le n° 1 et 45 bars pendant 45 secondes pour le n° 3).

Pour interpréter les spectres des lignines étudiées nous avons repris les données de la littérature (cf. ch. I232). Nous avons vérifié également la pertinence de ces attributions en enregistrant les spectres

infrarouges de composés modèles, en particulier ceux des deux dimères présentant une structure de type alkyl-aryl éther β -0-4 l'un de la série gaiacyle, l'autre de la série syringyle (fig. 55). Nous avons également enregistré les spectres IR des produits réactionnels lors de la synthèse de l'alkyl-diaryl éther α -0-4, β -0-4 et du déhydrogénopolymère de l'alcool coniférylique, le DHP (fig. 56).

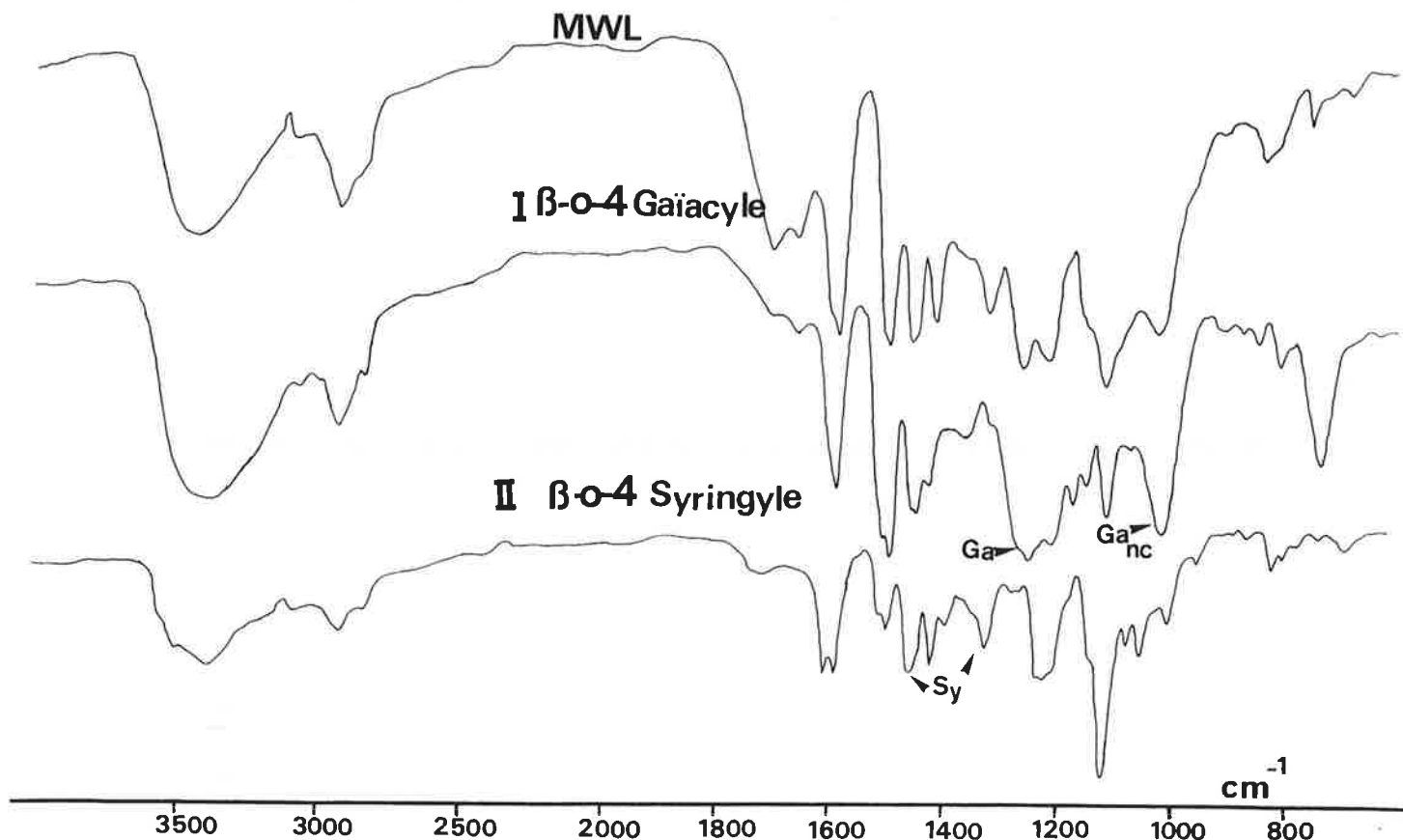


Figure 55 : Spectres infrarouges de la lignine MWL de peuplier et d'oligolignols de type β -0-4 dans la série gaiacyle (I) et dans la série syringyle (II).

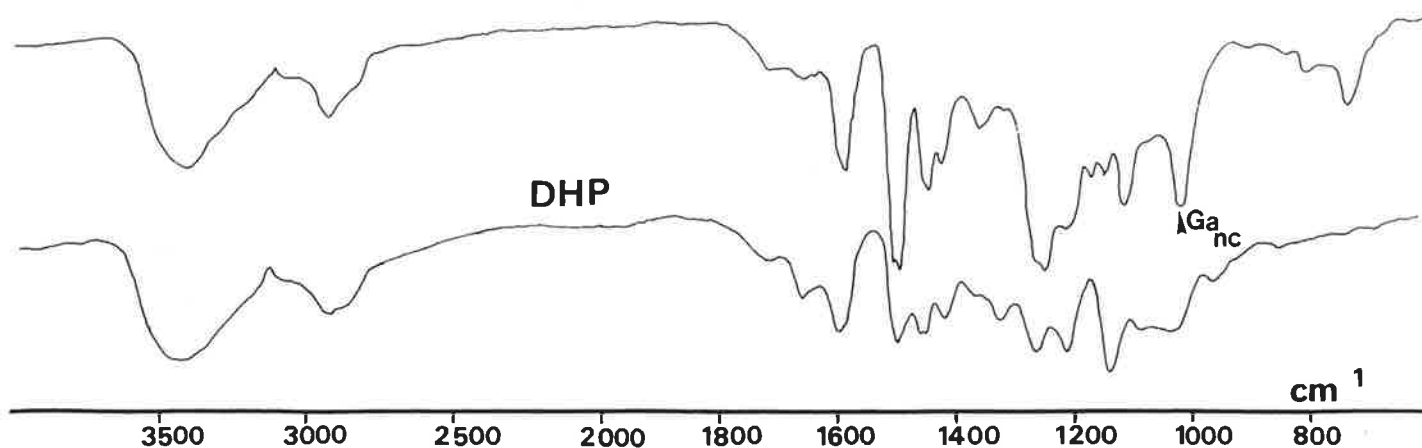


Figure 56 : Spectres infrarouges d'un déhydrogénopolymère (DHP) de l'alcool coniférylique et de l'oligolignol de type α -0-4 β -0-4 dans la série gaiacyle.

Le tableau 14 donne les attributions qui nous apparaissent comme les plus probables. Ces attributions que nous proposons sont beaucoup moins exhaustives que celles de Hergert (86). En effet, comme le fait M.G.S. Chua et coll. (42) pour analyser les spectres IR de lignines traitées par autohydrolyse nous préférons abandonner les attributions relatives aux différents hydroxyles aliphatiques reposant sur la liaison C-O dans les alcools. A cela deux raisons, d'une part les vibrations des liaisons de ces fonctions sont moins intenses que les autres vibrations attribuées, et d'autre part, nous avons montré (chapitre III.3), par l'étude des échantillons acétylés en RMN du ^{13}C , que le taux d'hydroxyles aliphatiques des lignines diminuent lorsque la sévérité des traitements croît. L'étude RMN fait apparaître également que le taux d'hydroxyles phénoliques croît avec la sévérité du traitement. C'est ce qui nous amène à attribuer l'épaule à 1360 cm^{-1} à une des vibrations du groupe COH dans le cas d'hydroxyles phénoliques, attribution qui n'est pas retenue par Hergert (86) dans l'analyse classique des spectres IR de lignines.

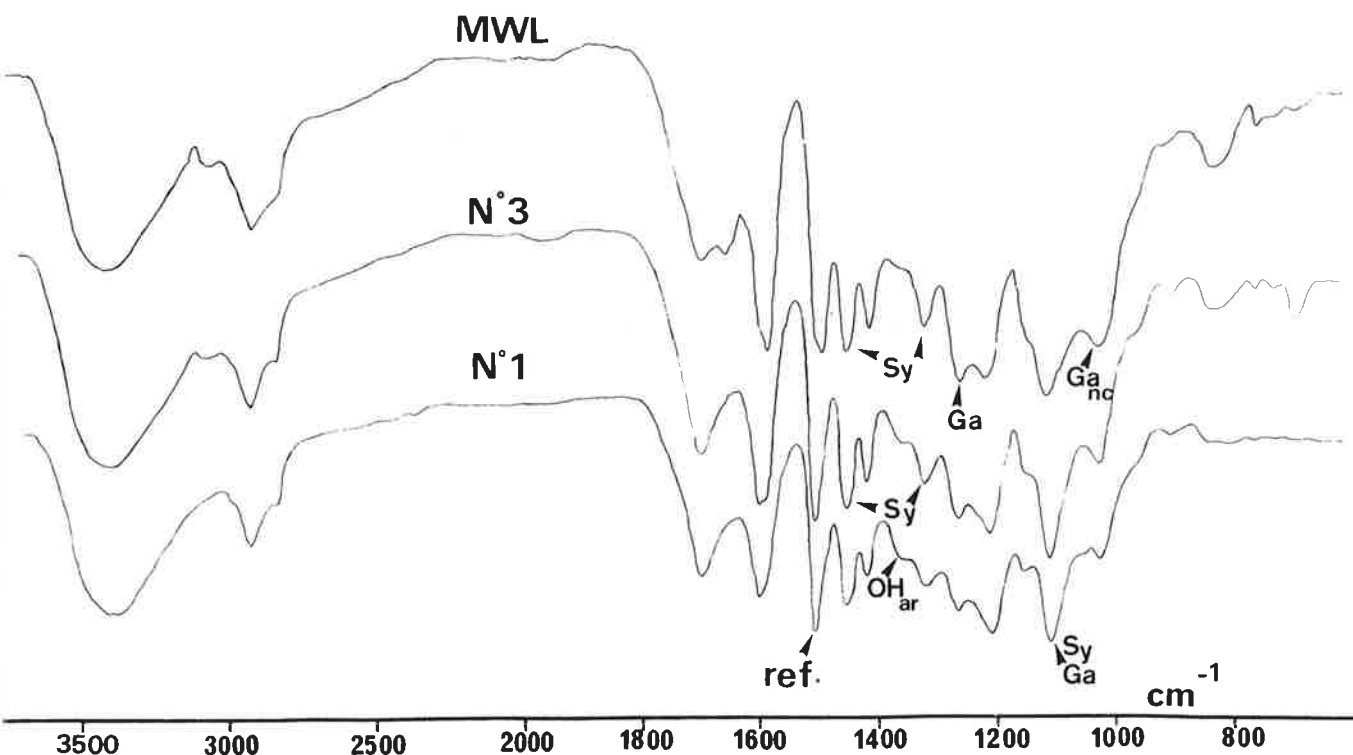


Figure 57 : Spectres infrarouges de la lignine MWL de peuplier et des lignines extraites à l'acétone des bois traités n° 1 et 3 et précipitées dans l'éther éthylique.

Sur ces bases, nous comparons les spectres IR des lignines extraites de bois traités par autohydrolyse rapide avec celui de la lignine standard MWL (fig. 57). La comparaison peut être faite en considérant,

comme référence la bande à 1510 cm^{-1} attribuée aux vibrations aromatiques C-C. En effet, celle-ci est considérée comme très peu dépendante des substitutions sur le noyau aromatique. Ainsi dans le tableau 14 l'évolution des bandes d'absorption des lignines traitées peut être donnée par rapport à celles de la lignine MWL. L'interprétation de l'évolution des bandes repose sur les résultats établis par Sarkanen (83, 84, 85).

La diminution d'intensité de la bande à 1455 cm^{-1} traduit une décroissance du taux d'unités syringyles dans les lignines de bois traité, cela est très net sur le spectre de la lignine 1, ayant subi le traitement le plus sévère. La même observation peut être faite pour la bande à 1325 cm^{-1} et la diminution du taux d'unités syringyles incluses dans des structures éthers. De la même façon, le taux d'unités gaiacyles incluses dans de telles structures diminue comme l'indique l'intensité de la bande à 1265 cm^{-1} . La coupure des fonctions aryl-alkyl éther (dans des unités gaiacyles ou syringyles) est confirmée par la décroissance de la bande à 1215 cm^{-1} (vibrations d'élongation des liaisons C-O dans les groupements éthers pour les deux types d'unités). La bande à 1115 cm^{-1} attribuée aux vibrations de déformation angulaire des liaisons CH aromatiques des deux types d'unités diminuent aussi.

Contrairement à ce que l'on peut attendre la diminution des bandes permettant d'apprécier le taux de méthoxyle, donc de syringyle, ne s'accompagne pas d'une augmentation des bandes caractéristiques des unités gaiacyles à 1155 cm^{-1} et 1030 cm^{-1} : on observe en effet une diminution de la bande à 1030 cm^{-1} , caractéristique des unités gaiacyles non condensées, sur le spectre de la lignine 1. De la même façon, le massif entre 830 et 850 cm^{-1} attribués à des vibrations hors du plan CH dans le benzène tétrasubstitué en 1,2,3 et 5 disparaît pratiquement de ce spectre : ceci s'explique par la modification du type de substitution entraînée par les réactions de condensation sur le noyau aromatique. Ce résultat renforce l'interprétation concernant l'existence de structures diarylméthanes que nous avons faite sur la base des résultats RMN.

Par comparaison avec le spectre IR d'une lignine MWL les lignines de bois traité ne donnent qu'un massif large à 1700 cm^{-1} . Celle-ci légèrement plus intense que sur le spectre de la lignine standard diminue sensiblement (40 à 50 %) après saponification ou réduction par

NaBH_4 des échantillons. L'origine de cette bande serait double : une partie est attribuable aux carboxyles des groupes esters notamment ceux de l'acide parahydroxybenzoïque dont nous avons déjà montré qu'une partie est liée à la lignine par des liaisons ester, l'autre partie pouvant être réduite, peut être attribuée à des groupements carbonyles non conjugués.

Tableau 14 : Attribution des bandes d'absorption dans la lignine standard (MWL) et les lignines extraites de bois traité par autohydrolyse rapide (LBE)

MWL	Evolution des bandes de la lignine traitée/ à la lignine standard (MWL)		Intensité	
	cm^{-1}	cm^{-1}		
3500-3400				Vibrations d'élongation des liaisons O-H
2940-2840				Vibrations d'élongation des liaisons CH dans les groupes méthyliques et méthyléniques.
1710			croît fortement	Vibrations d'élongation des liaisons C=O des cétones non conjuguées au noyau aromatique. Vibrations d'élongation des liaisons C=O des acides ou esters conjugués au noyau aromatique.
1665			disparaît	Vibrations d'élongation des liaisons C=O des cétones ou aldéhydes conjugués au noyau aromatique.
1605			décroît	Vibrations d'élongation des liaisons C-C du noyau aromatique, très affectées par les vibrations des C-O aromatiques et par les conjugaisons avec des groupes carbonyles en α du cycle aromatique.
1500-1510	1510		constante	Vibrations d'élongation des liaisons C-C du noyau aromatique, très peu sensibles aux substitutions sur le noyau aromatique : elles sont utilisées comme référence
1460	1456		décroît	Vibrations de déformation asymétrique des C-H des groupes méthyles et méthylènes très affectées par les groupes méthoxyles.
1420			décroît	Vibrations du squelette aromatique fortement asymétrique de déformation dans le plan des CH et sensibles au substitution sur le noyau aromatique.
	1360 (épaulement)		croît	Vibrations attribuables aux hydroxy les phénoliques
1325			décroît	Vibrations de déformation angulaire dans le plan des liaisons C-C du noyau aromatique et vibrations d'élongation du C-OR des unités syringyles.
1270-1265			décroît	Vibrations de déformation angulaire dans le plan des liaisons C-C du noyau aromatique et vibrations d'élongation de C-O-R des unités galacyles.
1220	1215		décroît	Idem dans les unités syringyles ou galacyles.
1155			décroît	Vibrations de déformation angulaire dans le plan des liaisons C-H des unités galacyles.
1120	115		croît	Vibrations de déformation angulaire dans le plan des liaisons C-H des unités galacyles et syringyles.
1030 (970)			décroît	Vibrations de déformation angulaire dans le plan des liaisons C-H des unités galacyles. = CH vibrations de déformation angulaire hors du plan des liaisons éthyléniques.
850-830			décroît	Vibrations de déformation angulaire hors du plan des CH aromatiques tétrasubstitués 1235 c'est-à-dire des unités galacyles non condensées.

III.3. EXPLOITATION QUANTITATIVE DES SPECTRES RMN ^{13}C ENREGISTRES AVEC LES SEQUENCES CI ET DEPT

En RMN du ^{13}C les intégrales de signaux judicieusement choisis et enregistrés de manière quantitative fournissent des dosages d'unités ou de fonctions qui permettent alors la caractérisation structurale des lignines extraites. L'ampleur des modifications chimiques liées aux conditions de traitement peut être quantifiée (146-147).

III.31 Analyse quantitative des extraits totaux de lignines

III.311 Rappels expérimentaux : choix des échantillons et des expériences RMN

Les lignines étudiées proviennent de bois traité selon le plan d'expérience PII, elles ont été extraites au Soxhlet par le mélange dioxanne-eau (fig. 33 voie B).

Sur ces échantillons de lignines B non acétylées nous dosons le nombre de structures β -O-4 par aromatique, le taux de méthoxyle, et le nombre de chaînes propanes oxygénées par unité aromatique. Ces dosages sont effectués à partir des spectres enregistrés avec la séquence CI (fig. 39). Ces enregistrements ont également servi à l'analyse qualitative développée au chapitre précédent.

Le nombre d'unités parahydroxybenzoates et le degré de condensation ont été déterminés pour quelques unes de ces lignines à partir des spectres enregistrés avec l'expérience DEPT, comme nous l'avons décrit au chapitre II.341.

Le dosage des hydroxyles a été conduit sur les lignines acétylées, en utilisant la méthode développée par D. Robert et G. Brunow (110). La précipitation dans l'éther éthylique permettant de définir deux fractions nettement différentes (§ III.421), nous avons effectué les dosages d'hydroxyles sur chacune des fractions ainsi obtenues :

- la fraction de lignine acétylée soluble dans l'éther éthylique ASE,

- la fraction de lignine acétylée insoluble dans l'éther éthylique AIE

Les résultats des différentes mesures sont consignées dans les tableaux 15 à 18.

Le nombre de structures est généralement donné par unité aromatique, en étant conscient que le massif de signaux de carbones aromatiques peut contenir des signaux de carbones non aromatiques qui n'ont pas forcément la même importance dans toute la série d'échantillons. On peut citer par exemple les signaux des carbones vinyliques et ceux des unités parahydroxybenzoïques.

Les bilans en matière (fig. 34 et 35) extraite des bois traités montrent que les quantités de lignines extraites augmentent avec les conditions de traitement utilisées dans les deux plans d'expérience (PI et PII). Dans le deuxième plan d'expérience PII, la pression et la durée des traitements étant variables, nous avons choisi d'utiliser le rendement en lignines extraites comme paramètre de sévérité des traitements appliqués.

De ces différentes mesures, nous dégageons des évolutions très nettes des caractéristiques structurales des produits extraits en fonction des conditions de traitement.

III.312 Résultats obtenus sur les extraits totaux non acétylés
(lignines B)

a. Evolution de l'unité phénylpropane

TABLEAU 15 : Taux de méthoxyles (OMe), d'unités syringyles incluses dans des structures β -O-4 (S_{eth}) et taux de maillons propanes oxygénés (C_3) des lignines B (fig. 33).

Rendement Lignine	N°	Pression	Durée	OMe	S_{eth}	C_3
7 %	4	25	45	1.17	0.36	0.54
9 %	5	35	10	1.23	0.35	0.63
13 %	7	20	125	1.30	0.34	0.53
17 %	6	25	205	1.10	0.30	0.40
22 %	3	45	45	1.17	0.24	0.37
25 %	R	35	125	1.04	0.23	0.29
28 %	8	50	125	1.00	0.15	0.214
32 %	2	35	240	0.96	0.19	0.17
37 %	1	45	205	0.98	0.13	0.18

L'analyse quantitative des spectres des lignines B enregistrés avec la séquence CI permet de suivre l'évolution des principales caractéristiques de l'unité de base phénylpropane puisque l'on dose le taux de méthoxyles, le nombre de chaînes propanes complètes et le nombre de structures β -O-4. On constate alors une diminution très nette de ces grandeurs lorsque la sévérité du traitement croît (tableau 15) :

- diminution du nombre de structures β -O-4.

Le taux d'unités syringyles incluses dans des structures alkyl-aryl éther β -O-4 est de 0,36 par aromatique dans la lignine de l'échantillon

de bois N° 4 traité modérément et décroît jusqu'à 0,13 pour les lignines extraites de bois sévèrement traités (N° 2, 8, 1).

- diminution des chaînes propanes

Le nombre de motifs propanes oxygénés par aromatique décroît également. On trouve 0,53 chaîne complète par aromatique pour la lignine 3, ce taux diminue à 0,2 dans les lignines de bois sévèrement traités.

- diminution du taux de méthoxyles

Le taux de méthoxyles par aromatique est de 1,17 pour la lignine de l'échantillon 4, il devient légèrement inférieur à 1 pour les lignines extraites des échantillons 1 et 2.

Il faut souligner que la décroissance de 10 % du taux de méthoxyles observée entre les lignines extraites de bois traités modérément et sévèrement est beaucoup plus faible que celles enregistrées pour les deux autres mesures 64 % des structures β -O-4 et 70 % des chaînes propanes disparaissent dans les échantillons de lignines extraites de bois sévèrement traités.

b. Dosage des unités parahydroxybenzoïques (pOH) et détermination du degré de condensation (d)

Tableau 16 : TAUX D'UNITES PARAHYDROXYBENZOÏQUES (pOH) ET DEGRÉ DE CONDENSATION (d) POUR LES LIGNINES C EXTRAITES DES BOIS TRAITES n° 4, 8 et 2.

Echantillon	MWL	4	8	2
pOH ^a	4 %	13,6 %	5,8 %	5,5 %
OMe ^c		1,15	1,08	1,05
	1,66	1,30 ^b	1,14 ^b	1,10 ^b
R	0,39	0,432 ^b	0,33 ^b	0,355 ^b
$d = 6 \times (R - \frac{6-(2+OMe)}{6})$	0	0,11 ^b	0,88 ^b	0,77 ^b

a) pour cent des unités aromatiques,

b) calcul effectué en enlevant l'aire des signaux des unités pOH,

c) exprimé par unité aromatique.

En exploitant les spectres DEPT comme nous l'avons développé au paragraphe II.3411 on peut doser les unités parahydroxybenzoïques pOH et déterminer le degré de condensation des lignines étudiées. Les résultats sont donnés dans le tableau 16.

Le contenu en pOH de la lignine extraite d'un bois modérément traité (N° 4) est le double de celui des lignines extraites de bois sévèrement traités (N° 8 et 2). Le contenu en pOH de la lignine n° 4 est supérieur à celui de la lignine de référence MWL, et cela explique en partie le faible taux de méthoxyle déterminé. En revanche pour les lignines de bois sévèrement traités les teneurs en pOH ne sont pas la cause des faibles taux de méthoxyle déterminés.

$$\text{L'évolution du rapport } R_{th} = \frac{\text{Nombre de CH aromatiques}}{\text{Total des carbones aromatiques}}$$

montre que le nombre de carbones non substitués décroît avec la sévérité du traitement. Le degré de condensation calculé en tenant compte du contenu en méthoxyle augmente très nettement dans les lignines extraites de bois sévèrement traité : on passe de 0,10 carbone substitué par unité aromatique pour la lignine N° 4 à 0,90 pour la lignine N° 8.

Les résultats établis dans les deux paragraphes précédents montrent clairement que la structure phénylpropane se transforme sous l'effet du traitement appliqué :

- disparition importante du nombre de chaînes propanes oxygénées,
- augmentation très nette du degré de condensation,
- tendance à la baisse du taux de méthoxyles.

III.313 Résultats obtenus sur les lignines acétylées : dosage des différents hydroxyles

a) Résultats obtenus (tabl. 17) sur les lignines acétylées solubles dans l'éther éthylique (ASE).

TABLEAU 17 : Taux des différents hydroxyles des fractions de lignines B acétylées solubles dans l'éther éthylique (ASE) ; OH_T = hydroxyles totaux, OH_{ar} = hydroxyles phénoliques ; OH_{al} = hydroxyles aliphatiques.

Rendement Lignine	N°	Pression	Durée	Rendement précipitation%		OH_T	OH_{ar}	OH_{al}	OMe
				AIE	ASE				
7 %	4	25	45	63	37	1.33	0.85	0.45	1.05
9 %	5	35	10	67	33	1.43	0.70	0.67	1.50
13%	7	20	125	68	32	1.08	0.68	0.32	0.90
17%	6	25	205	69	31	1.10	0.70	0.40	1.12
22%	3	45	45	55	45	1.11	0.64	0.47	1.22
25%	R	35	125	58	42	1.04	0.66	0.38	0.90
32%	2	35	240	61	39	1.02	0.702	0.30	0.97
37%	1	45	205	57	43	1.02	0.742	0.26	0.73

Pour les lignines ASE qui représentent des fractions de faible masse moléculaire, on observe une légère décroissance du taux d'hydroxyles totaux. Cette décroissance est le fait principal d'une décroissance des hydroxyles aliphatiques. Ces fractions ont leur taux d'hydroxyle phénolique qui reste dans le voisinage de 0,7 hormis pour l'échantillon 4, modérément traité, dont le taux d'hydroxyles phénoliques par aromatique est de 0,85.

b) Résultats obtenus (tab. 18) sur les lignines acétylées insolubles dans l'éther éthylique (AIE).

TABLEAU 18 : Taux des différents hydroxyles des fractions de lignines B acétylées insolubles dans l'éther éthylique (AIE). H_T = hydroxyles totaux, OH_{al} = hydroxyles aliphatiques, OH_{ar} = hydroxyles phénoliques.

Rendement Lignine	N°	Pression	Durée	OMe	OH_T	OH_{ar}	OH_{al}
7 %	4	25	45	1.25	1.64	0.36	1.28
9 %	5	35	10	1.16	1.71	0.39	1.32
13 %	7	20	125	1.17	1.26	0.43	0.83
17 %	6	25	205	1.17	1.30	0.47	0.84
22 %	3	45	45	1.01	1.22	0.50	0.72
25 %	R	35	125	0.93	1.17	0.57	0.60
28 %	8	50	125	1.02	1.06	0.52	0.54
32 %	2	35	240	0.92	1.02	0.63	0.39
37 %	1	45	204	0.93	1.07	0.63	0.44

Pour ces fractions de plus hauts masses moléculaires, on constate des variations très importantes des taux des différents hydroxyles en fonction des conditions de traitement.

Le taux d'hydroxyles totaux diminue de 35 % entre la lignine de l'échantillon 4 traité modérément, et celles des échantillons 2 et 1 les plus sévèrement traités. Cette diminution est en fait due à celle très forte, 66 %, des hydroxyles aliphatiques. Entre ces échantillons, en revanche, le taux d'hydroxyles phénoliques augmente très fortement 75 % avec la sévérité du traitement.

c) Comparaison entre les fractions AIE et ASE

Pour les lignines acétylées, les variations entre les échantillons sont plus importantes pour les fractions AIE que pour les fractions ASE. Les fractions ASE ont un taux d'hydroxyles phénoliques toujours plus élevé (0,7 à 0,8) que les fractions insolubles, ce qui est normal puisqu'elles contiennent les monomères phénoliques. En revanche, le taux d'hydroxyles aliphatiques reste toujours plus faible. On constate que les différences entre les valeurs mesurées dans chacune des fractions (ASE ou AIE) s'amenuisent lorsque les conditions de traitement deviennent plus sévères. Cela indique qu'aux conditions de traitement sévères on extrait un matériau totalement modifié pour lequel les fractions ASE et AIE ne reflètent que des différences dans le degré de polymérisation. En revanche lorsque les conditions sont plus modérées, la lignine est partiellement dégradée : les produits de dégradation restent en solution dans l'éther éthylique, tandis que les polymères partiellement modifiés demeurent insolubles.

III.314. Mise en évidence et interprétation de l'existence de corrélations entre les mesures effectuées

Certaines des mesures effectuées à partir des spectres RMN sont corrélées linéairement avec le rendement en lignine extraite.

Ainsi, le rendement en lignine extraite et le taux d'unités syringyles incluses dans des structures alkyl-aryl éther β -O-4 sont fortement corrélées ($R = 0,98$ (fig. 58)).

L'extractibilité des lignines varie donc de manière linéaire avec leur taux de liaison alkyl-aryl éther. On montre également que le taux de chaîne propane complète décroît linéairement lorsque le rendement croît (fig. 58.b). En revanche aucune relation simple n'a pu être établie entre les rendements en lignines extraites et leur taux de méthoxyle.

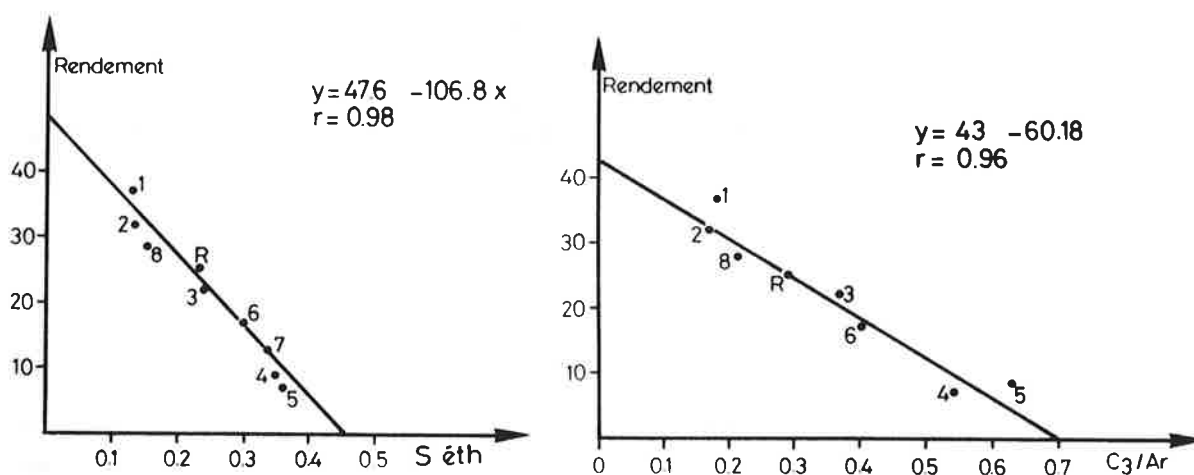


Figure 58 : Rendement en lignine B en fonction de leur taux d'unité syringyle incluse dans des structures β -O-4 (fig. 58A) et de leur taux de maillons propanes oxygénés (fig. 58 B).

De la même manière le rendement en lignine extraite et les taux des différents hydroxyles totaux, aliphatiques et phénoliques des fractions insolubles dans l'éther éthylique sont linéairement corrélés (Fig. 59). On constate néanmoins que la corrélation linéaire entre le rendement et le taux des hydroxyles totaux, somme des hydroxyles aliphatiques et phénoliques, est nettement moins bonne que celles des deux constituants pris séparément. On trouve un coefficient de régression linéaire de 0,89 dans le cas des hydroxyles totaux contre 0,94 et 0,97 pour les hydroxyles phénoliques et aliphatiques pris séparément. Cela montrerait que les mécanismes chimiques conduisant à la formation d'hydroxyles phénoliques libres d'une part et à la disparition des hydroxyles aliphatiques d'autre part ne sont pas liés.

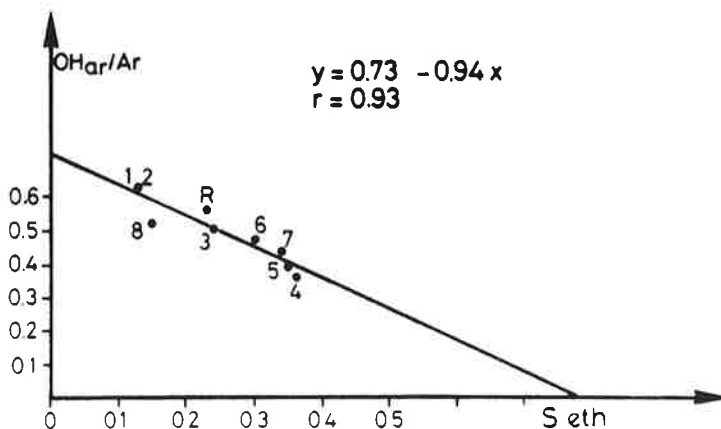
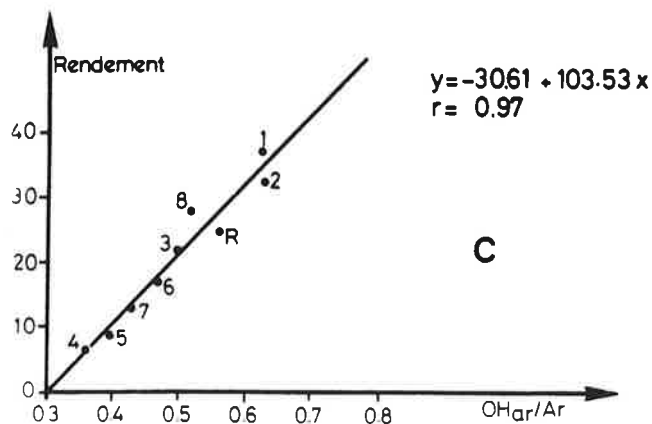
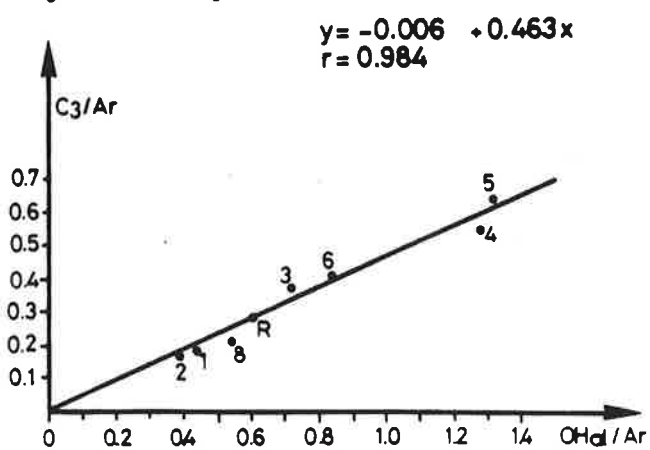
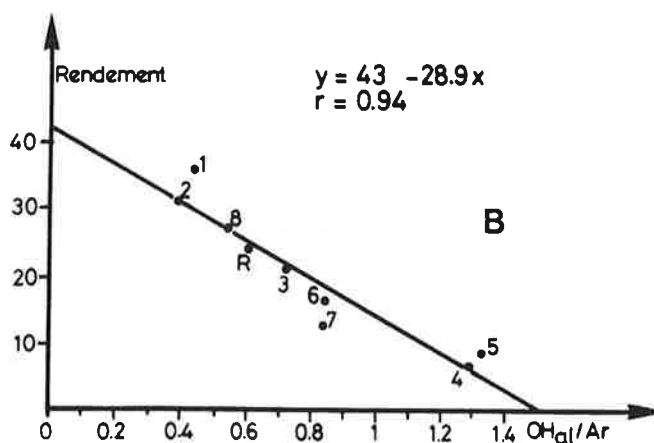
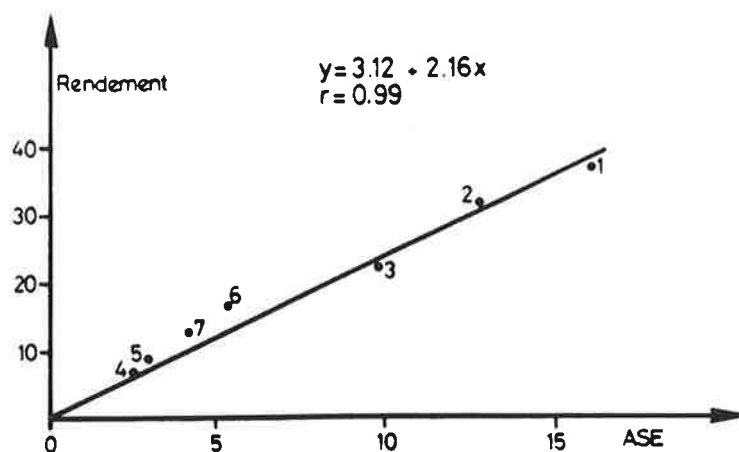
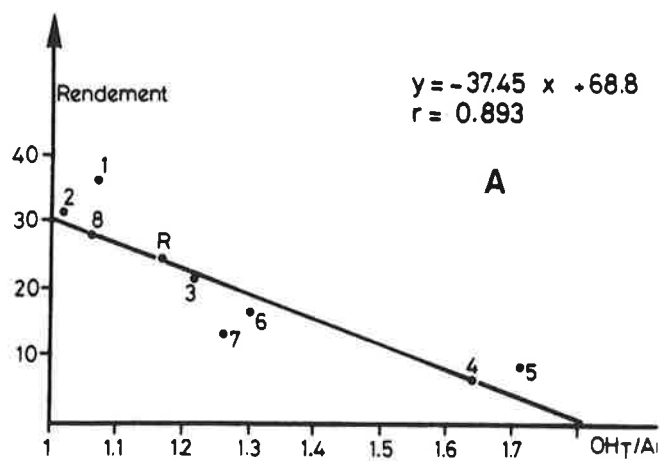


Figure 59 :

Rendement en lignine B en fonction du taux d'hydroxyyles totaux (fig. 59A), du taux d'hydroxyyles aliphatiques (fig. 59B), et du taux d'hydroxyyles phénoliques (fig. 59C) déterminés sur les fractions AIE.

Figure 60 :

Corrélation entre différents paramètres structuraux : rendement en lignine B, rendement en lignine ASE, taux de maillons propanes C_3 et taux d'unités syringyles incluses dans des structures β -0-4 (S_{eth}) pour les lignines B, taux d'hydroxyyles aliphatiques (OH_{al}) et taux d'hydroxyyles phénoliques pour les fractions AIE des lignines B.

En ce qui concerne les fractions de lignines acétylées solubles _ dans l'éther éthylique (ASE), nous ne mettons en évidence aucune corrélation entre le rendement en lignine extraite et les mesures faites à partir des spectres RMN. En revanche, les masses de lignines acétylées solubles dans l'éther éthylique, exprimées par rapport au bois traité, sont parfaitement corrélées au rendement en lignine extraite (fig. 60).

Du fait de l'existence de corrélation linéaire entre le rendement et certaines des mesures effectuées, il est logique que ces mesures soient corrélées entre elles. C'est ainsi que nous établissons une très bonne corrélation ($R = 0,97$) entre le taux de chaînes propanes des extraits totaux de lignine et le taux d'hydroxyles aliphatiques (fig. 60). De la même façon, le taux d'unités syringyles incluses dans des structures éthers β -O-4, et le taux d'hydroxyles phénoliques des fractions acétylées insolubles dans l'éther éthylique sont linéairement dépendants (Fig. 60).

Cette étude démontre que le taux des unités syringyles incluses dans des structures alkyl-aryl éther β -O-4, celui des chaînes propanes oxygénées déterminées sur les extraits totaux de lignines B non acétylées et les taux des différents types d'hydroxyles des fractions de lignines AIE varient linéairement avec le rendement en lignine totale extraite.

On établit ainsi des relations linéaires du type :

$$Rd = a G + b \quad (1)$$

Rd = rendement en lignine extraite exprimé en pour cent du bois traité.
G = les différentes mesures effectuées.

La relation (1) est équivalente à $G = a' Rd + b'$

Or, au Centre Technique du Papier de Grenoble (169) il a été montré qu'il existait une corrélation double entre le rendement et les conditions de traitement c'est-à-dire la pression de la vapeur d'eau et la durée du traitement. On peut alors écrire que le rendement est une fonction de la pression et de la température :

$$R_d = F(P, t)$$

$$\text{d'où } G = a' F(P, t) + b'$$

Les caractéristiques structurales précédentes varient donc linéairement avec les conditions de traitement. En revanche aucune des caractéristiques structurales des fractions acétylées solubles dans l'éther éthylique (ASE) n'évolue de manière linéaire avec les conditions de traitement.

III.315. Récapitulatif des principaux résultats

L'analyse quantitative des spectres RMN ^{13}C des extraits totaux (LNA) et celle des spectres des fractions ASE et AIE pour les fractions acétylées nous permet de conclure que les caractéristiques structurales des lignines extraites sont profondément affectées par les conditions du traitement. Les principales évolutions liées à la sévérité croissante des traitements appliqués sont les suivantes :

- décroissance du taux de liaison alkyl-aryl éther β -O-4,
- décroissance du taux de chaînes propanes oxygénées,
- augmentation du degré de condensation,
- décroissance du taux d'hydroxyles totaux,
- décroissance du taux d'hydroxyles aliphatiques,
- augmentation du taux d'hydroxyles phénoliques,
- décroissance du taux de méthoxyles.

Nous avons démontré l'existence de relations linéaires entre le rendement en lignines extraites, directement lié aux conditions de traitement appliqués, et certains des paramètres structuraux étudiés : taux de structures β -O-4 et taux de chaînes propanes oxygénées pour les fractions LNA, rendement pondéral et taux des différents types

d'hydroxyles pour les fractions AIE. Ce point est intéressant car on peut utiliser les relations linéaires ainsi établies, pour déterminer les caractéristiques structurales d'une lignine en fonction de son rendement d'extraction.

III.32. Essais de caractérisation structurale complète des lignines insolubles dans l'éther éthylique

La suppression des signaux du solvant et le bon rapport signal sur bruit des spectres enregistrés par l'expérience DEPT permet de caractériser (chapitre III.2) beaucoup plus de structures que la seule exploitation des spectres enregistrés avec la séquence CI (chapitre III.2). L'exploitation quantitative conjointe des spectres DEPT et CI permet, alors une caractérisation complète des lignines étudiées comme celle que nous avons effectuée sur une lignine artificielle (DHP) au paragraphe II.342.

Certaines précautions doivent être prises en ce qui concerne les lignines extraites de bois traité par autohydrolyse rapide. En effet, nous avons montré (§ III. 213) que les signaux fins qui apparaissent à champ fort en-dessous de 50 ppm étaient dus aux carbones des contaminants qui disparaissent lorsque l'on précipite les extraits totaux dans l'éther éthylique.

Nous avons contourné ce problème en effectuant les analyses sur les fractions précipitées dans l'éther éthylique ; nous obtenons ainsi des fractions de haute masse moléculaire débarrassées des contaminants lipophiles et des molécules de faible masse moléculaire qui restent en solution.

III.321. Choix des échantillons et des expériences RMN

Les lignines extraites à l'acétone (voie C - fig. 33) des bois traités N° 1 et 3, puis précipitées dans l'éther éthylique ont été retenues pour cette étude. Elle représentent des conditions de traitement nettement différentes. Seules les fractions IE, insolubles dans l'éther éthylique, sont étudiées pour les raisons exposées ci-dessus. Les lignines acétylées sont récupérées en évaporant les réactifs afin d'éviter toute perte de matériau.

De cette manière, nous pouvons exploiter conjointement les spectres enregistrés avec les expériences DEPT et CI pour les lignines acétylées ou non, comme nous l'avons développé plus spécialement pour l'étude structurale d'une lignine artificielle DHP. La figure 61 montre pour chacune des lignines n° 1 et 3 le spectre total enregistré avec la séquence CI et le spectre différence résultant de la combinaison linéaire suivante :

Spectre CI - a(spectre CH + spectre CH₂ + spectre CH₃).

Les spectres CH, CH₂ et CH₃ ont été enregistrés avec la séquence DEPT. L'annulation des signaux CH et CH₂ sur les spectres différences montrent que nous pouvons exploiter quantitativement les spectres DEPT (cf. le paragraphe II.22). Par rapport au DHP nous avons tenu compte dans cette étude des signaux CH₂ qui apparaissent à champ fort (en-dessous de 50 ppm) enregistré avec l'expérience DEPT. Sur la figure 62 nous donnons pour exemple les spectres de l'échantillon N° 3 à partir desquels les données quantitatives ont été tirées, en intégrant les signaux ou les massifs considérés. Les intégrales des différentes régions spectrales sont enregistrées dans la première colonne du tableau 19.

A partir de ces données nous pouvons recalculer l'analyse élémentaire des échantillons (tableau 19) et donner les taux des principaux types de carbone (tab. 20).

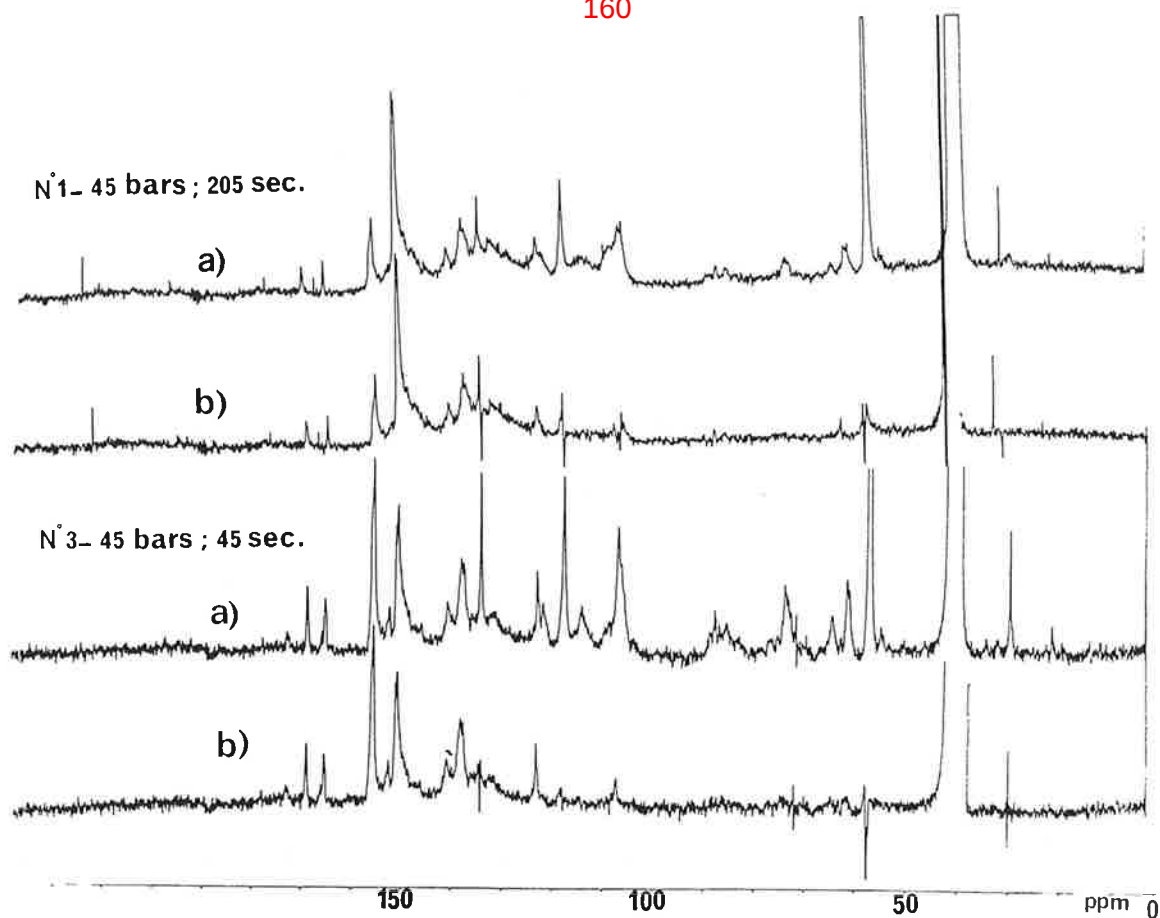


Figure 61 : Quantitativité des signaux des fractions IE des lignines C n° 1 et 3 enregistrés avec la séquence DEPT.

a) spectre enregistré avec la séquence CI

b) spectre obtenu par différence entre le spectre CI et le spectre somme des trois spectres DEPT (CH_1 , CH_2 et CH_3).

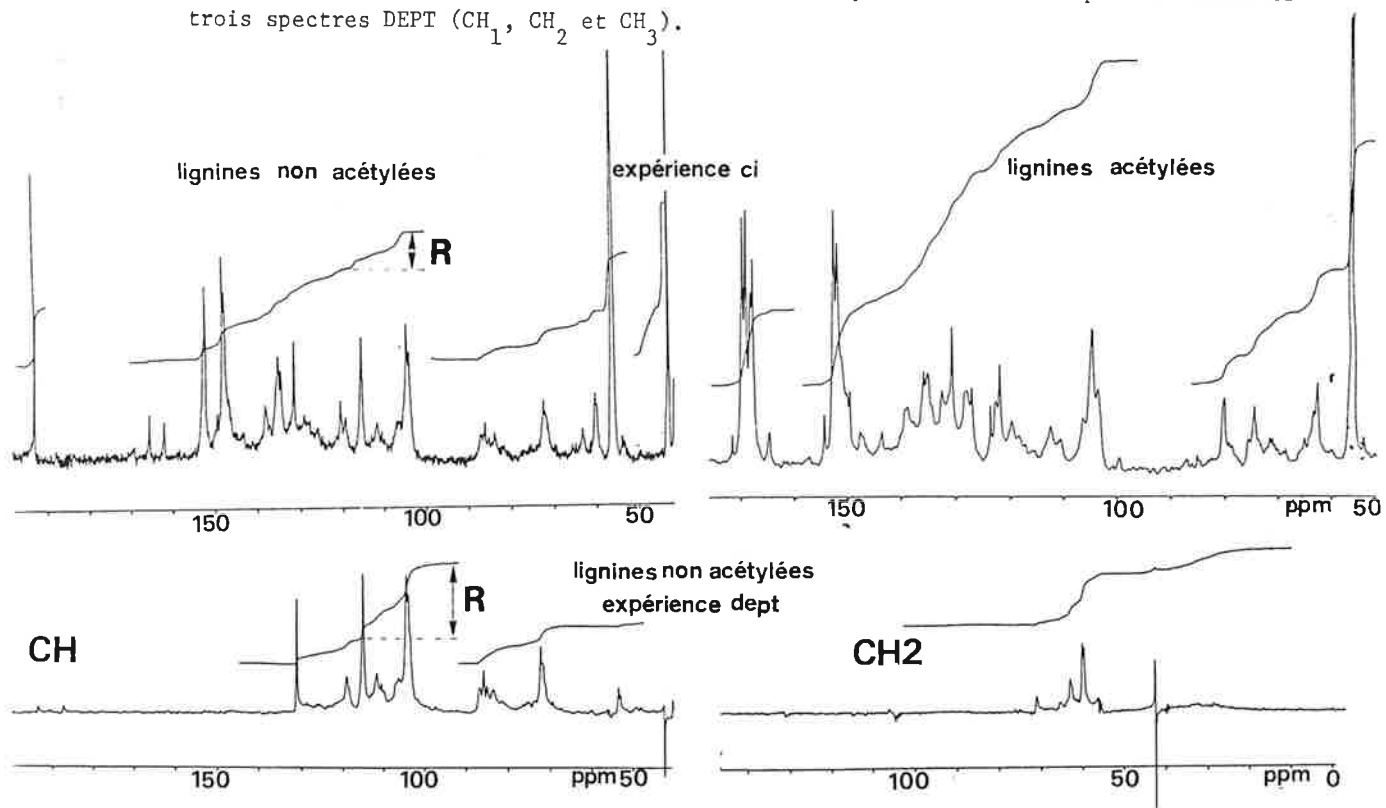


Figure 62 : Spectres et intégrales utilisés pour la caractérisation structurale quantitative de la fraction IE de la lignine C de l'échantillon n° 3 ; l'intégrale notée R sert de référence pour l'exploitation conjointe des spectres enregistrés avec les séquences CI et DEPT.

TABLEAU 19 : Analyses élémentaires des lignines IE n° 1 et 3 établies à partir des spectres CI et DEPT.

: TENEURS EN CARBONE, OXYGENE ET HYDROGENE DEDUITES DES INTEGRALES DES SIGNAUX EN RMN ¹³ C									
: ECHANTILLON 3					: ECHANTILLON 1				
: Région spectrale et : expérience RMN : considérées	: inté- : grale	C	H	O	: inté- : grale	C	H	O	
:C-1 et C- des unités									
:pOH (signaux n° 8 et 9 : du spectre CI)	: 4,62	4,62	2,3	4,62	: 3,58	3,58	1,8	3,58	
:Total des carbones									
:aromatiques (signaux : entre 152 et 103 ppm, : spectre CI)	: 199	199	-	33,16	: 186	186	-	31	
:CH aromatique (signaux : entre 132 et 103 ppm : spectre CH)	: (81) ^a	(81) ^a	81	0	: (70,2) ^a	(70,2) ^a	70,2	0	
:C-2 et C-6 des unités									
:pOH (signal n° 21, : spectre CH)	: (4,62) ^a	(4,62) ^a	(4,62) ^a	0	: ((3,58) ^a	(3,58) ^a	(3,58) ^a	0	
:CH liés à des oxygènes : (signaux entre 88 et : 70 ppm, spectre CH)	: 26	26	26	26	: 14	14	14	14	
:CH ₂ liés à des oxygènes: : (signaux entre 71,3 et : 60 ppm, spectre CH ₂)	: 19	19	38	19	: 9,7	9,7	19,4	9,7	
:Carbones des méthoxyles: : (spectre CI)	: 39	39	117	39	: 30	30	90	30	
:Carbones CH ₂ non liés : à des oxygènes (signal : n° 54 du spectre CH ₂)	: 9,5	9,5	19	0	: 14,5	14,5	29	0	
: TOTAL	: 297,12	297,12	285,6	121,8	: 257,5	257,5	230,5	91	
: Masse (en g)	: 3565	286	1948		: 3093	230,5	1454		
: Analyse élémentaire (%)									
: - déduite de la ligne : précédente	: 61,5	4,93	33,6		: 64,7	4,8	30,43		
: - d'après la micro- : analyse	: 61,2	5,76	33		: 63,9	5,56	30		

a) les valeurs données entre parenthèses sont redondantes.

Tableau 20 : Exploitation quantitative des spectres CI et DEPT des lignines IE n° 1 et 3 acétylées ou non

Echantillon	Echantillon non acétylé ^c						Echantillon acétylé				
	p-OH	OMe	CH/CT	β -O-S	CH _{oxy}	CH _{2oxy}	CH ₂	OMe	OH _t	OH _{ar}	OH _{Ilaire}
3	a	5,8	1,18	0,41	0,78	0,57	0,29	1,17	1,27	0,47	0,36
	b	6,2	1,25	0,38	0,84	0,61	0,31				0,43
1	a	4,8	0,97	0,38	0,45	0,31	0,47	0,94	0,91	0,61	0,11
	b	5,05	1,01	0,36	0,47	0,33	0,49				0,21

a : calculs effectués sans tenir compte des unités parahydroxybenzoïques.

b : calculs effectués en tenant compte des unités parahydroxybenzoïques.

c : les calculs sont effectués à partir des données du tableau 19.

Légendes :

pOH : teneur en unité parahydroxybenzoïque pour cent unités aromatiques.

OMe : taux de méthoxyle par unité aromatique.

CH/CT : rapport entre les carbones CH aromatiques (spectre DEPT) et le total des carbones aromatiques.

β -O-S : taux de syringyle étherifié en position 4 par unité aromatique (intégrale du signal n°12)

CH oxy, CH₂ oxy : taux de CH, CH₂ liés à des oxygènes par unité aromatique.

CH₂ : CH₂ non liés à des oxygènes par unité aromatique (intégrale du signal n°43).

OH_t, OH_{ar}, OH_{Ilaire} : taux d'hydroxyles totaux, phénoliques, primaires et secondaires par unité aromatique.

III.322. Détermination de la composition en C, H et O : analyse centésimale par RMN

a) principe de calcul

Le tableau 19 donne les valeurs des intégrales des différents types de carbones définis. De ces valeurs, les intégrales relatives des protons portés par les carbones sont déduites facilement.

Pour déterminer la teneur en oxygène nous avons considéré qu'il y avait un hydroxyle phénolique libre ou éthérifié par noyau aromatique et un oxygène par carbone aliphatique absorbant entre 100 et 56 ppm.

Par la suite on déduit facilement la contribution pondérale de chacun des éléments C, H et O en tenant compte de leur masse moléculaire respective.

b) Résultats

Nous pouvons alors donner l'analyse élémentaire de ces échantillons (avant-dernière ligne du tableau 19).

La comparaison des résultats obtenus par RMN avec ceux de la microanalyse montre que l'on détermine les pourcentages de carbone et d'oxygène de façon tout à fait précise. En revanche, la précision est moins bonne pour la détermination de l'hydrogène.

De manière identique on peut déterminer le pourcentage de méthoxyle pour chacun des échantillons.

Tableau 21	% de méthoxyle déterminé par : !				
	!	RMN	Microanalyse	! écart entre	!
	!			! les deux méthodes!	!
	!			!	!
!échantillon 3	!	20,9	18,6	!	12 %
!échantillon 1	!	19,5	17,1	!	14 %
!	!			!	!

Le taux de méthoxyles déterminé par RMN apparaît tout à fait correct.

Ces calculs illustrent la validité de l'exploitation quantitative des spectres RMN du ^{13}C .

Alors que les résultats établis dans les chapitres précédents montrent nettement des changements structuraux des lignines extraites selon les conditions de traitement, il est intéressant de noter que les analyses élémentaires (RMN, microanalyse) ne révèlent pas de différence essentielles entre les lignines N° 1 et 3. De même, le taux de méthoxyles n'évolue guère.

III.323. Interprétation des teneurs en méthoxyles déterminées par RMN : conséquences structurales

Nous avons montré que les extraits au dioxanne-eau, à l'acétone des bois traités contiennent certains contaminants : acides gras, hydrates de carbone et leurs produits de dégradation. L'importance de ces contaminants peut être appréciée si l'on considère les rendements maximums (24 %) en lignines extraites (fig. 55B). En effet ils avoisinent la teneur en lignine déterminée pour le bois de peuplier non traité alors qu'il reste encore 3 à 4 % de lignines résiduelles, dosages effectués à l'Ecole Française de Papeterie (146).

On a montré que certaines étapes des protocoles suivis permettent de les éliminer :

- les hydrates de carbone et leurs produits de dégradation sont essentiellement éliminés par l'extraction à l'eau des bois traités,
- les extractibles lipophiles restent en solution dans l'éther éthylique lors de la précipitation des extraits dans ce solvant.

Ainsi, les fractions de lignines IE des échantillons 1 et 3 fournissent des échantillons normalement débarrassés de tous contaminants libres.

Le problème de la présence de molécules contaminantes est important pour interpréter l'évolution du taux de méthoxyles déterminé par RMN.

Le taux de OMe par unité aromatique compris entre 1,5 et 1,7 pour la lignine MWL devient 1,3 et 1 pour les lignines IE N° 3 et 1. Néanmoins, sur les spectres RMN ^{13}C de ces lignines les signaux 31 et 32 attribués aux carbones C-2 et C-6 des syringyles confirment la présence en quantité importante de ces unités.

Le taux de méthoxyle par unité aromatique est calculé à partir de l'aire du signal et de l'aire totale des signaux des carbones aromatiques. Une diminution de ce rapport traduit, soit une diminution du signal des méthoxyles soit une augmentation des signaux de la région de carbones aromatiques (158 et 100 ppm). Nous allons étudier les conséquences structurales de ces deux hypothèses.

a) Disparition des méthoxyles

La disparition des signaux ^{13}C des groupes méthoxyles peut s'expliquer soit par déméthylation soit par déméthoxylation. La déméthylation conduirait à la formation de nouveaux composés hydroxylés, du type catéchols, par exemple, or nous n'avons pas détecté de tels composés dans l'étude des monomères et dimères des fractions solubles dans l'éther éthylique (§ III.423). La déméthoxylation n'est décrite qu'à partir des températures élevées (147) ; pour les échantillons 1 et 3 la pression de 40 bars entraîne une température de la vapeur d'eau de 270°, on se trouve dans la gamme des températures où des réactions de déméthoxylation sont envisageables. Nous pouvons comparer les caractéristiques structurales des échantillons 1 et 3 (tabl. 22), établies à partir des données du tableau 20.

TABLEAU 22 :	MWL	3	1
. Chaînes aliphatiques complètes	1	0,48	0,28
. Unités syringyles incluses dans des liaisons alkyl-aryl éther β -O-4	0,6	0,3	0,15
. Taux de CH ₂ saturés	0	0,36	0,49
. Degré de condensation	0	0,44	1
. Hydroxyles phénoliques libres	0,2	0,47	0,61
. Hydroxyles phénoliques liés (si on considère un hydroxyle phénolique par unité aromatique)	0,8	0,53	0,39
. Hydroxyles phénoliques liés non inclus dans des structures β -O-4	0,2	0,23	0,24

(les données sont exprimées par unité aromatique)

Les structures diarylméthane peuvent être estimées à 0,49 par unité aromatique pour l'échantillon 1 et à 0,36 pour l'échantillon 3. Les autres condensations possibles sur le noyau aromatique peuvent être le fait des structures diaryl éther ou diphényle. Ces structures sont estimées à $(1 - 0,49)$ soit 0,51 par unité aromatique pour l'échantillon 1 et à $(0,44 - 0,36)$ soit 0,08 pour l'échantillon 3. Dans la caractérisation structurale de l'échantillon 1 le taux de 0,24 représente les structures diaryl éther, les structures diphényle sont alors estimées à $0,51 - 0,24$, soit 0,27 par unité aromatique. Ces structures sont quasiment insignifiantes dans l'échantillon 3 puisque l'ensemble de ces structures condensées représentent un taux de 0,06 par unité aromatique, le taux de 0,23, représentant les hydroxyles liés par unité aromatique, représente alors essentiellement les unités gâciacyles incluses dans des liaisons alkyl-aryl éther. On constate en comparant les lignines 1 et 3 que les structures diarylméthane se formeraient préférentiellement aux structures diaryl éther et diphényle.

b) Augmentation de l'aire des carbones aromatiques.

Pour estimer le nombre de nouveaux carbones qui absorbent dans la région attribuée aux carbones aromatiques nous proposons un calcul basé sur la comparaison du taux de méthoxyles par aromatique de la lignine MWL avec les taux de méthoxyles déterminés par les lignines 1 et 3.

On pose à priori que le taux de méthoxyles déterminé pour la lignine standard MWL est représentatif de toute la lignine et on suppose que le traitement appliqué n'affecte pas les groupements méthoxyles.

Soit A_r l'aire des carbones aromatiques de la lignine MWL

Soit OMe l'aire des carbones méthoxyliques de la lignine MWL

Soit a l'aire (inconnue) des carbones absorbant dans cette région :

$$\text{Pour la lignine MWL on a } \frac{OMe \times 6}{A_r} = 1,5 \quad (1)$$

Pour chacun des échantillons 1 et 3 on peut alors écrire :

$$\text{pour la lignine 3 } \frac{OMe \times 6}{A_r + a_3} = 1,17 \quad (2)$$

$$\text{pour la lignine 1} \quad \frac{\text{OMe} \times 6}{\text{Ar} + a_1} = 1 \quad (3)$$

à partir des équations (1) et (2) d'une part et (1) et (3) d'autre part on déduit facilement pour chacune des lignines la grandeur a , puis le rapport $a/(\text{Ar} + a)$ qui représente le taux de carbones surnuméraires absorbant dans la région des aromatiques.

On trouve 20 % pour la lignine 3 et 33 % pour la lignine 1.

Nous pouvons d'ailleurs généraliser ce calcul :

$$\text{si pour une lignine MWL, on a } \frac{\text{OMe} \times 6}{\text{Ar} + a} = T \quad (4)$$

on peut alors exprimer le taux de méthoxyle, déterminé expérimentalement, de la manière suivante :

$$\frac{\text{OMe} \times 6}{\text{Ar} + a} = T + \Delta T \quad (5)$$

ΔT étant la différence entre le taux de méthoxyle de la lignine MWL et de la lignine de bois traité.

on déduit alors de (4) et (5) :

$$\frac{a}{\text{Ar} + a} = \frac{-\Delta T}{T} \quad \text{et} \quad \frac{a}{\text{Ar}} = \frac{-\Delta T}{T + \Delta T}$$

L'étude quantitative des lignines que nous avons développée au paragraphe III.312 a révélé une disparition des chaînes propanes oxygénées avec la sévérité du traitement appliqué. Le tableau 20 établi pour les fractions IE de lignines 1 et 3 le confirme.

Il est tout à fait possible de calculer le pourcentage de carbone de la chaîne propane oxygénée qui disparaissent.

Si l'on considère que la lignine standard MWL possède une chaîne propane par unité aromatique le nombre n de carbone qui disparaissent est donné par la relation :

$$n = 3 - 3(\text{CH}_{\text{oxy}} + \text{CH}_{2\text{oxy}}) + \text{CH}_2$$

CH_{oxy} , $\text{CH}_{2\text{oxy}}$: taux de CH, CH_2 liés à des oxygènes.

CH_2 : taux de CH_2 à champ fort

Les valeurs de CH_{oxy} , $\text{CH}_{2\text{oxy}}$ et CH_2 sont celles du tableau 20.

On trouve pour les fractions IE des échantillons N° 3 et 1 respectivement 1,26 et 1,73 carbones par aromatique soit 21 % et 30 %.

Le réarrangement des carbones du maillon propane en structures absorbant dans la région des aromatiques rendrait tout à fait compte de la diminution du taux de méthoxyles.

III.4. ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES COMPOSES DE FAIBLES MASSE MOLECULAIRE

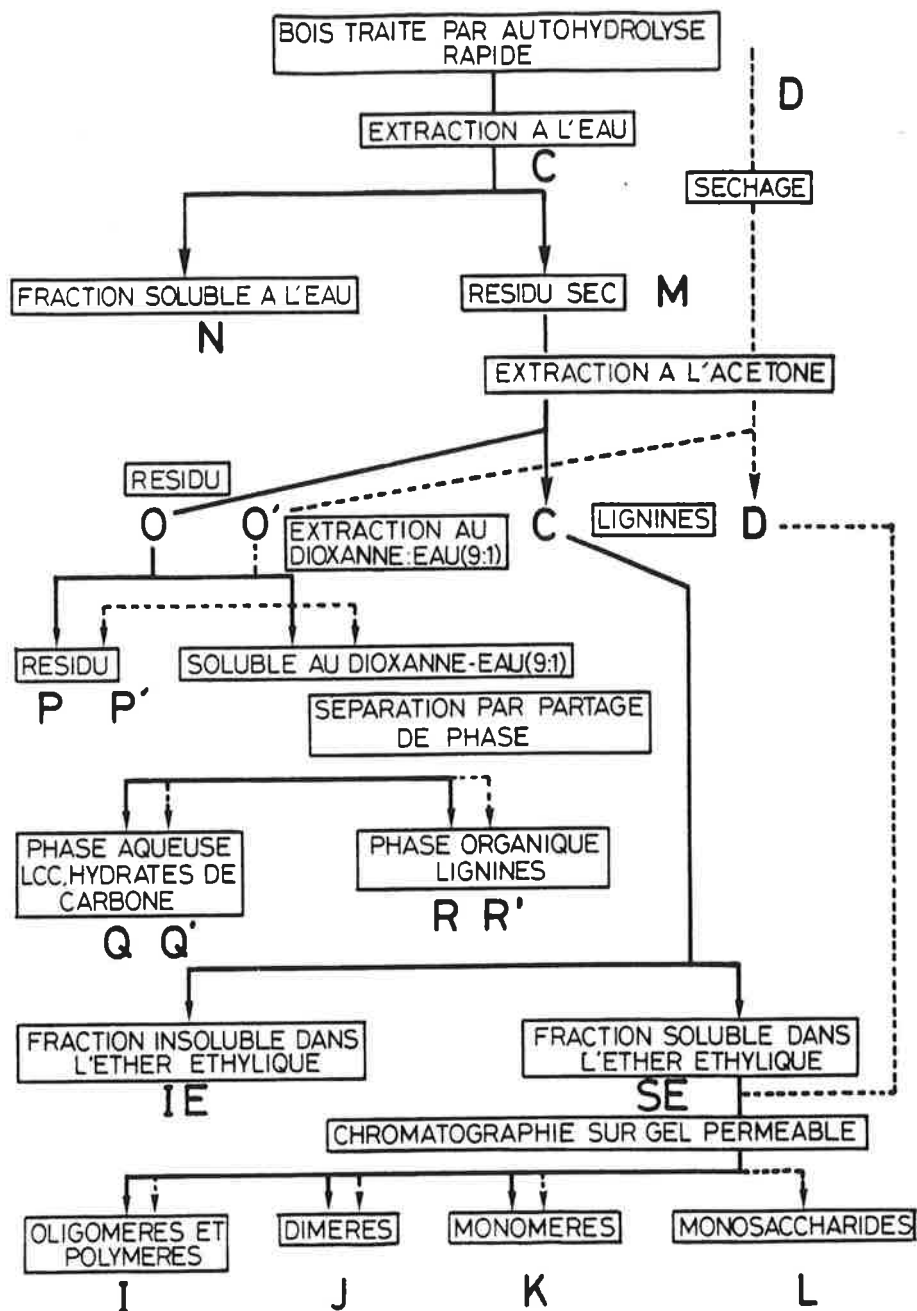
L'analyse des échantillons de lignines en RMN du ^{13}C nous a permis de caractériser les structures des lignines étudiées. Les modifications structurales des macromolécules apparaissant lors du traitement par autohydrolyse rapide ont été clairement mises en évidence. En revanche, ces seules données ne sont pas suffisantes pour modéliser les mécanismes réactionnels intervenant au cours de l'autohydrolyse rapide des bois. La compréhension des mécanismes réactionnels nécessite l'analyse des produits de dégradation, en particulier ceux de faible masse moléculaire. L'identification des produits de dégradation renseigne sur la nature des mécanismes, tandis que leur abondance renseigne sur l'ampleur des mécanismes. C'est une démarche classique pour comprendre et caractériser les mécanismes chimiques intervenant dans la chimie des lignines et des procédés de délignification (148 à 151).

III.4.1. Rappels expérimentaux

III.4.1.1. Généralités

Pour préparer les échantillons de lignines nécessaires à la caractérisation des produits de faible masse moléculaire nous avons repris le protocole basé sur une extraction par l'acétone au Soxhlet (voies C ou D - fig. 33). Les résultats présentés ont été établis sur trois échantillons, l'échantillon n°3 (45 bars, 45 secondes) l'échantillon n°1 (40 bars, 205 secondes) et l'échantillon E_{61} (40 bars, 45 secondes). Rappelons que les échantillons de bois traités n°1 et n°3, ont été extraits à l'eau (voie C), avant de nous être fournis, alors que l'échantillon E_{61} n'a pas été extrait à l'eau (voie D). La figure 63 visualise les étapes d'extraction des échantillons de bois traités et la séparation des extraits en différentes fractions.

Figure 63 : Extraction et fractionnement des échantillons des lignines.



III.4.1.2. Chromatographie sur gel perméable

La chromatographie sur gel perméable (CGP) nous a permis de séparer les monomères et dimères du reste des molécules de degré de polymérisation supérieur. Pour séparer les polyphénols par des techniques de CGP de très nombreux systèmes (support, solvants) sont proposés dans la littérature (152 à 156) L'opportunité de leur utilisation dépend de la nature des lignines étudiées (naturelles, c'est-à-dire extraites selon le protocole de Björkman, industrielles, dérivatisées ou non) et des études envisagées (détermination des distributions en masse, séparation quantitative des différentes fractions).

Pour nos études, nous avons utilisé les systèmes mis au point par K. Lundquist et collaborateurs (155 - 156) pour caractériser différentes lignines et complexes lignine - hydrate de carbone. L'étalonnage de ces systèmes par la chromatographie de composés modèles leur a permis d'en démontrer les performances. K. Lundquist a utilisé avec succès le système Sephadex G-25 dioxanne-eau (1:1) pour séparer les produits de dégradation de faible masse moléculaire obtenus lors de l'acidolyse de lignines MWL extraites selon le protocole Björkman (70-71). Ce problème est très similaire de celui que nous traitons dans ce chapitre. Le tableau 23 résume les caractéristiques des systèmes CPG utilisés pour ces études.

Les composés phénoliques absorbent dans l'ultraviolet à 280 nm ce qui permet une détection simple de leur présence en chromatographie sur couche mince. On peut très facilement repérer les composés de faible masse moléculaire et comparer les différentes fractions obtenues en chromatographie sur gel perméable.

Pour la séparation quantitative nous avons chromatographié les extraits sur une colonne ouverte, en utilisant le gel perméable Sephadex G-25 et le mélange dioxane-eau (1 : 1) comme éluant, ce système permet de séparer les monomères, les dimères et les oligomères de faible degré de polymérisation (3 ou 4) tandis que les polymères sont exclus du gel (70). Les monosaccharides et oligosaccharides, partiellement absorbés sur ce gel, sont élués en dernier (156). Pour chacun des échantillons chromatographiés nous avons récupéré des éluats de 8 à 10 ml. Les spectres d'absorptions dans l'ultraviolet (200 à 400 nm) des éluats sont enregistrés. Tous les éluats sont analysés en chromatographie sur couche mince et les chromatogrammes obtenus sont comparés à ceux des solutions de composés modèles. Il est facile alors de regrouper les éluats en différentes fractions : monomères, dimères et oligomères.

Tableau 23 : CARACTERISTIQUES DES SYSTEMES DE CHROMATOGRAPHIE SUR GEL PERMEABLE UTILISES POUR LE FRACTIONNEMENT ANALYTIQUE OU PREPARATIF DES LIGNINES EXTRAITES DU BOIS TRAITE PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE (70, 71, 155, 156).

<u>SYSTEME UTILISE</u>	<u>CARACTERISTIQUES</u>
Sephadex LH-20 /Diméthylformamide - acide acétique (100 M)	Les composés phénoliques et les complexes lignine-hydrates de carbone sont séparés suivant leur masse : très bonne résolution des monomères, dimères et trimères, les composés de masse moléculaire élevée sont exclus.
Sephadex G-25/Dioxane-eau (1:1)	Les lignines et complexes lignine -hydrates de carbone sont séparés suivant leur masse moléculaire. Les polysaccharides et les fractions de haute masse moléculaire sont exclus du gel ($k_d' = 0$). Des phénomènes d'absorption existent avec les monosaccharides seuls qui sont alors très retenus sur ce système ($k_d' > 1$). Très efficace pour les séparations quantitatives.
Sephadex LH-60/Diméthylformamide acide acétique (100:1)	Décrit bien la distribution en masses des échantillons de lignine ou de complexe lignine-hydrates de carbone des monomères aux polymères de masse moléculaire élevée.

III.42. Résultats

Les rendements en lignines aux différentes étapes d'extraction et de séparation sont consignés dans le tableau 24.

Tableau 24 : RENDEMENTS (EN POUR CENT DU BOIS DE DEPART)
DES DIFFERENTES FRACTIONS EXTRAITES DES BOIS TRAITES

FRACTIONS	ECHANTILLON 3 voie C	ECHANTILLON 1 voie C	ECHANTILLON E ₆₁ voie D
Bois traité	92 %	78 %	90 %
Extrait à l'eau (N)	18 %	4 %	0 %
Résidu extrait à l'eau (M)	74 %	74 %	90 %
Extrait à l'acétone (C)	18 %	27 %	35 %
Résidu extrait à l'acétone (Q, Q')	56 %	47 %	55 %
Extrait au dioxane-eau	3 %	1,5 %	(5 %)
Résidu final (P, P')	50 %	44 %	(45 %)
Lignine résiduelle RR'	2 %	1 %	1,5 %

III.421. Analyse des chromatogrammes obtenus par^ICPG

a) Comparaison des extraits C, R, et de la lignine MWL

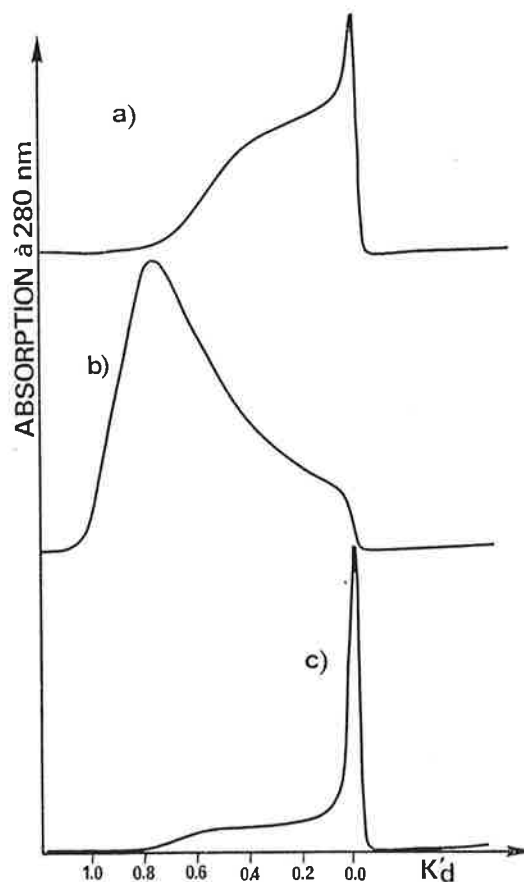


Figure 64 :
Chromatographie sur gel perméable Sephadex
LH-60/DMF acide acétique (100:1) de la lignine
MWL de référence (courbe a) et des lignines C
(courbe b) et R (courbe c) extraites du bois
traité n° 3.

Les chromatogrammes obtenus sur gel perméable Séphadex LH-60 en utilisant le mélange diméthylformamide-acide acétique (100 : 1) comme éluant, démontrent que les fractions de lignines C et R isolées de l'échantillon n° 3 ont des distributions en masse différentes (fig. 64 b,c) et tout à fait distinctes de la lignine MWL (fig. 64 a). Pour la lignine MWL extraite selon le protocole de Björkman le pic le plus intense (fig. 64a) est celui des molécules de masse moléculaire élevée ($K_d' = 0$), tandis que les fragments de faible masse moléculaire dominant dans l'extrait total à l'acétone C (fig. 64b). En revanche, les quelques pour cent de lignine R résiduelle extraits au dioxanne-eau et purifiés par partage de phase, correspondent à une lignine dans laquelle dominant très nettement les fragments de masse moléculaire élevée (fig. 64c).

Si l'on considère la lignine MWL représentative de la lignine "in situ" on constate que le traitement entraîne la formation en quantité importante de produits de faible masse moléculaire et démontre la dépolymérisation de la lignine au cours du traitement d'autohydrolyse rapide.

b) Effets de la précipitation dans l'éther éthylique

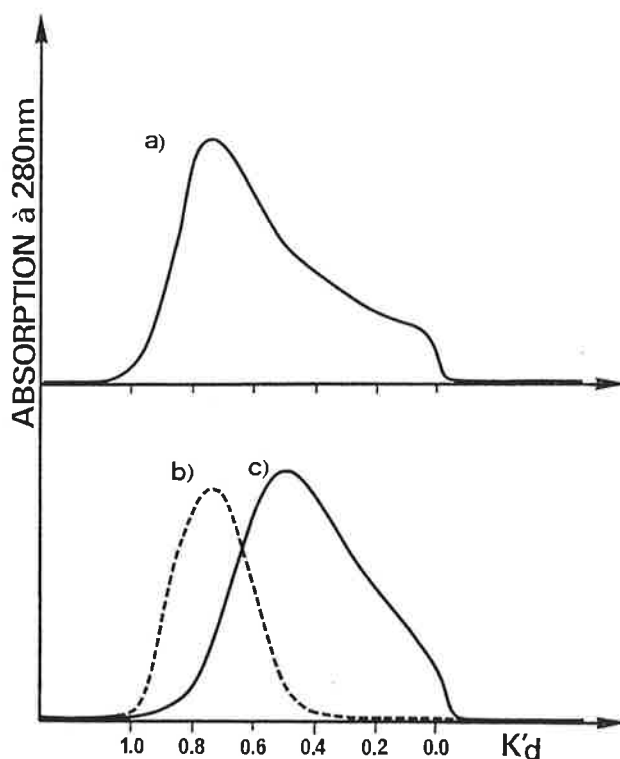
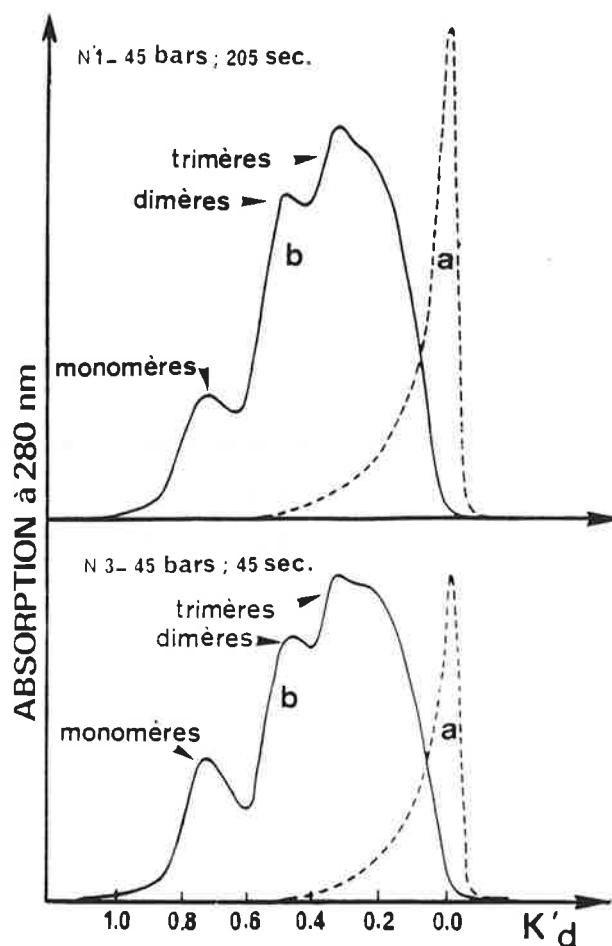


Figure 65 :
Effet de la précipitation dans l'éther éthylique de l'extrait total à l'acétone (lignine C, fig. 63) du bois traité n° 3 : chromatographie sur gel perméable Séphadex LH-60/DMF acide acétique (100:1) de la lignine C (courbe a) et de ses fractions SE (courbe b) et IE (courbe c).

Les courbes présentées sur la figure 65 illustrent l'efficacité de la précipitation dans l'éther éthylique : les molécules de faible masse moléculaire restent en solution (fraction SE) tandis que les molécules de masse moléculaire élevée correspondant à des fragments plus polymérisés précipitent (fraction IE).

Figure 66 :
Chromatographie sur gel perméable Séphadex LH-20/DMF - acide acétique (100:1) des fractions insolubles (courbe a) et solubles (courbes b) dans l'éther éthylique des lignines C extraites des bois traités n° 1 et n° 3.



Le système de chromatographie Sephadex LH-60/DMF-acide acétique (100 : 1) améliore la résolution des chromatogrammes obtenus pour les fractions SE solubles dans l'éther éthylique (fig. 66). On identifie alors sans ambiguïté le pic des monomères, celui des dimères et des trimères en comparant les chromatogrammes à ceux de composés modèles enregistrés dans les mêmes conditions. Ces chromatogrammes montrent que les fractions IE définies par précipitation dans l'éther éthylique contiennent des produits de masse moléculaire égale ou supérieures à celles des trimères. La figure 66 donne les chromatogrammes des fractions SE et IE des lignines C extraites à l'acétone des bois n° 1 et n° 3. Malgré des conditions de traitement des bois très différentes on ne

repère aucune différence sur les chromatogrammes pour chacune des fractions SE et ISE entre les échantillons n° 1 et n° 3.

Les systèmes de chromatographie sur gel perméable utilisés nous ont permis de caractériser qualitativement les différentes fractions quant à leur distribution en masse, et nous démontrons ainsi l'opportunité des protocoles suivis pour leur préparation.

III.422. Séparation quantitative des monomères, dimères et oligomères

Précédemment, il a été possible de comparer et discuter qualitativement les résultats obtenus par chromatographie sur gel perméable. Nous avons préféré ne pas exploiter quantitativement ces résultats : en effet les absorptions dans l'ultraviolet des composés phénoliques varient beaucoup en fonction du degré de polymérisation, des substituants sur le noyau aromatique et du degré d'insaturation des chaînes aliphatiques. Par exemple, les courbes d'absorption dans l'ultraviolet des lignines insolubles dans l'éther éthylique, présentent un maximum commun à 272 nm mais les intensités d'absorption $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ pour ces deux échantillons diffèrent nettement :

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 230 \pm 1,5 \text{ pour l'échantillon 3}$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 290 \pm 1,3 \text{ pour l'échantillon 1}$$

La valeur de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ est définie comme l'intensité d'absorption d'une solution à 1 % du produit dans une cellule de 1 cm de traversée optique. Certains contaminants peuvent également modifier sensiblement l'absorption dans l'ultraviolet des fractions analysées : par exemple l'hydroxyméthylfurfural présent dans les fractions solubles dans l'éther éthylique à un coefficient d'absorption $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 12 000.

De ce fait, la séparation quantitative des monomères, dimères et oligomères en utilisant le système CGP Sephadex G-25/dioxanne-eau (1 : 1) pallie ces différents inconvénients.

Une fois les différents éluats regroupés selon leur chromatogramme en CCM, une analyse qualitative en chromatographie sur gel perméable permet de vérifier la qualité des séparations effectuées : par exemple, sur la figure 67 la fraction de monomères contient encore quelques dimères et vice versa.

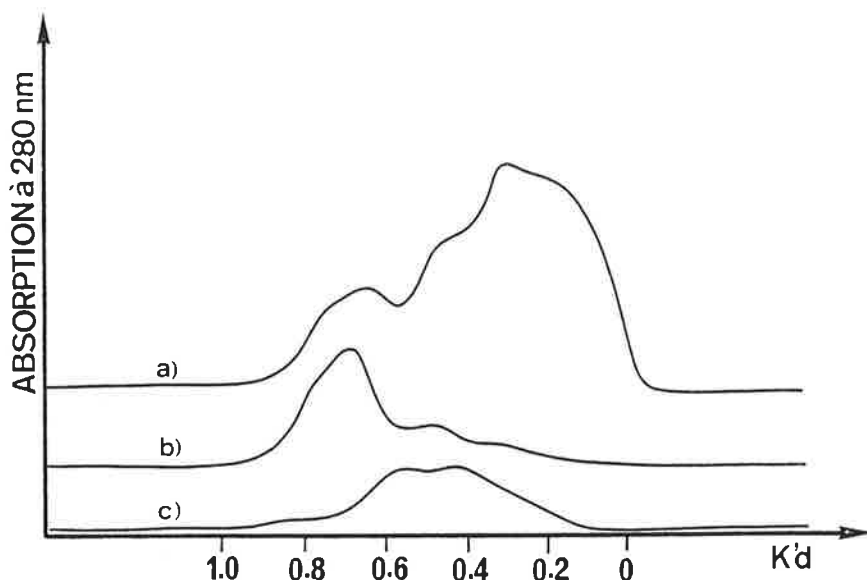


Figure 67 :

Chromatographie sur gel perméable Séphadex LH-20/DMF - acide acétique

(100:1) de la fraction SE, soluble dans l'éther éthylique (courbe a), de

la fraction de dimères (courbe c) et de la fraction de monomères (courbe b) isolées de la lignines C extraite de l'échantillon de bois traité n° 3.

On peut alors estimer quantitativement chacune des fractions. C'est ainsi que le tableau 25 a été établi. Pour les échantillons n° 1 et n° 3 les pourcentages de monomères, dimères et oligomères exprimés par rapport aux extraits totaux à l'acétone (C) sont tout à fait comparables.

Tableau 25 : RENDEMENTS DES DIFFERENTES FRACTIONS SEPARÉES A PARTIR DES EXTRAITS TOTAUX DE LIGNINES

FRACTIONS	ECHANTILLON 3 45 bars/ 45 sec.		ECHANTILLON 1 45 bars/ 205 sec.		ECHANTILLON E ₆₁ 40 bars/ 165 sec.	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Extrait à l'acétone (C ou D)	18 %	100 %	27 %	100 %	35 %	100 %
Fraction insoluble dans l'éther (IE)	10 %	58 %	15,7 %	58 %	18 %	51 %
Fraction soluble dans l'éther (SE)	6,3 %	35 %	10,5 %	39 %	16,8 %	48 %
	CPG		CEP		(3)	(3)
Polymères et oligomères (I)	2,3 %	13 %	4,5 %	17 %	22 %	63 %
Dimères (J)	2,3 %	13 %	4,0 %	15 %	5 %	14,2 %
Monomères (K)	0,8 %	4,4 %	1,2 %	4,4 %	4 %	11,4 %
Monosaccharides (L)	0	0	0	0	4 %	11,4 %

1) par rapport au bois de départ, 2) par rapport à la lignine extraite.

3) fractionnement par CEP de l'extrait total à l'acétone (lignine D, figure 63).

Le point faible de cette estimation provient du fait que les échantillons 1 et 3 ont été extraits à l'eau avant de nous être fournis. Or, comme nous l'avons montré dans le chapitre III.41, les eaux d'extraction des échantillons de bois traités contiennent des composés extractibles par l'éther éthylique. Nous avons donc effectué sur l'échantillon de bois traité E₆₁ non extrait à l'eau le même type de fractionnement en omettant l'extraction à l'eau et la précipitation dans l'éther éthylique (fig. 33, voie D). Les résultats sont donnés dans le tableau 25. Le pourcentage de monomères nettement plus élevé que pour les échantillons 1 et 3 représente 4 % du bois de départ.

Au moins 20 % de cette fraction de monomères est constituée par l'hydroxyméthylfurfural. En effet, dans le système de chromatographie utilisé Sephadex G-25/dioxanne-eau (1:1), l'hydroxyméthylfurfural est élué principalement entre les monophénols et les monosaccharides. Certains éluats ne contenaient en effet que l'hydrométhylfurfural et nous avons pu en estimer la masse. Les pourcentages en monomères, dimères et oligomères sont tout à fait comparables à ceux des échantillons 1 et 3, compte tenu des conditions de traitement. L'extraction à l'eau modifie la composition en composés de faible masse moléculaire en solubilisant les monosaccharides, l'hydroxyméthylfurfural et certains monophénols. Nous démontrons ainsi que l'extraction des échantillons de bois traité par l'eau permet d'extraire ultérieurement des lignines débarrassées de ces composés. Cette étape d'extraction à l'eau présente un avantage certain pour l'obtention de lignines non contaminées.

Nous avons ensuite identifié les principaux constituants des fractions de monomères et dimères isolées précédemment, par chromatographie sur gel perméable.

III.423. Identification des monomères et dimères

Dans une première étape nous avons repéré, en chromatographie, sur couche mince, les constituants des fractions de monomères et de dimères, en comparant leur chromatogramme à ceux de solutions de composés phénoliques commerciaux ou synthétisés au laboratoire et susceptibles d'être libérés au cours du traitement. Cette technique nous a permis d'identifier les principaux constituants dans chacune des fractions de monomères ou de dimères. Le tableau 26 donne les molécules que nous

avons pu identifier par CCM, ainsi que les révélateurs qui ont permis leur caractérisation.

TABEAU 26 : MOLECULES IDENTIFIEES EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ;
ELUANT : TOLUENE - DIOXANNE - ACIDE ACETIQUE (90 : 25 : 4).

Molécule	Rf	Révélateur	Réaction caractéristique
Stilbène (12)	0,46	I	Forte couleur orangée brunâtre
Aldelyde coniféry- lique (4)	0,45	IV	Tache violet-rouge
Aldelyde sinapylique (9)	0,42	IV	Tache pourpre
Stilbène (13)	0,40	I	Forte couleur orangée brunâtre
Stilbène (14)	0,32	I	Idem
Acide parahydroxyben- zoïque (1)	0,32	II	Disparition de la tache violette visible sous UV
Hydroxyméthylfurfural (2) (2)	0,28	III	Tache jaune
Episyringarésinol (17)	0,23	II	Tache noire
Syringarésinol (18)	0,20	II	Tache noire
Révélateurs : I exposition aux vapeurs d'iode, II vaporisation H_2SO_4 - formaline (9:1) puis chauffage à 140° pendant quelques minutes, III vaporisation d'un mélange d'acide chlorydrique concentré (1V) à une solution à 15 % de 2 méthyl-indol dans l'ethano (4V) IV vaporisation d'une solution à 0,1 M de phloroglucinol dans l'éthanol à 60 %.			

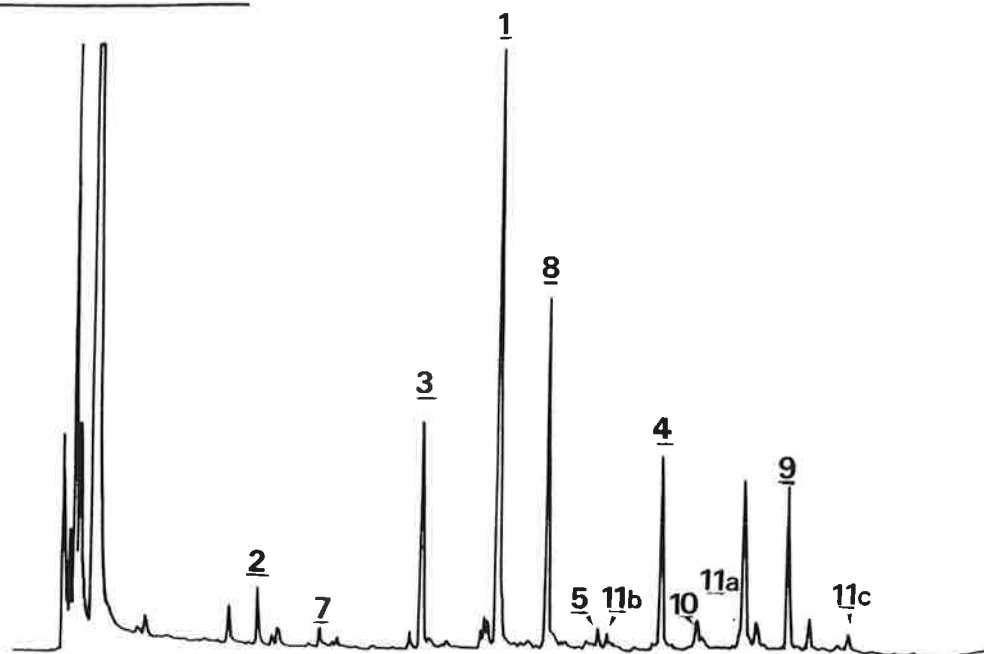
a) Analyse des monomères

Figure 68 : Chromatogramme obtenu en CG/MS de la fraction K des monomères triméthylsilylés de l'échantillon n° 1. Les indexes des pics correspondent aux molécules de la figure 69.

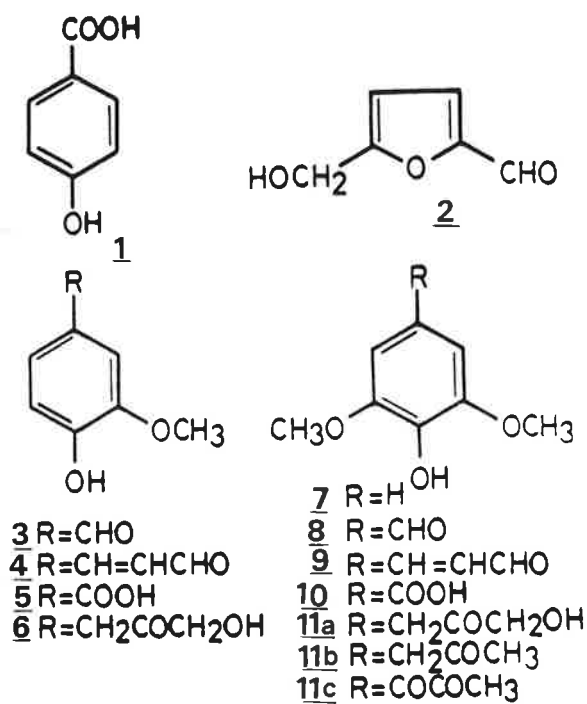


Figure 69 :
Monomères identifiés en CCM et en CG/SM des dérivés triméthylsilylés.

Les constituants triméthylsilylés de la fraction de monomères ont été analysés en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) par C. Lapierre à l'INRA de Paris-Grignon. La figure 68 donne un exemple de chromatogramme sur lequel nous avons noté les pics attribués. Il s'agit pour cet exemple de la fraction de monomère de

l'échantillon 1 (45 bars - 205 secondes). Les index correspondent aux molécules de la figure 69 identifiées sans ambiguïté par leur spectre de masse et leur temps de rétention. On retrouve en effet les mêmes monomères lors de l'acidolyse dans le dioxanne-eau de la lignine MWL de peuplier (77, 157). Les temps de rétention et les spectres de masse confirment la présence de monomères 1, 2, 4, 9 identifiés par CCM et permet d'identifier les autres monomères 3, 4, 5, 8 et 9.

L'analyse de la fraction K de monomères isolée à partir de la lignine C de l'échantillon n° 1 révèle les mêmes principaux constituants (tableau 27).

Tableau 27 : INTENSITE RELATIVE DES PRINCIPAUX MONOMERES
DES FRACTIONS 1 ET 3 ETABLIE A PARTIR DES CHROMATOGRAMMES
OBTENUS EN CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE

	ECHANTILLON 3	ECHANTILLON 1
Hydroxyméthylfurfural <u>2</u>	3	8
Syringol <u>7</u>	1	2
Aldéhyde vanillique <u>3</u>	12	8
Acide parahydroxybenzoïque <u>1</u>	46	54
Syringaldéhyde <u>8</u>	18	14
Acide vanillique <u>5</u>	1	2
Coniféraldéhyde <u>4</u>	10	3
Acide syringique <u>10</u>	0,8	2,4
Aldéhyde sinapylique <u>9</u>	8	8

L'acide parahydroxybenzoïque est l'élément majoritaire dans les deux échantillons. Le hydroxyméthyl-5 furfural-2 2, l'acide vanillique 5, l'acide syringique 10 sont plus abondants dans l'échantillon n° 1 que dans l'échantillon n° 3. En revanche, l'aldéhyde coniférylique 4 est plus abondant dans l'échantillon 3.

La fraction de monomères obtenue à partir de l'échantillon de bois E₆₁ non extrait à l'eau (voie D) révèle essentiellement des quantités plus importantes de l'hydroxyméthyl-5 furfural-2 2 et des cétones aromatiques du type cétones d'Hibbert 7 et 11.

b) Analyse des dimères
Identification de stilbènes

Les stilbènes sont très faciles à repérer, en chromatographie sur couche mince, par la couleur orangée qu'ils prennent en s'oxydant naturellement à l'air. L'oxydation peut être provoquée en exposant les chromatogrammes sur couches minces aux vapeurs d'iode. Les courbes d'absorption dans l'UV de certains éluats obtenus lors de la chromatographie des fractions sur le gel G-25 indiquaient déjà la présence de ces structures. En effet, certains éluats présentaient non seulement un maximum à 280 nm, mais également une inflexion à 300 nm caractéristique de ces structures de type stilbène (fig. 70).

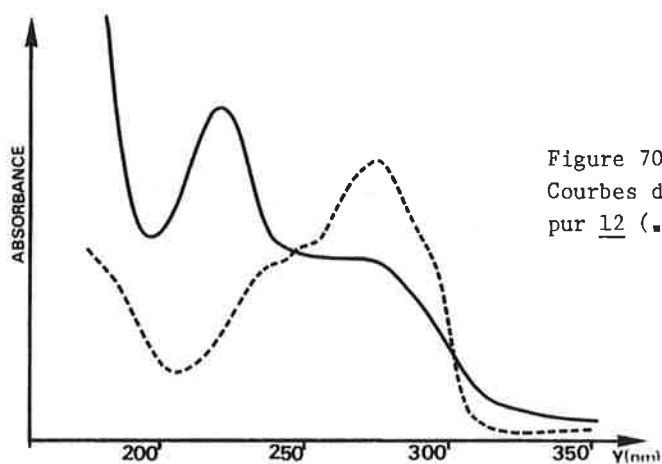


Figure 70 :
 Courbes d'absorption dans l'UV du digaiacystilbène
 pur 12 (---) et d'un des éluats isolés par CGP (—).

La présence des stilbènes dans la fraction dimère a été confirmée par l'étude de cette fraction par CG/SM qui permet de caractériser définitivement les stilbènes présents dans cette fraction.

La figure 71 donne un exemple de chromatogramme en phase gazeuse d'une fraction de dimères non acétylée. Les produits à bas R_f sont les monomères identifiés précédemment dans la fraction de monomères, tandis que les produits à hauts R_f correspondent aux différents dimères. Nous confirmons ainsi le résultat obtenu lors de l'analyse qualitative de cette fraction par chromatographie sur gel perméable (fig. 67), c'est-à-dire la présence de quelques monomères dans la fraction de dimères.

b) Analyse des dimèresIdentification de stilbènes

Les stilbènes sont très faciles à repérer, en chromatographie sur couche mince, par la couleur orangée qu'ils prennent en s'oxydant naturellement à l'air. L'oxydation peut être provoquée en exposant les chromatogrammes sur couches minces aux vapeurs d'iode. Les courbes d'absorption dans l'UV de certains éluats obtenus lors de la chromatographie des fractions sur le gel G-25 indiquaient déjà la présence de ces structures. En effet, certains éluats présentaient non seulement un maximum à 280 nm, mais également une inflexion à 300 nm caractéristique de ces structures de type stilbène (fig. 70).

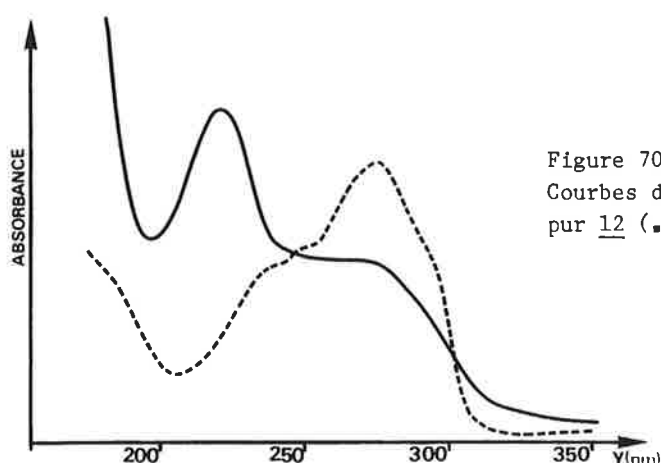


Figure 70 :
Courbes d'absorption dans l'UV du digaiacystilbène pur 12 (---) et d'un des éluats isolés par CGP (—).

La présence des stilbènes dans la fraction dimère a été confirmée par l'étude de cette fraction par CG/SM qui permet de caractériser définitivement les stilbènes présents dans cette fraction.

La figure 71 donne un exemple de chromatogramme en phase gazeuse d'une fraction de dimères non acétylée. Les produits à bas R_f sont les monomères identifiés précédemment dans la fraction de monomères, tandis que les produits à hauts R_f correspondent aux différents dimères. Nous confirmons ainsi le résultat obtenu lors de l'analyse qualitative de cette fraction par chromatographie sur gel perméable (fig. 67), c'est-à-dire la présence de quelques monomères dans la fraction de dimères.

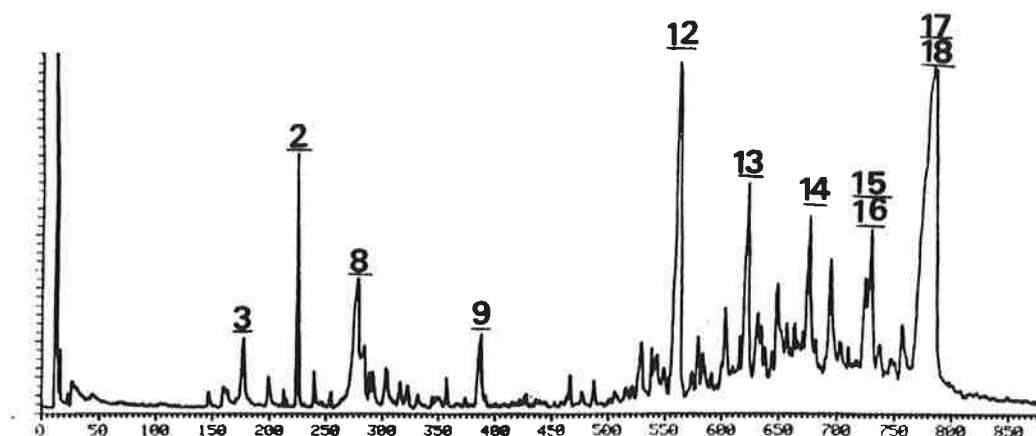


Figure 71 : Chromatogramme obtenu en CG/MS de la fraction J de dimères non dérivatisés de l'échantillon n° 3. Les index des pics correspondent aux molécules de la figure 73.

Le spectre de masse d'un stilbène a la caractéristique de présenter un signal très intense pour l'ion moléculaire. La figure 72a donne le spectre de masse du diglyacylstilbène 12 pur que nous avons utilisé précédemment pour repérer les stilbènes en chromatographie sur couche mince. Ce dernier a été analysé dans des conditions identiques à celles employées pour analyser les composés de la fraction dimère. En CG/SM on repère alors trois composés de la fraction dimère qui ont cette caractéristique de donner, en spectrométrie de masse, des pics intenses pour les ions moléculaires. Les masses respectives des ions moléculaires sont alors 272, 302 et 332. On retrouve le spectre de masse du diglyacylstilbène pour le pic n° 12, le temps de rétention identique à celui du composé pur analysé dans les mêmes conditions. Les deux autres spectres de masses (figures C et D) sont alors facilement attribuables aux structures 13 et 14 (fig. 73). Ils correspondent aux pics n° 13 et 14 du chromatogramme.

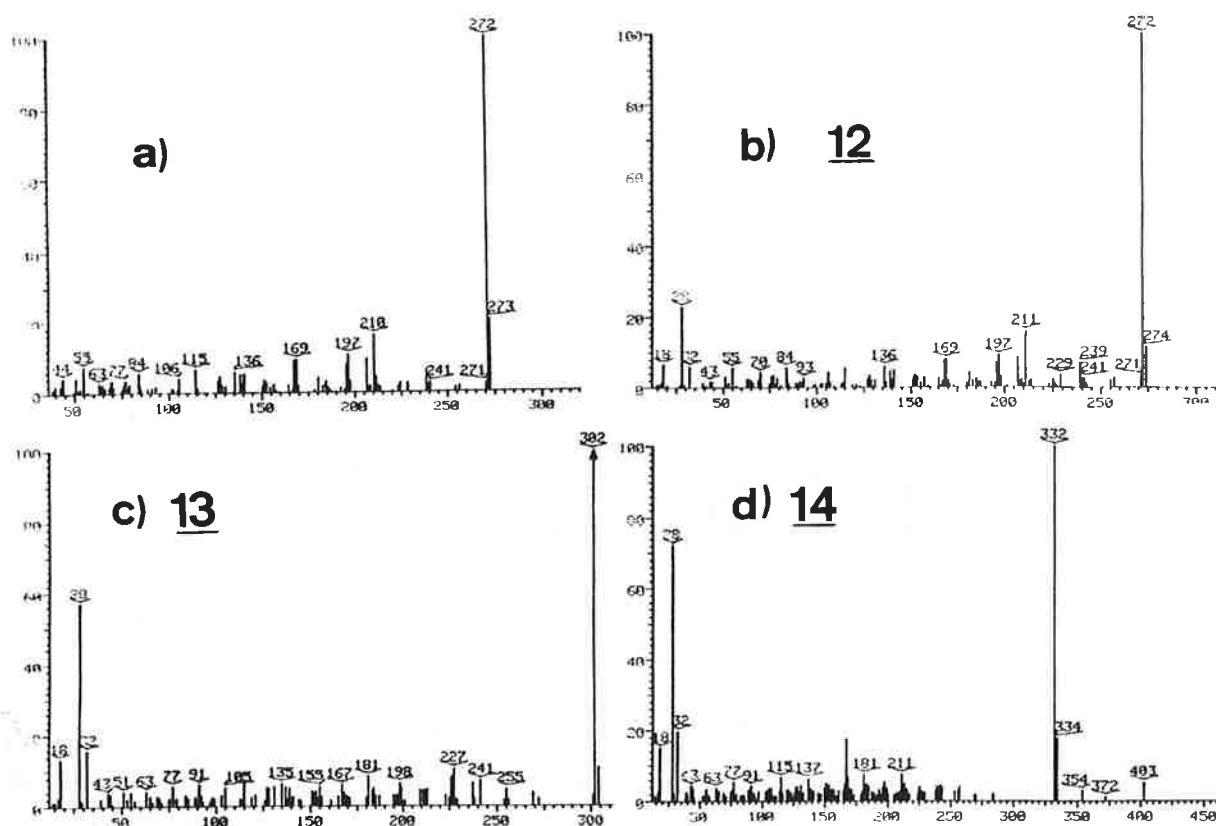
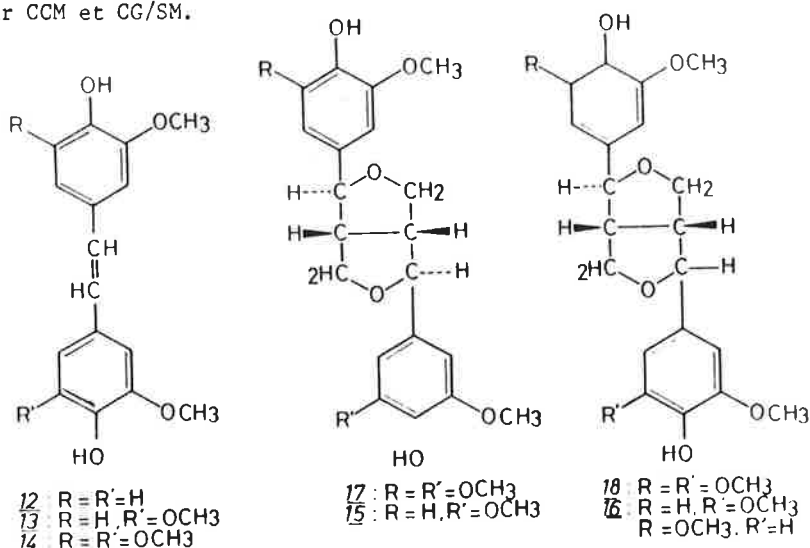


Figure 72 : Spectre de masse (b,c,d) des constituants de la fraction de dimères non dérivatisés séparés par chromatographie gazeuse (pics n° 12, 13 et 14 de la figure 71), le spectre a correspond au spectre de masse du digalacylstilbène pur enregistré dans les mêmes conditions.

Identification du syringarésinol et de l'épisyngarésinol

En chromatographie sur couche mince de silice nous repérons d'une part le syringarésinol (tableau 26) en utilisant le composé pur comme référence et d'autre part l'épisyngarésinol en utilisant comme référence le milieu réactionnel du syringarésinol mis à reflux dans le mélange dioxanne-eau (9 : 1) en présence d'acide chlorhydrique. On obtient alors l'épimérisation d'une partie du syringarésinol 17 en épisyngarésinol 18 (158).

Figure 73 : Dimères caractérisés par CCM et CG/SM.



La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de la fraction de dimères donne un seul signal élargi (fig. 71) correspondant à l'un ion moléculaire de masse 418 (fig. 73), les conditions expérimentales ne permettent donc pas de séparer totalement les deux isomères configurationnels. On confirme ceci en analysant dans les mêmes conditions le syringarésinol pur et le mélange réactionnel obtenu par acidolyse, leur temps de rétention et leur spectre de masse sont alors tout à fait superposables à ceux correspondant au pic n° 17 ou 18 de la figure 71.

Cette même technique nous a permis d'identifier une molécule dont le temps de rétention se situe entre celui du pinorésinol et celui du syringarésinol 17 analysés dans les mêmes conditions, elle donne le pic correspondant à l'ion moléculaire 388 (fig. 73). L'analyse de la fraction de dimères acétylée montre comme nous le verrons plus loin que cette molécule possède deux hydroxyles. Nous attribuons cette molécule à la structure 15 ou 16 ayant un des noyaux aromatiques de type gaïacyle et l'autre de type syringyle. Nous n'avons pas déterminé sa configuration absolue.

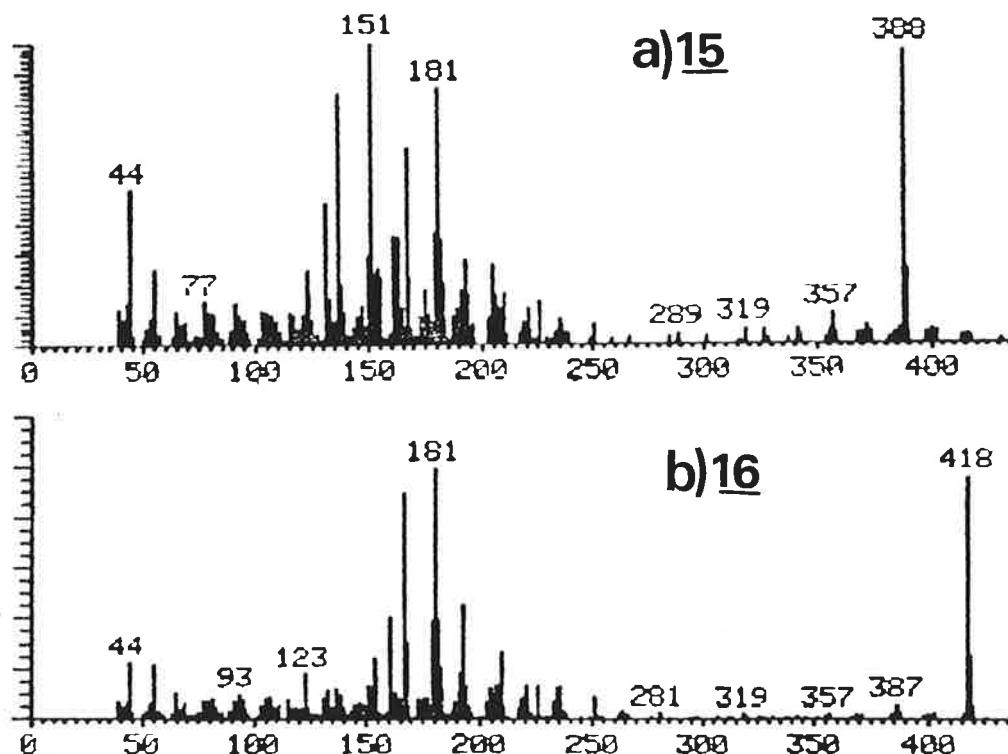


Figure 74 : Spectres de masse (a,b) correspondant aux pics n° 15 et 16 du chromatogramme (fig. 71) de la fraction de dimères non dérivatisés séparés en chromatographie gazeuse.

Une telle structure a déjà été décrite parmi les produits d'hydrolyse de la lignine de Fraxinus mandshurica et le spectre de masse publié dans la référence 161 coïncide tout à fait avec celui que nous donnons.

Les fractions de dimères acétylées ont été également analysées en chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, ces analyses confirment tout à fait les attributions précédentes. Cette dérivatisation est tout à fait intéressante car en plus de la masse M de l'ion moléculaire de la molécule acétylée, elle donne des pics correspondant aux fragments $M - 42 \times n$ ($\text{CH}_3 \text{C}=\text{O}$) qui indique alors le nombre n d'hydroxyles acétylés. On a pu vérifier aussi que les dimères identifiés possédaient tous deux hydroxyles libres.

Les analyses que nous avons effectuées n'ont pas révélé la présence de pinorésinol, et quelques dimères n'ont pas pu être identifiés.

c. séparation quantitative du syringarésinol et de l'épisyringarésinol

- séparation quantitative

D'après les chromatographies sur couche mince, le syringarésinol et l'épisyringarésinol constituent une part importante de la fraction de dimères. C'est pourquoi, nous avons cherché à isoler ces molécules du reste des dimères en les chromatographiant dans une colonne ouverte sur gel de silice en éluant avec le mélange toluène-acétate d'éthyle (3 : 2). Les éluats de 10 ml sont collectés, ceux contenant le syringarésinol ou l'épisyringarésinol sont regroupés. Ces deux molécules constituent alors 12 % de la fraction de dimères.

d. Essai de purification de l'épisyringarésinol

Aucun des éluats isolés précédemment ne contient l'épisyringarésinol seul, en effet comme le montre le spectre proton (fig. 75a) le produit n'est pas pur. On repère néanmoins deux doublets à 3,6 et 4,8 ppm attribués dans la littérature aux protons portés par les carbones C- α et C- α' .

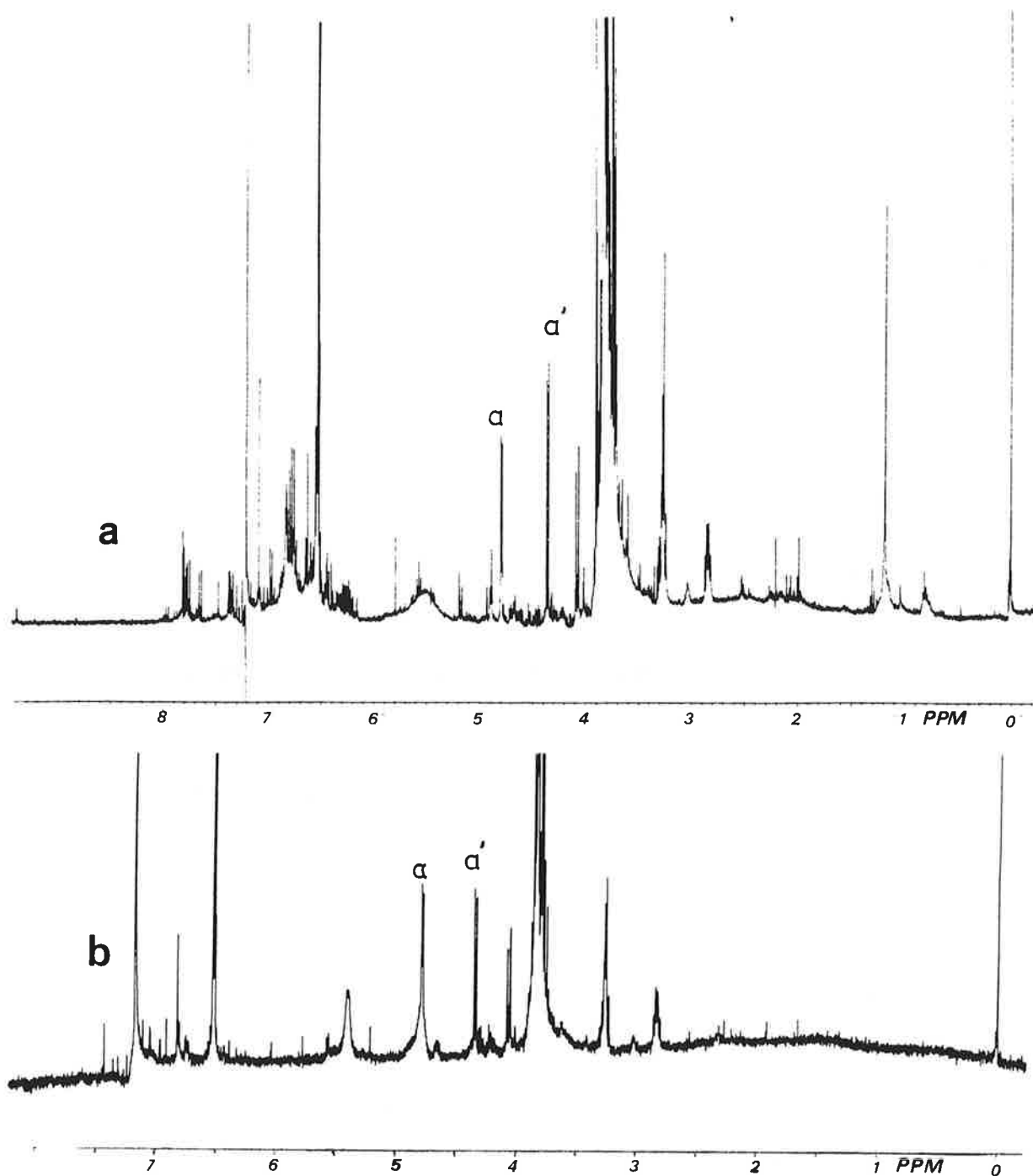


Figure 75 : Spectre RMN ^1H de l'épisingarésinol avant (a) et après (b) purification par CLHP.

Nous avons purifié ce produit en chromatographie liquide haute pression. Après plusieurs essais, le système de chromatographie sur gel C_{18} avec pour éluant le mélange méthanol-eau (50 : 50) s'est révélé le plus efficace. Le chromatogramme de la figure 76 présente plusieurs pics en récupérant le produit correspondant au pic indexé "épi" on obtient alors le spectre de l'épisingarésinol purifié (fig. 75b).

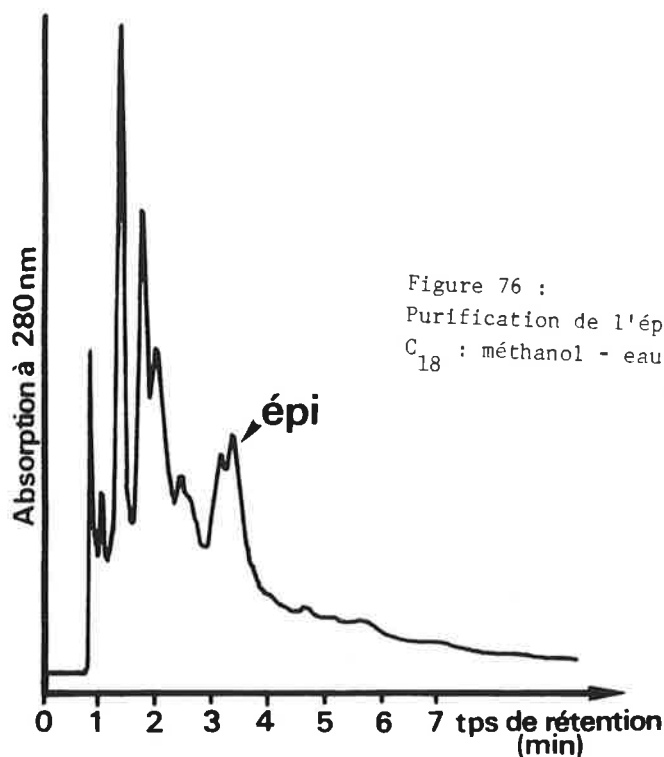


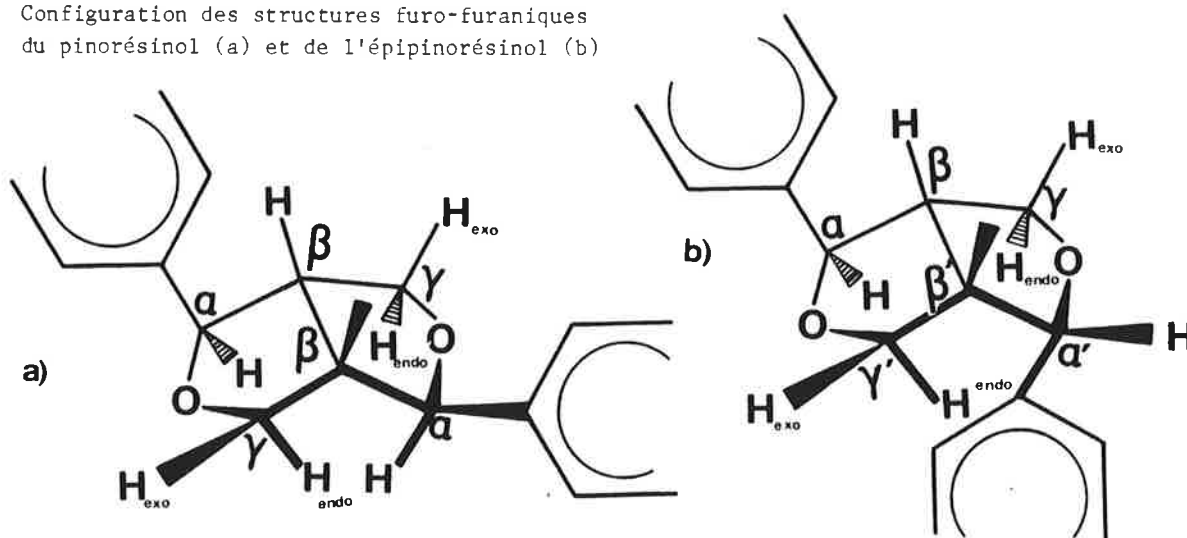
Figure 76 :
Purification de l'épisyringarésinol par CLHP
C₁₈ : méthanol - eau (50 : 50)

III.424 Etude en RMN¹H et ¹³C de l'épisyringarésinol

Les spectres en RMN du proton et du carbone treize du syringarésinol et des molécules analogues (pinorésinol, p-coumarylrésinol) ont été enregistrés et analysés depuis longtemps (91, 160, 161, 162).

En revanche pour l'analyse des spectres RMN du proton et par conséquence ceux du carbone treize de l'épisyringarésinol et de ces analogues nous avons rencontré un certain nombre de contradictions dans la littérature. En effet, l'attribution du spectre proton de l'épipinorésinol proposée par Ludwig (91) et reprise par Nakatsubo (161) est démentie par Petler et coll. (163), sans que ces auteurs ne publient de spectres. C'est pourquoi, nous avons vérifié les attributions concernant les signaux protons de ces structures.

Figure 77 :
Configuration des structures furo-furaniques
du pinorésinol (a) et de l'épipinorésinol (b)



Comme le montre la figure 77 les deux séries de molécules diffèrent par l'inversion de configuration sur l'un des carbones C- α portant le proton et le cycle aromatique. Le bicyclo-furofurannique de ces molécules perd alors sa symétrie axiale C_{2V} .

Nous avons ainsi analysé le pinorésinol et l'épipinorésinol préparés et acétylés par G. Gellerstedt.

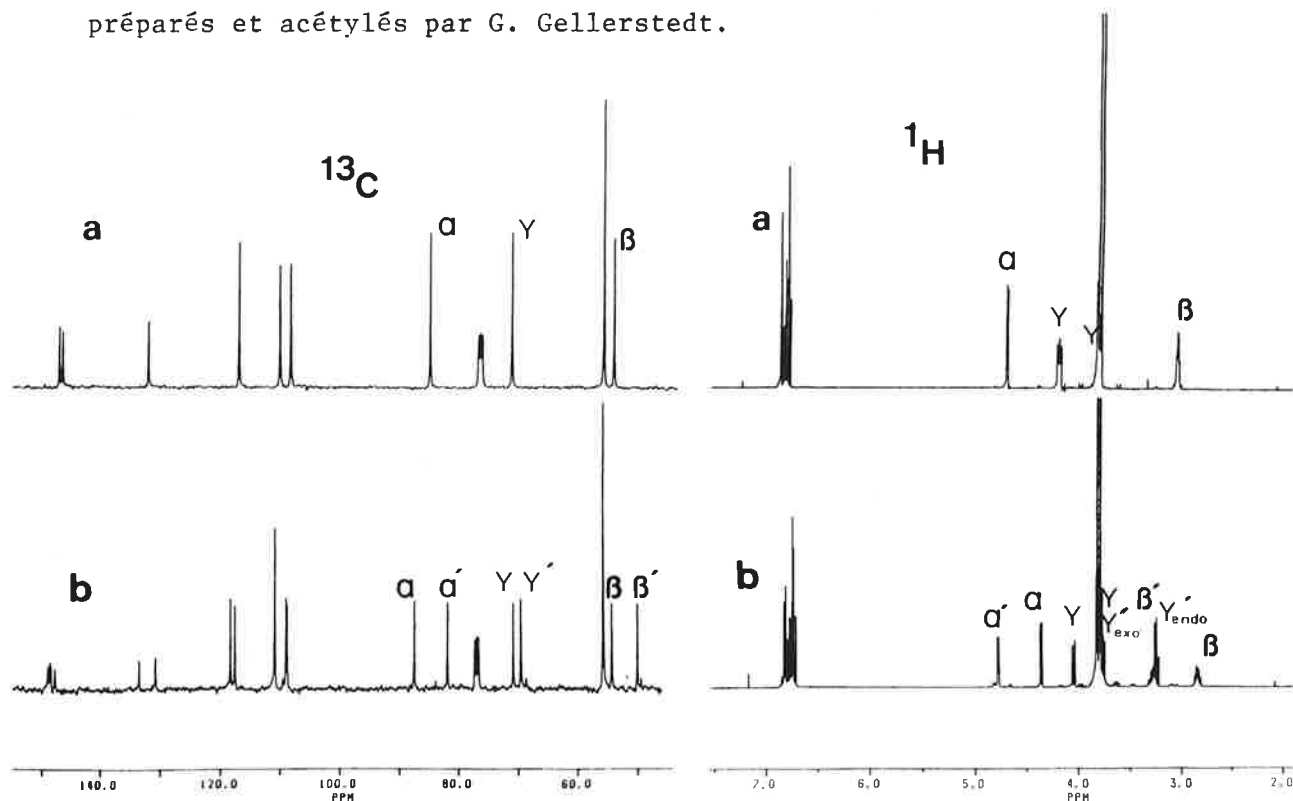


Figure 78 : Spectre ^1H et ^{13}C des dérivés acétylés de pinorésinol (a) et de l'épipinorésinol (b).

Du fait de la perte de symétrie, les carbones et les protons du bicyclo-furofurannique de la molécule épimère deviennent chimiquement inéquivalents et donnent en RMN du proton et du carbone treize des signaux distincts comme le montre la figure 78. Nous avons effectué sur la molécule d'épipinorésinol l'expérience de RMN de corrélation proton-proton et l'expérience corrélation carbone-proton par les couplages scalaires.

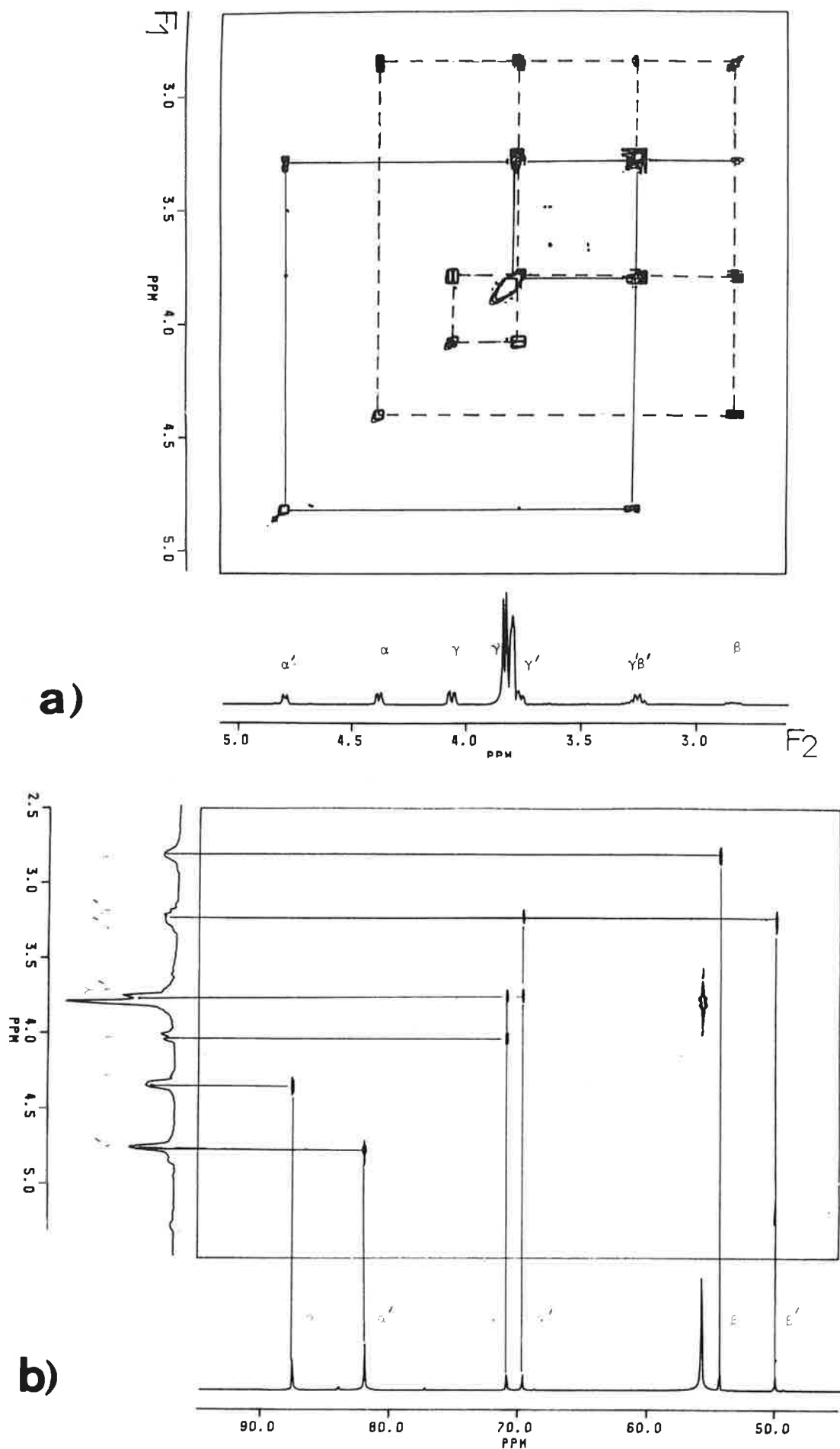


Figure 79 : a) spectre de corrélation $^1\text{H} - ^1\text{H}$ par les déplacements chimiques (COSY) ; b) spectre de corrélation $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ par les déplacements chimiques.

Le spectre bidimensionnel de corrélation COSY proton-proton par les couplages scalaires permet de repérer les signaux des protons du composé bicyclo-furofurannique qui sont couplés (fig. 79a). De proche en proche, on repère les voisins de chaque proton. Les deux enchaînements de protons correspondant aux deux chaînes propanes peuvent être ainsi repérés.

On peut noter sur la diagonale la forme en triangle de la corrélation à 3,25 ppm ce qui indique un couplage entre deux protons absorbant pratiquement à la même fréquence, d'où un système à deux spins du type AB fortement dégénéré. Sur le modèle moléculaire le proton porté par le carbone C- β' de la chaîne propane affectée par l'épimérisation se trouve de fait, à proximité du cycle aromatique et subit un déblindage important. C'est pourquoi on peut attribuer le signal au proton en position endo porté par le carbone C- β' . On attribue alors complètement les différents signaux par rapport à la configuration de la molécule.

Un des protons liés au carbone C- γ ne donne aucune corrélation avec le proton lié au carbone C- β . La constante de couplage entre ces deux protons est donc nulle ou très faible, cela indique un angle dièdre $\text{C}_{\gamma}\text{HC}_{\beta}\text{H}$ proche de 90° . Seul demeure le couplage, avec l'autre proton porté par ce même carbone C- γ expliquant l'allure en doublet élargi du signal à 4,1 ppm.

Le spectre bidimensionnel de corrélation carbone-proton par les couplages scalaires permet de corréler les carbones aux protons auxquels ils sont liés. (fig. 79b). L'attribution des signaux des protons étant effectuée, on attribue alors sans problème les signaux du spectre RMN ^{13}C aux carbones formant chacune des chaînes propanes. Les carbones de la chaîne propane affectée par l'épimérisation se trouve déplacés à champ plus fort que les carbones de l'autre chaîne.

On peut finalement confirmer l'attribution des signaux en RMN ^1H et ^{13}C de la structure bicyclo-furfuranique de l'épipinorésinol (fig. 77).

Tab. 28 : Attributions des signaux de RMN ^{13}C des différentes lignines étudiées (lignines naturelles MWL, déhydrogénopolymère de l'alcool coniférylique DHP, et lignines extraites de bois traités par autohydrolyse rapide).

SIGNAL:	ATTRIBUTIONS	OBSERVATIONS
N°	S(ppm/TMS:	
1	210 - 200: Région des C=O cétoniques	Signaux distribués en massif large présents uniquement dans les lignines de bois sévèrement traités
2	194: $\begin{array}{c} \text{C-H} \\ \\ \text{O} \end{array}$ des structures cinnamaldéhydes	Attribution confirmée par le signal à 152,6 ppm du carbone C- et par le signal à 126,3 du carbone C-
3	191,6-190: $\begin{array}{c} \text{C-H} \\ \\ \text{O} \end{array}$ des aldéhydes aromatiques	Confirmé* par la présence d'un signal en RMN ^1H à 9,65
4	187,3: $\begin{array}{c} \text{C-H} \\ \\ \text{O} \end{array}$ des $\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{C-OAr} \\ \\ \text{CH}_2\text{-OH} \end{array}$ structures	Confirmé par la présence d'un signal en RMN ^1H à 9,44 (synthèse du composé modèle correspon- dant)
5	180 - 170: attribués aux carbo- nyles des acides ou esthers alphasatiques et aromatiques	
6	168,4: carbonyles des acéty- les phénoliques ou des acétyles des xylannes	Attribution confirmée par la présence du signal dû à un carbone CH_3 absor- bant à 20 ppm. L'absence de signal entre 100 et 90 ppm infirme la présence des xylannes
7	167,3: C-1 (carboxyle) de l'acide parahydroxy- benzoïque	Les structures pOH sont confirmées par les signaux 21 et 26 à 131,6 et
8	165,1: C- α (carboxyle) du parahydroxybenzoïque	115,2 ppm dus aux carbones C-2 C-6 et C-3 C-5 (expérience DEPT)
9	162: C-4 des unités para- droxybenzoïques et parahydroxybenzoates	
10	152,6: carbone C- α vinylique des structures cinnamaldéhydes	Uniquement visibles sur les spectres CH enregistrés avec l'expérience DEPT
11	152,1: C-3 et C-5 d'unités syringyles dans les structures β -0-4 éthérifiées	
12	149,7: C-3 d'unités gailacy- les dans les structu- res β -0-4 éthérifiées:	2 D INADEQUATE

SIGNAL:		ATTRIBUTIONS	OBSERVATIONS
N°	S (ppm/TMS)		
13	147,4	C-4 d'unités galacy- les dans les structu- res B-0-4 éthérifiées	
14	147,1	C-3 C-5 d'unités syringyles non éthérifiées	
15	146,9	C-3 d'unités galacy- les non éthérifiées	L'expérience 2D INADEQUATE a permis de confirmer sans ambiguïtés les attributions des signaux 11 à 30
16	145,3	C-4 d'unités galacy- les non éthérifiées	
17a	138	C-1 d'unités syringy- les dans les structu- res β -0-4 éthérifiées	
17b	137,7	C-1 d'unités syringy- les dans les structu- res β - β	
18	137,3	C-1 d'unités galacy- les dans les structu- res β -0-4 éthérifiées	
		C-4 d'unités syringy- les dans les structu- res β -0-4 éthérifiées ou non	
19	133	C-1 d'unités galacy- les dans les structu- res β -0-4 non éthéri- fiées	
20	132	C-1 d'unités syringy- les dans les structu- res β -0-4 non éthéri- fiées	
21	131	C-2 et C-6 des unités parahydroxybenzoïques	Bien visible sur les spectres CH enregistrés par l'expérience "DEPT"
22	132 - 125	signaux formant un massif large que nous attribuons aux carbo- nes quaternaires dans les structures G-G, G-CH ₂	Mis en évidence sur les spectres enregistrés par l'expérience "QUAT"

: SIGNAL:		ATTRIBUTIONS	OBSERVATIONS
: N°		: S(ppm/TMS):	
: 23		: 129,3-	: signaux des structu-
:		: 128,3	: res cinnamiques de
:		:	: l'alcool coniféryli-
:		:	: que
: 24		: 130-128	: structures stilbènes
: 25		: 126,3	: C-β dans les structu-
:		:	: res cinnamaldéhydes
: 26		: 121,5	: C-1 des unités para-
:		:	: parahydroxybenzoïques
:		:	: ou parahydroxybenzo-
:		:	: ates.
: 27		: 119,5	: C-6 des unités gaïa-
:		:	: cyles dans les struc-
:		:	: tures β-0-4 et autres
: 28		: 115,1	: C-5 des unités gaïa-
:		:	: cyles dans les struc-
:		:	: tures β-0-4 et autres
:		:	: C-3 et C-5 des unités
:		:	: parahydroxybenzoïques
:		:	: ou parahydroxybenzo-
:		:	: ates
: 29		: 111,7	: C-2 des unités gaïa-
:		:	: cyles dans les struc-
:		:	: tures β-0-4
: 29b		: 110,9	: C-2 des unités gaï-
:		:	: cyles dans les struc-
:		:	: tures du type digai-
:		:	: cyl stilbène
: 30		: 107-106,8	: C-2 et C-6 des unités
:		:	: syringyles avec en
:		:	: position C=O ou
:		:	: C=C
: 31		: 106,8-	: C-2 et C-6 des unités
:		: 104,5	: syringyles dans les
:		:	: structures β-0-4 et
:		:	: autres
: 32		: 103,6	: C-2 et C-6 des unités
:		:	: syringyles dans les
:		:	: structures β-β

: Peut être également attribués aux
: unités gaïacyles substituées en
: position 5 par OAr (cf. l'étude
: quantitative du DHP)

SIGNAL:	ATTRIBUTIONS	OBSERVATIONS
N°	S (ppm/TMS:	
44b	71,8	C- α des structures alkyl-gaïacyl éther β -0-4 (forme thréo)
45	71,3	C- γ des structures β - β
46	63,3	C- γ dans les struc- tures β -5 ou dans les structures β -0-4 avec en α un C = O Carbone d'alcool laire benzylique
47	61,7	C- γ de l'alcool coniférylique
48	60,5	C- γ des structures alkyl-gaïacyl éther β -0-4 (forme thréo et érythro) et des structures alkyl- syringyl éther β -0-4 (forme thréo)
49	59,6	C- γ des structures alkyl-syringyl éther β -0-4 forme érythro
50	56	méthoxyle
51	53,8	C- β des structures β - β
52	53,4	C- β des structures β -5
53		C'- β dans les struc- tures épisyningoresi- nol et épipinoresinol

SIGNAL:	ATTRIBUTIONS	OBSERVATIONS
N°	S(ppm/TMS:	
33	101 à 92,8	Absorption des C-1 des unités xyloses dans différentes formes
34	88	C-β des structures alkyl-syringyl éther β-0-4 (forme thréo)
35	87,9	C-α dans les structures phénylcoumaranes
36	86,8	C-β des structures alkyl-syringyl éther β-0-4 (forme erythro)
37	85,3	C-α d'unités gaïacyles ou syringyles incluses dans les structures β-β
38	85	C-β des structures alkyl-gaïacyl éther β-0-4 (forme thréo)
39	84	C-β des structures alkyl-gaïacyl éthers β-0-4 (forme érythro)
40	84-80	C-α et C-β dans les structures β-0-4, α-0-4 et C-β dans les structures β-0-4 avec en position α un 
41	75 à 74	Région non attribuée
42	73	C-α des structures alkyl-syringyl éther β-0-4 (forme érythro)
43	72,2	C-α des structures alkyl-gaïacyl éther (forme érythro)
44a	71,8	C-α des structures alkyl syringyl éther β-0-4 (forme thréo)

: SIGNAL :		ATTRIBUTIONS	:	OBSERVATIONS
:	:	:	:	:
:	N°	S (ppm/TMS :	:	:
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:
:	:	40-20	:	Les signaux fins sont attribués aux
:	:	:	:	attribués aux carbones extractibles présents dans les
:	:	:	:	aliphatiques saturés extraits.
:	:	:	:	CH ₂ et CH ₃ - Ceux-ci :
:	:	:	:	se superposent à un :
:	:	:	:	massif large N° 54 :
:	:	:	:	attribué à des :
:	:	:	:	CH ₂ dans les :
:	:	:	:	structures du type :
:	:	:	:	Ar-CH ₂ -Ar.
:	:	:	:	:
:	55	20	:	CH ₃ des groupements :
:	:	:	:	acétyles :
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:

III.5. DISCUSSION

III.51. Généralités

L'autohydrolyse rapide du bois de *Populus trémuloïde* permet donc de solubiliser dans les solvants classiques de la lignine jusqu'à 30 % du matériau traité. Ce taux est largement supérieur au taux de lignine généralement donné (24 %) pour le bois de peuplier.

Nous avons montré que les extraits sont contaminés :

- par l'ensemble des extractibles, notamment les acides gras,
- par des hydrates de carbone, plus ou moins abondants selon que les extractions au dioxane-eau ou à l'acétone sont précédées ou non d'extractions à l'eau,
- par les produits de dégradation des oses comme le démontre la présence de l'hydroxyméthylfurfural.

Le terme de lignine donné à ces extraits est donc quelque peu abusif.

Nous avons montré que ces contaminants sont facilement repérables par les méthodes spectroscopiques et analytiques utilisées. Il est fondamental que leur présence éventuelle soit sans cesse considérée afin d'éviter des erreurs dans l'interprétation structurale des spectres enregistrés.

L'extraction à l'eau des bois traités et la précipitation dans l'eau des extraits totaux sont des étapes essentielles pour se débarrasser des hydrates de carbone solubles dans l'eau. Ensuite par précipitation dans l'éther éthylique, on sépare les extraits en deux fractions de masses moléculaires différentes :

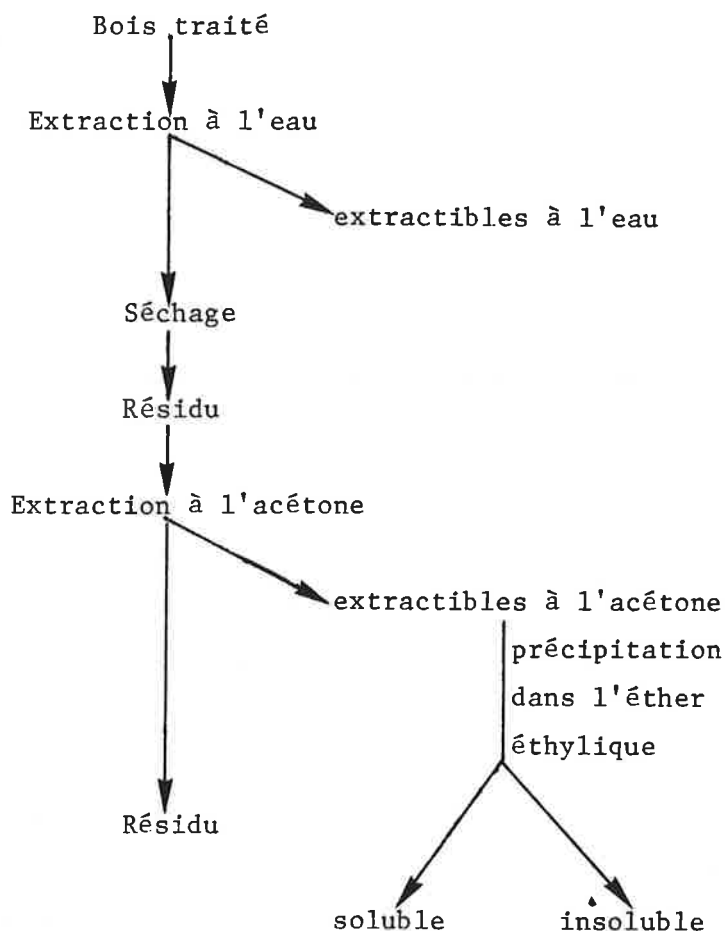
- la fraction SE, soluble dans l'éther éthylique, qui contient les produits phénoliques de faible masse moléculaire et les extractibles,
- la fraction IE, insoluble dans l'éther éthylique, qui contient les produits de masse moléculaire élevée.

Les fractions IE sont caractéristiques d'enchaînements polyphénoliques dans lesquels les extractibles ont totalement disparu et les hydrates de carbone sont tout à fait minoritaires (<1 %).

En revanche, dans la fraction SE on retrouve ces différents constituants et leurs produits de dégradation.

On peut ainsi proposer un schéma général pour extraire rapidement (extraction au Soxhlet) et en quantité importante des lignines.

Figure 80 :



L'extraction à l'acétone est moins exhaustive qu'une extraction directe avec le mélange dioxanne-eau. Ce dernier permet d'extraire des lignines de masse moléculaire plus élevée mais aussi des hydrates de carbone comme nous l'avons montré (§ III.142) en extrayant par ce mélange du bois traité et extrait par l'acétone. La lignine R ainsi extraite puis purifiée selon K. Lundquist a des caractéristiques en spectroscopie infrarouge (§ III.142) et en chromatographie sur gel perméable (§ III.141a) très proches de la lignine MWL, alors que les extraits totaux en diffèrent nettement.

Les hydrates de carbone sont connus pour former des composés aromatiques en milieu acide lorsque les conditions thermiques sont suffisamment élevées (fig. 81). De tels produits contribueraient également à l'excès pondéral observé. Nous n'avons pas pu isoler des molécules de ce type ni repérer éventuellement leurs signaux sur les spectres RMN, néanmoins, deux arguments en faveur de leur formation peuvent être avancés :

- nos bilans pondéraux (§ III.12), ceux établis par D. Barnet (28) et M. Vignon, indiquent une diminution sensible des hémicelluloses et de leurs monomères constitutifs lorsque les conditions de traitement dépassent une certaine sévérité, or dans le même temps d'après M.Vignon, les produits volatils restent toujours en quantité très faible.

- les résultats de la microanalyse (169) ainsi que ceux établis par RMN (III.311) mettent en évidence une légère décroissance (20 % par rapport à la lignine MWL) des taux de méthoxyle. Et cela même dans le cas des fractions insolubles dans l'éther éthylique, qui se sont révélées exemptes de tout contaminant libre (oses, acides gras, HMF...). Un calcul simple montre qu'une chute de 20 % de la teneur en méthoxyle par rapport à la lignine MWL traduit une incorporation d'environ 17 % de contaminants, dans l'échantillon considéré.

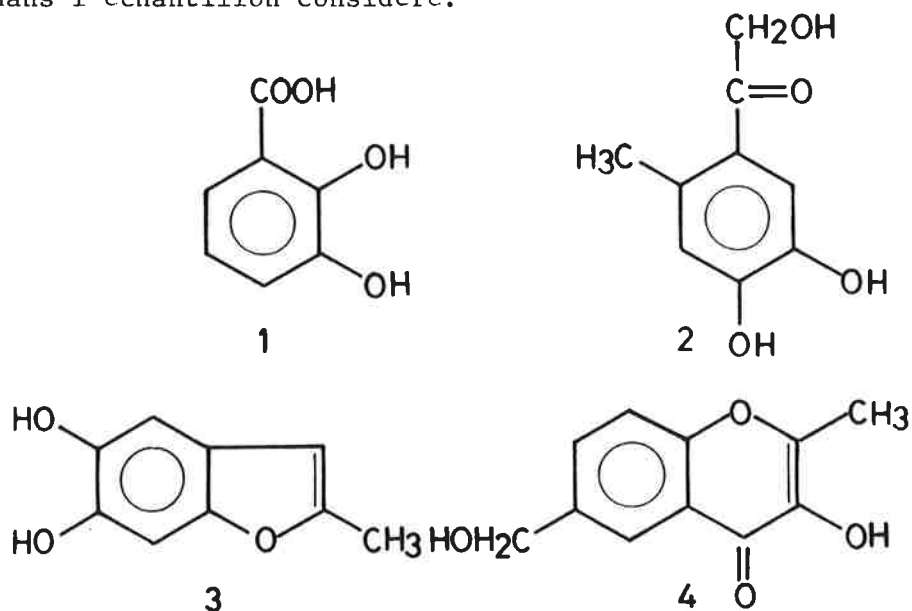


Figure 81 : Exemple de molécules aromatiques formés au cours de traitement thermique des polysaccharides.

III.52. Modélisation des comportements des constituants pariétaux durant l'autohydrolyse rapide

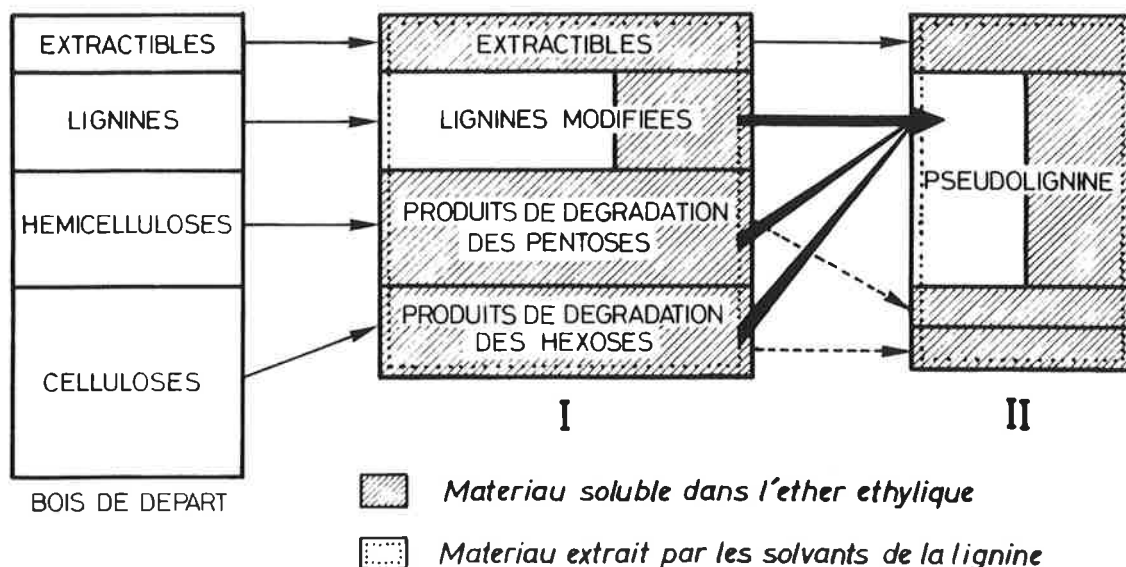


Figure 82 : Modélisation du devenir des constituants pariétaux du bois traité par autohydrolyse rapide.

Les conclusions précédentes permettent de modéliser le comportement des constituants pariétaux au cours du traitement par autohydrolyse rapide (fig. 82). Dans la partie I du schéma les constituants pariétaux sont plus ou moins dégradés selon la sévérité du traitement mais ne participent pas à la constitution d'un nouveau matériau composite par la formation de liaisons avec la lignine modifiée.

En revanche, dans la partie II ces produits réagissent sur la lignine et sont alors extraits avec les mêmes solvants que la lignine, leur nature aromatique les rend alors indiscernables en RMN de la lignine stricto-sensu

La partie I du schéma rend compte, comme nous l'avons montré, de l'existence d'une fraction IE (insoluble dans l'éther éthylique) de lignine plus ou moins modifiée selon les conditions de traitement, tandis que dans la fraction SE (soluble dans l'éther éthylique) s'accumulent en plus de la lignine modifiée les autres contaminants repérés.

Les bilans pondéraux, la légère décroissance des taux de méthoxy-les, permettent de justifier la partie II du schéma, c'est-à-dire une incorporation d'au plus 20 % dans la fraction IE de molécules non discernables de la lignine, constituant alors une pseudolignine.

III.53 Propositions de mécanismes chimiques pour l'interprétation des modifications structurales

III.531 Dépolymérisation des lignines

L'étude structurale a montré que l'extractibilité des lignines s'accompagnait d'une diminution du nombre de structures β -O-4 et d'une augmentation du nombre d'hydroxyles phénoliques libres. Ces trois grandeurs étant linéairement corrélées, on a démontré ainsi que l'extractibilité de la lignine est due à une rupture des liaisons β -O-4 qui entraîne une augmentation du taux d'hydroxyles phénoliques. Par ailleurs, le pH des eaux d'extraction inférieur à 4 (tab. 12) révèle des conditions acides dues entre autre à la libération des acides parahydroxybenzoïque et acétique, ce dernier formé par déacétylation des xylanes (28,29).

D'après les monomères et dimères identifiés au chapitre III.4 et les conditions de traitement (pH, température,...) nous proposons trois voies (fig. 83) réactionnelles conduisant à la rupture des liaisons β -O-4.

La voie a) est d'une manière classique (70) démontrée par la présence des cétones d'Hibbert (fig. 69, 11). Cette voie compte tenu de la faible abondance des molécules de ce type dans nos échantillons serait finalement d'une importance limitée.

La voie b) nous est indiquée de manière indirecte par l'étude des fractions de lignines IE qui révèle l'existence de ponts méthyléniques entre les unités aromatiques. De telles structures peuvent être formées par condensation avec le formaldéhyde libéré selon la voie b), réaction décrite en milieu acide (164). Ces ponts méthyléniques pourraient être également formés par condensation du carbocation benzylique sur les centres nucléophiles du noyau aromatique (48) suivie d'une rupture entre les carbones C- β et C- γ , mais ce mécanisme n'est pas décrit dans la littérature.

C. Lapierre en étudiant les produits de dégradation des lignines de bois traités dans les mêmes conditions par hydrolyse acide (165) a établi la présence de structures énol éther du type 26 en faveur donc du départ de formaldéhyde selon la voie b).

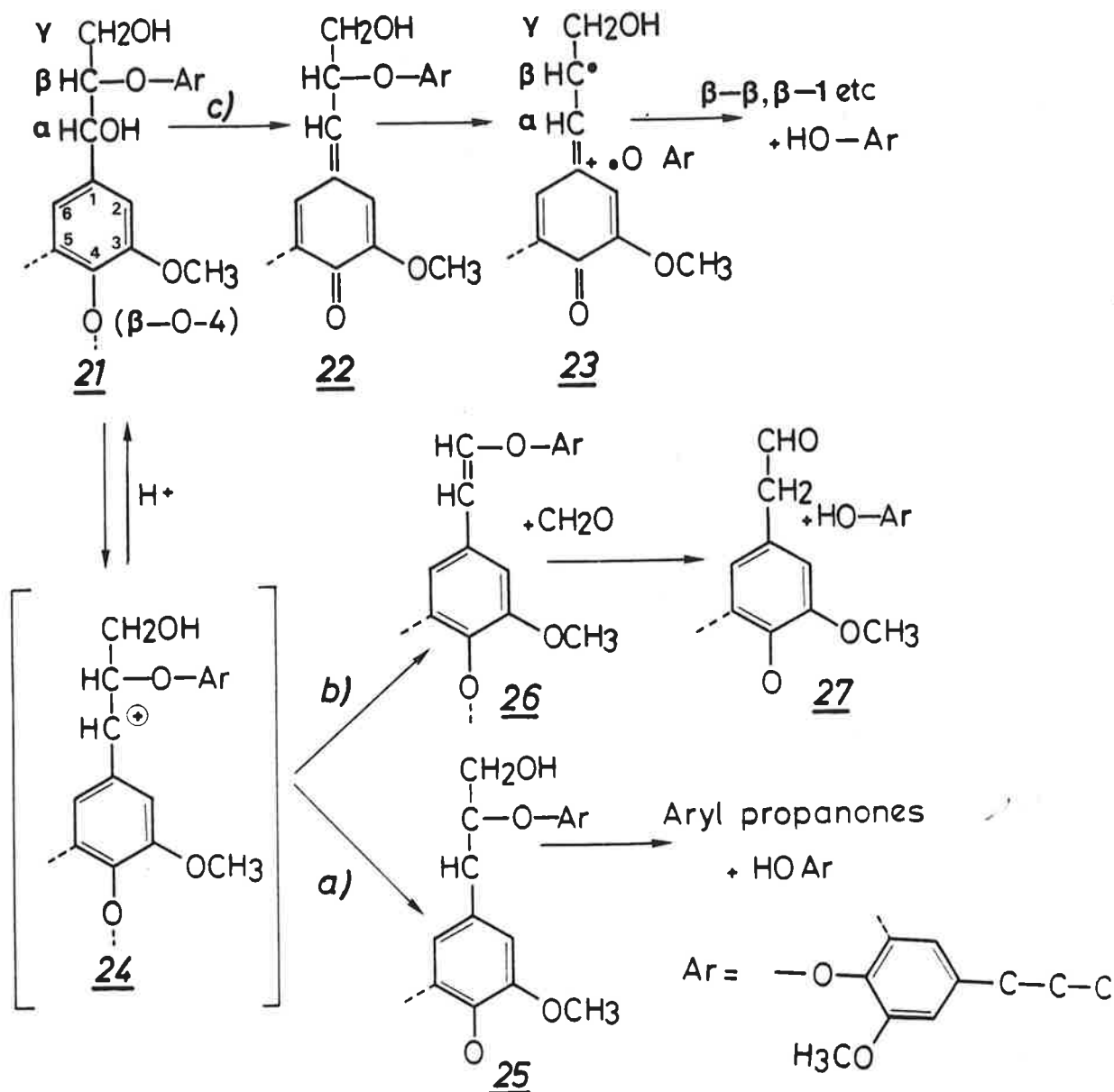
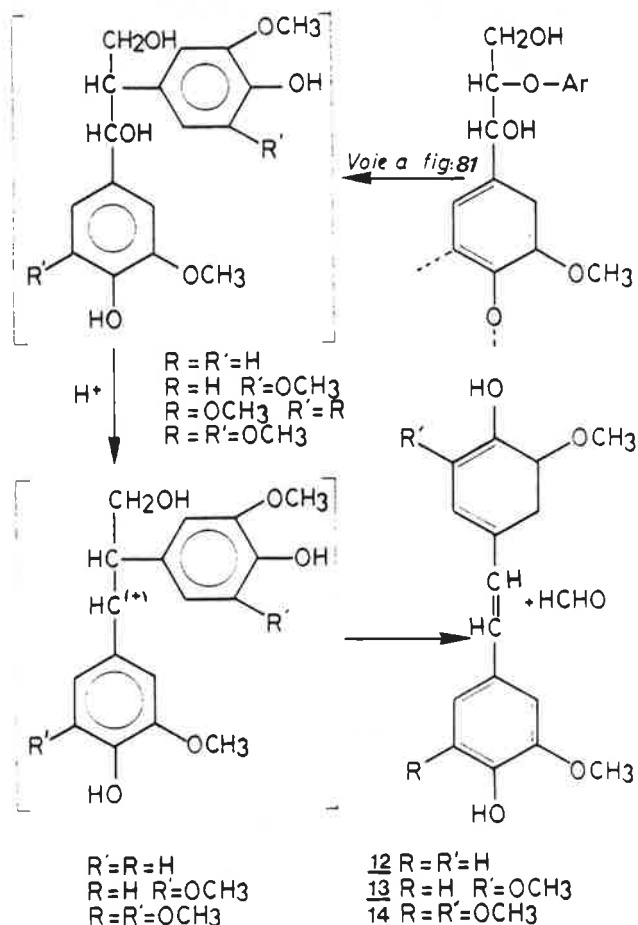


Figure 83 : Mécanismes de dégradation des structures alkyl-aryl éther β -O-4 des lignines au cours du traitement du bois par autohydrolyse rapide.

Dans une étude récente Y. Sano et coll. (166, 167) montrent qu'en chauffant rapidement un composé modèle ayant une structure β -O-4 en solution dans le mélange dioxanne-eau, il se forme des structures β - β et β -1, et proposent le mécanisme réactionnel schématisé par la voie c).

Les dimères identifiés fournissent des arguments en faveur de cette voie. En effet, nous avons identifié différents stilbènes 12, 13, 14 (fig. 73) ; ceux-ci ont été démontrés provenir de la dégradation en milieu acide de structures β -1 (72). On remarquera que la formation de stilbènes conduit également à la libération de formaldéhyde (fig. 84).

Figure 84 : Formation de structure stilbène et libération de formaldéhyde à partir des structures alkyl-aryl β -1.



Les structures β -1, n'ont pu être mises en évidence par RMN du ^{13}C ni pour les lignine MWL, ni pour les lignines de bois traité. On doit donc admettre que si ces structures β -1 sont formées durant les traitements elles sont alors rapidement dégradées en stilbènes. La formation des structures β -1 s'accompagne d'une coupure du maillon propane et de la formation de structures arylglycerol (fig. 85). De manière très intéressante, on repère sur le spectre RMN ^{13}C un signal à 187,8 ppm (signal n°4, fig. 49, 50) et sur le spectre RMN 1H un signal à 9,44 ppm (fig. 45) pour les fractions IE de lignines qui peuvent être attribués respectivement au carbone et proton de la fonction aldéhydique des structures acroléïques formées par déshydratation des structures arylglycérol. La lignine MWL ne présente pas de tels signaux. On confirme ainsi la formation des structures β -1 et β - β par voie radicalaire. La présence de l'épisyngarésinol, identifié parmi les dimères, peut être expliquée par l'épimérisation en milieu acide des syngarésinols existants ou nouvellement formés (fig. 86).

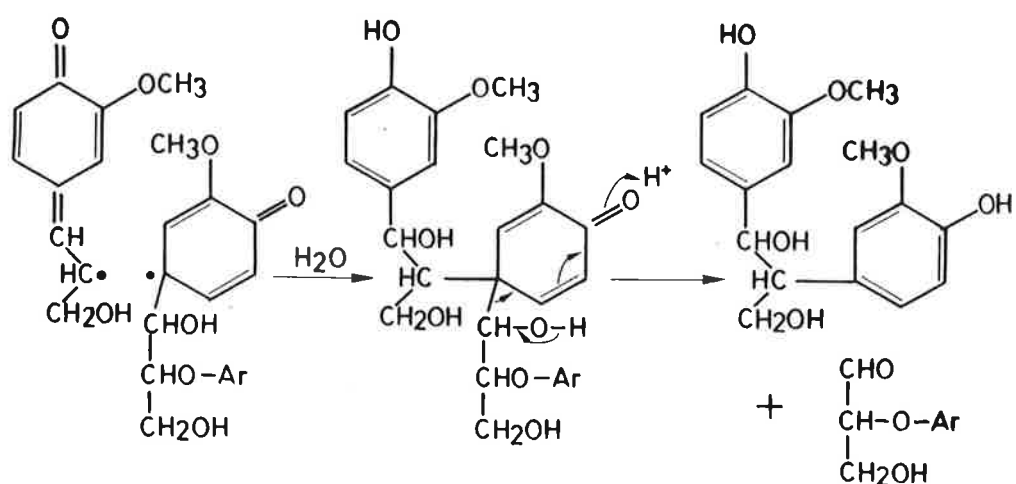


Figure 85 : Mécanisme de formation des structures alkyl-aryl β-1 et aryl-glycérol (168).

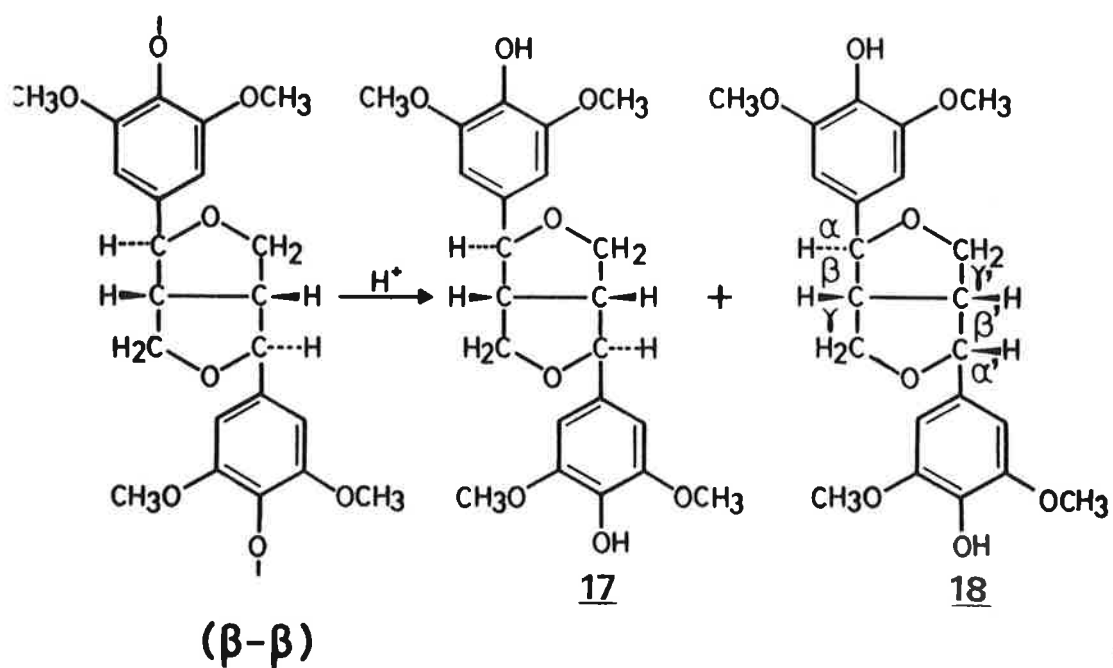


Figure 86 : Epinérisation du syringarésinol en épisyringarésinol en milieu acide (158).

Sur la base de nos analyses, il est difficile de conclure quelle est la voie privilégiée, d'autant que les mécanismes de dépolymérisation ne sont pas les seuls types de réaction à intervenir.

Si l'on considère un modèle moléculaire de lignine MWL, la rupture des différentes liaisons β -0-4 devrait entraîner une formation très importante de monomères ou de composés de faible masse moléculaire. Or, les quantités de monomères et dimères formées (§ III.422) ne reflètent pas du tout, par exemple pour l'échantillon n° 1, la disparition quasi totale des liaisons β -0-4. On peut expliquer cela par la mise en jeu de réactions de recondensation. Ces réactions de recondensation sont justifiées par certains arguments développés au cours de notre étude :

- accroissement de l'hétérogénéité des déplacements chimiques en R.M.N. RMN du ^{13}C des lignines extraites de bois traité (§ III.22),
- mise en évidence sur les spectres RMN ^{13}C de signaux CH_2 attribués à des ponts méthyléniques intermonomériques (§ III.242b),
- analyse des spectres IR qui indiquent des condensations sur les noyaux aromatiques (§ III.26),
- les rendements en monomères lors de l'oxydation au nitrobenzène des extraits totaux (réalisée par l'EEP) décroissent lorsque la sévérité du traitement croît (169).

Enfin, l'exploitation quantitative des spectres RMN ^{13}C nous a permis de doser ces condensations qui atteignent pratiquement la fréquence d'une condensation par unité aromatique dans la fraction IE d'un extrait à l'acétone d'un échantillon de bois sévèrement traité comme le n° 1 (§ III.323a).

III.532 Mécanismes de repolymérisation

Compte tenu des mécanismes discutés précédemment, nous pouvons faire quelques propositions concernant des voies conduisant à la repolymérisation du matériel :

- condensation impliquant la formation d'un carbocation qui réagit sur les centres nucléophiles,
- condensation avec le formaldéhyde,
- réactions radicalaires.

a) Condensation impliquant la formation de carbocation :

Les voies a) et b) (fig. 83) passent par la formation intermédiaire d'un carbocation benzylique. Ce dernier peut réagir sur les centres nucléophiles qui sont représentés dans les bois traités par les noyaux aromatiques de la lignine et certains produits de dégradation des hydrates de carbone (furfural, hydroxyméthylfurfural...). C'est le mécanisme le plus souvent avancé pour expliquer la repolymérisation des produits de dégradation des lignines en milieu acide. Ainsi Wayman et coll. (43) indiquent sur le modèle moléculaire d'une lignine MWL de peuplier les centres électrophiles et les centres nucléophiles qui apparaissent lorsque la lignine est soumise à un traitement de type autohydrolyse, les possibilités de recombinaison sont effectivement très nombreuses.

Les unités parahydroxybenzoates présentent par rapport aux noyaux gâïacyles et syringyles, des sites privilégiés pour ce type de réaction. Or, on constate que ces unités même dans les extraits de bois sévèrement traités représentent des quantités importantes de matériau, environ 5 à 10 %. Le contenu en pOH généralement donné pour la lignine MWL de peuplier est d'environ 10 %. On retrouve également l'acide pOH sous forme libre et il constitue alors l'élément majoritaire des monomères. La présence en abondance de la structure parahydroxybenzoïque rend fort improbable l'hypothèse de condensation des carbocations sur les positions nucléophiles des noyaux aromatiques. Ce point est en désaccord avec Wayman et coll. (43) qui fondaient le succès des traitements du peuplier par autohydrolyse sur le rôle joué par les unités pOH comme des capteurs de carbocations.

b) Condensation avec le formaldéhyde :

Les arguments en faveur d'une libération de formaldéhyde au cours du traitement et de signaux CH_2 en RMN ^{13}C attribués à des ponts méthyléniques intermonomériques démontrent le rôle joué par le formaldéhyde dans les réactions de condensation. Les réactions de condensation du formaldéhyde sur les structures phénoliques en milieu acide sont connues dans la littérature (170).

c) Réactions radicalaires :

Nous avons vu que des mécanismes radicalaires peuvent intervenir dans la rupture des liaisons β -0-4 (voie C, fig. 83) et conduire à la formation des structures β -1, ces dernières étant alors dégradées en stilbènes. De la même manière des structures β - β peuvent être formées.

L'exploitation quantitative (§ III.323a) des spectres RMN ^{13}C des fractions "IE" de masse moléculaire élevée a démontré la présence de structures diphenyle du type aryl-aryl et aryl-aryl éther. De telles structures sont facilement formées par couplage entre les radicaux phényle et phénoxy, nous avons montré l'importance de ces structures dans le polymère artificiel DHP synthétisé "in vitro". Ces données sont donc tout à fait en faveur d'une recondensation radicalaire des produits de dégradation du polymère.

III.54. Valorisation de la biomasse traitée par autohydrolyse rapide et perspectives du projet

Les lignines extraites des bois traités par autohydrolyse rapide sont d'une manipulation facile puisqu'elles sont solubles dans de nombreux solvants.

Le contenu en hydroxyle phénolique élevé et l'importance des fragments de faible masse moléculaire de ces lignines devraient en faire un matériau très réactif et d'un grand intérêt pour la synthèse de copolymère.

En fait, nous avons montré que si le traitement appliqué entraîne une réelle dépolymérisation par rupture des liaisons alkyl-aryl éther β -0-4, le processus n'en reste pas là. En effet, les unités ainsi obtenues subissent des réactions secondaires de condensation qui conduisent à une repolymérisation partielle du matériau. Nous avons montré que ces réactions se faisaient préférentiellement sur les positions libres des noyaux aromatiques. Un tel réarrangement bloque ainsi toute possibilité de réaction par condensation de ces produits avec le formaldéhyde. C'est ainsi que tous nos essais de condensation de ces lignines avec le formaldéhyde n'ont rien donné. Ce point est confirmé par H. Chum (31) qui n'a réussi des condensations avec le formaldéhyde qu'avec les fractions de faible masse moléculaire (solubles dans l'éther éthylique) des lignines préparées avec le même procédé.

C'est donc au niveau de l'hydroxyle phénolique libre que l'on doit rechercher les éventuelles sites réactionnels. La condensation de l'hydroxyle phénolique libre sur l'isocyanate peut conduire à la formation d'un uréthane. En utilisant un méthane bifonctionnel on peut obtenir des mousses polyuréthane. Des essais préliminaires dans ces sens ont été réalisés à l'EFP et les résultats au laboratoire sont concluants (171). L'intérêt industriel de ces matériaux n'a pas été encore démontré.

W. Glasser propose d'augmenter la fonctionnalité des lignines en faisant réagir d'abord de l'oxyde de propylène (172). Les lignines ainsi modifiées sont alors utilisées dans des réactions de copolymérisation (173 à 176).

Tout cet aspect de valorisation de la lignine extraite reste pour l'essentiel à développer.

En ce qui concerne le résidu cellulosique étudié essentiellement par les laboratoires du CTP et du CERMAV (169), les résultats obtenus montrent que dans la plupart des cas les taux de lignines résiduelles des résidus après extraction des lignines par les solvants que nous avons utilisés nécessitent une étape ultérieure de délignification chimique. Dans les cas où les taux de lignines résiduelles des résidus cellulosiques sont suffisamment faible (inférieur à 5 %), les degrés de polymérisation des celluloses obtenus sont alors trop bas pour présenter

un intérêt pour l'industrie papetière. Dans tous les cas une étape de blanchiment est encore nécessaire. Dans une étude récente (131), nous avons soumis les échantillons de bois traités à différentes conditions de sulfonation. Cette méthode s'est avérée très efficace pour séparer la lignine des hydrates de carbones, mais elle n'a pas permis d'abaisser significativement les taux de lignine résiduelle dans les résidus cellulosiques, par rapport aux protocoles que nous avons suivis dans le travail exposé.

Ces limitations montrent que le procédé d'autohydrolyse rapide n'est pas encore mûr pour un développement industriel concurrentiel avec les procédés papetiers conventionnels.

L'étude des points suivants doit être entreprise pour :

- limiter les recondensations des produits de dégradation de la lignine ainsi que celles se faisant éventuellement avec les produits de dégradation des polysaccharides. A cette fin nous proposons un protocole en trois étapes : d'abord un traitement modéré suivi d'une extraction par l'eau qui permettrait d'éliminer les pentosannes puisque ceux-ci sont les constituants pariétaux les plus facilement dégradés sous des conditions d'autohydrolyse. Ensuite, un traitement plus sévère entraînerait la dépolymérisation de la lignine sans risquer alors une contamination par les produits de dégradation des pentosannes.

- rechercher des catalyseurs de la dépolymérisation. On peut penser à des essais avec les catalyseurs utilisés dans les procédés organosolubles, s'ils sont efficaces la sévérité des conditions de traitement pourrait être diminuée et on limiterait ainsi les phénomènes de recondensation.

- développer les recherches sur la valorisation des lignines obtenues. En effet, au terme de l'étude que nous avons conduite les caractéristiques structurales de ces lignines sont mieux cernées et leurs évolutions en fonction de conditions de traitement ont été établies. Cela devrait contribuer à rendre plus efficaces et moins

empiriques les recherches de valorisation des lignines extraites et des bois traités.

Dans ce sens, il faut citer l'exemple de valorisation réalisée par Chanzy et coll. (169).

Ces auteurs ont obtenu la solubilisation complète du bois traité dans l'oxyde de N-méthyl morpholine, la fiabilité de la solution ainsi obtenue leur a permis de réaliser des fils de qualité tout à fait acceptable pour un développement industriel.

Les perspectives qui s'offrent et les études ultérieures qui se sont profilées pour compléter l'étude animée par le Centre Technique du Papier (CTP) justifie tout à fait la construction d'un pilote de laboratoire au CERMAV. Ce dernier beaucoup plus petit que le pilote du CTP rend les expériences plus aisées et plus précises d'autre part la possibilité d'ajouter facilement des réactifs devrait permettre d'effectuer les différents essais proposés.

QUATRIEME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

IV.1 PREPARATION ET EXTRACTION DES CONSTITUANTS PARIETAUX DES BOIS DE PEUPLIER TRAITE PAR AUTOHYDROLYSE RAPIDE

IV.11 Principe du fonctionnement du pilote du Centre Technique du Papier (C.T.P.)

IV.111 Description du pilote

Le pilote du CTP à fait l'objet du dépôt de brevet (15) dans lequel le lecteur trouvera tous les détails technologiques. Le pilote se compose des trois parties suivantes (fig. 87) :

- une chaudière électrique capable de délivrer de la vapeur d'eau à 60 bars de pression,

- le réacteur à proprement parlé en acier inoxydable, d'une capacité de 40 litres environ, celui-ci possède dans sa partie inférieure une vanne dont l'ouverture par un vérin pneumatique permettra une détente instantanée. Une filière est également installée dans cette ouverture,

- un cyclone de détente de $1,5 \text{ m}^3$ permet la récupération du matériel traité.

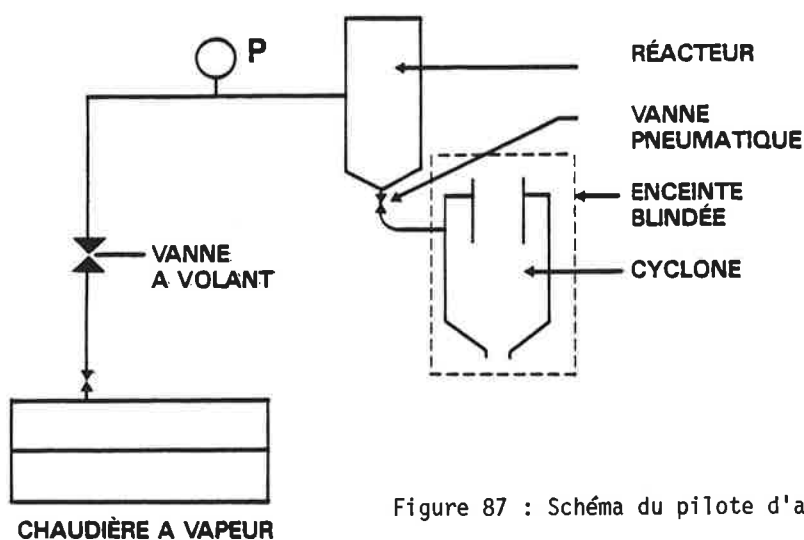


Figure 87 : Schéma du pilote d'autohydrolyse rapide.

IV.112 Description d'une expérience

Une fois la chaudière en pression à 60 bars, on préchauffe le réacteur à vide en montant progressivement à 40 bars à l'intérieur de celui-ci. Après quelques minutes à cette pression, on ouvre la vanne pneumatique pour permettre l'évacuation de l'eau de condensation.

Une manipulation se déroule ensuite selon le schéma suivant :

- ouverture du robinet de purge à la partie supérieure du réacteur,
- ouverture du réacteur,
- chargement des copeaux,
- fermeture du réacteur puis du robinet de purge,
- ouverture de la vanne d'admission de vapeur (la montée en pression doit être la plus rapide possible, d'où l'intérêt d'avoir une pression maximum dans la chaudière),
- lorsque la pression P désirée est atteinte, déclenchement du chronomètre et maintien de la pression de la vapeur P , par réglage de la vanne à volant (la précision est de l'ordre de 1 bar),
- au temps t , déclenchement de la vanne pneumatique,
- après environ 15 secondes, fermeture de la vanne pneumatique, puis remise sous pression (environ 40 bars) du réacteur et nouveau déclenchement de la vanne pneumatique (cette opération permet de vider le cyclone de ce qui ne serait pas sortie à la première détente),
- récupération du bois explosé dans la baille métallique.

IV.113 Choix du matériau ligno-cellulosique

Dans toute l'étude le matériau utilisé est le bois de peuplier, *Populus tremuloïdes*, sous forme de copeaux. Nous pouvons rappeler quelques caractéristiques chimiques de ce bois établies au CTP par Lachenal et collaborateurs (169) :

Extractibles à l'eau	2,2 % du bois sec
Extractibles au dichlorométhane	2,4 % du bois sec
Lignines	21,7 % du bois sec
Pentosanes	15,5 % du bois sec
Holocelluloses	79,6 % du bois sec.

IV.114 Paramètres de traitement retenus pour ces expériences

Dans un premier plan d'expérience, PI, la pression était maintenue constante à 40 bars et la durée du traitement variait de 10 à 165 secondes. Ce plan a permis une première approche des performances du pilote. C'est à partir de ces échantillons que D. Barnet (28) a réalisé son étude sur l'évolution de la composition des échantillons en fonction de la durée du traitement avec une étude plus particulière sur les oligosaccharides acides qui peuvent être séparés. Dans cette thèse, nous donnons quelques résultats établis à partir de ces échantillons.

Par la suite pour couvrir plus largement les conditions de traitement sans augmenter démesurément le nombre d'échantillons à étudier un plan composite centré, PII, a été proposé par le CTP (les pressions varient de 25 à 50 bars, et les durées de 10 à 240 s). A partir des 9 essais réalisés le traitement statistique réalisé par le CTP permet de représenter chacune de ces variables sous la forme d'un polynôme du second degré ayant pour variable la pression de vapeur et durée du traitement. Des relevés de températures au cours du traitement à l'intérieur du réacteur permettent d'établir la courbe de la température du réacteur en fonction de la pression désirée pour l'expérience (169). Celle-ci apparaît linéaire dans la région de 20 à 50 bars.

IV.2 EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES LIGNINES DES BOIS TRAITES (fig. 33 et 63)

IV.21 Extraction des lignines

IV.211 Préparation des lignines A et B extraite au dioxane-eau

Le tableau 29 présente les protocoles de préparation des lignines A et B extraites respectivement des bois traités selon les plans d'expériences PI et PII. Nous avons préparé au laboratoire les lignines B, tandis que les lignines A ont été préparées par M. Froment à l'EFP et fournies aux différents laboratoires.

Le dioxanne utilisé est déperoxydé par chromatographie sur une colonne d'alumine neutre. En ajoutant 1 ml de dioxanne à 10 ml d'une solution à 10 % de KI, qui devient jaune foncé en présence de peroxyde, on vérifie la qualité du solvant (177).

Les mesures directes de l'absorption à 280 nm sont effectuées contre un blanc constitué par le mélange dioxanne-eau (100:1). Lorsque l'absorption optique est inférieure à 0,3, on considère que la quasi totalité de la lignine est extraite, (la concentration en lignine est alors équivalente à 300 mg/litre).

IV.212 Extraction des substances lipophiles des extraits aqueux

Ces extractions ont été réalisées sur les extraits aqueux réalisés lors de la préparation des lignines B. Les extraits aqueux, concentrés à 500 ml, sont extraits au Soxhlet par l'éther éthylique pendant 24 heures (extraction liquide - liquide). La fraction éthérée passée sur sulfate de sodium est évaporée, les extraits secs sont pesés et analysés par chromatographie sur couche mince et par RMN¹³C.

IV.213 Séchage des produits

Tous les produits isolés dans ce travail subissent un séchage final dans un dessiccateur chauffant ($\approx 40^\circ$) en présence de P_2O_5 , sous une pression de 15 mm de Hg.

Tableau 29: Protocole de préparation des lignines A et B extraites des bois traités selon les plans d'expérience PI et PII

	BOIS TRAITES SELON LES PLANS D'EXPERIENCES	
	PI	PII
	Sécheresse des échantillons (42 % - 56 %) (effectué par séchage à 105°)	
Poids humide de 1'échantillon traité	pour 30 g	pour 28 kg
Extraction à l'eau :		
- nombre	5	2
- durée (	3 x 1 heure	
- durée (	1 x 2 heures	2 x 10 minutes
- durée (	1 x 16 heures	
- quantité H ₂ O	250 ml x 5	32 l x 2
- agitation	mécanique	mécanique
- récupération eaux mères	filtration sur buchner	essorage
	Mesures des pH	
	Séchage-poids de matière sèche	
Extraction au mélange dioxanne-eau :		
- composition du mélange	100 : 4	azéotrope
- méthode	à froid sous agitation à l'abri de la lumière	au soxhlet à chaud
	4 extractions de 4 h	350 ml de mélange
	1 extraction de 15 h	pour 10 à 30 g de bois
	Le mélange est récupéré par filtration sur buchner	
	Mesure de densités optiques à 280 nm	
	Séchage-poids de matière sèche	
Récupération des lignines	Evaporation sous vide, température < 60° puis précipitation dans 10 fois son volume d'eau et lyophilisation et centrifugation	

IV.214 Préparation des lignines C et D extraites à l'acétone

L'extraction s'effectue sur des échantillons de bois traités préalablement extraits à l'eau (voie C) ou non (voie D) et parfaitement séchés. On extrait 30 g de matériel au Soxhlet pour environ 1 litre d'acétone. L'extraction dure environ 14 heures.

Une extraction au dioxanne peut être effectuée à la suite des extractions à l'acétone. Les résidus sont alors extraits 2 à 3 fois par le dioxanne-eau (300 ml pour 10 g de bois). Les extraits sont évaporés et séchés (fractions Q ou Q'). Pour récupérer les lignines RR' une étape de purification (§ 223) pour enlever les hydrates de carbone est nécessaire.

IV.22 Fractionnement des extraits de lignine

IV.221 Précipitation dans l'éther éthylique

Les extraits secs sont dissouts dans l'acétone (1 g/ml). Il est parfois nécessaire d'ajouter quelques gouttes d'eau pour solubiliser la lignine.

La précipitation s'effectue dans 250 ml d'éther éthylique par 100 mg de produit de départ. La lignine insoluble (IE) est récupérée par décantation et centrifugation (6000 à 7000 tours/min., pendant 10 minutes). Le résidu est remis deux fois en suspension dans de l'éther éthylique et centrifugé, puis il est séché et pesé. Les fractions étherées sont évaporées pour récupérer les produits solubles.

IV.222 Extraction successive par différents solvants

Les extraits secs sont extraits successivement par l'hexane, le dichlorométhane, l'éther éthylique et le méthanol. L'extraction (200 ml pour 5 g de produit de départ) est répétée deux fois pour chaque solvant, les résidus sont récupérés par centrifugation. Les produits solubilisés sont récupérés en évaporant les solvants, séchés et pesés. Pour l'échantillon E56, elles constituent respectivement 6,6, 30 et 50 % de l'extrait au dioxanne-eau non précipité dans l'eau.

IV.223 Fractionnement par partage de phase

Le protocole mis au point par K. Lundquist et coll. (142) est utilisé d'une manière simplifiée. En effet nous avons effectué une seule extraction au lieu des deux proposées par les deux auteurs. 600 mg du produit à purifier sont dissouts dans 28 ml d'un mélange pyridine-acide acétique-eau (9:1:4). La solution est extraite par 72 ml de chloroforme.

La séparation est accélérée par centrifugation (12 000 trs/mn pendant 45 minutes). La phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une seringue.

La lignine purifiée se trouve dans la phase organique. Chacune des fractions est séchée et analysée en spectrométrie IR, la lignine est acétylée et analysée en RMN du proton.

IV.224 Chromatographie sur gel perméable (CGP)

Pour la séparation quantitative des extraits de lignines (1 à 2 g) en fractions de monomères, dimères et oligomères, nous avons utilisé une colonne ouverte de (35 cm x 4,5) remplie du gel Sephadex G-25 (fine). L'éluant est le mélange dioxanne-eau (1:1). Les caractéristiques de ce système sont données dans le tableau 23.

Le sommet de la colonne est alimentée en permanence en éluant. La sortie de la colonne est reliée à un collecteur de fractions par l'intermédiaire d'un tube de téflon dont le débit peut être réglé par une pince (50 ml par heure). On récupère ainsi des fractions de 10 ml environ.

Les éluats sont regroupés en fractions de type polymère (exclues du gel) oligomère, dimère et monomère sur la base de leur chromatogramme sur couche mince. Les spectres d'absorption dans l'UV entre 200 et 400 nm d'un éluat sur trois sont également enregistrés. Les hydrates de carbone partiellement absorbés sont élués après les monophénols.

Les produits sont récupérés directement par évaporation ou alternativement avec une extraction préalable au chloroforme pour les fractions de monomères et de dimères. Les produits sont alors séchés et pesés.

Avant de déposer au sommet de la colonne l'extrait, dissout dans 5 à 10 ml de solvant, est centrifugé pour éliminer les produits insolubles (inférieur à 1 %) ayant des spectres infrarouges caractéristiques d'acides gras.

IV.225 Chromatographie sur colonne ouverte

On utilise une colonne de verre de 30 cm de long et de 3 cm de diamètre, remplie de SiO_2 . Les produits (fractions de dimères) sont élués par le mélange toluène acétate d'éthyle (3:2). Des fractions de 5 à 10 ml sont récupérées et analysées par CCM. Les éluats contenant l'épisyngarésinol sont regroupés et évaporés.

IV.226 Chromatographie liquide haute performance CLHP

Nous utilisons un appareil analytique Waters Associates M 6000 équipé d'un injecteur à boucle U6K. Les produits sont détectés dans la cellule à flux continu d'un spectromètre UV à longueur d'onde variable Cecil Instruments.

Les colonnes (4,7 x 250 mm) sont remplies par voie humide selon la technique de Coq et Coll. (178). Nous avons utilisé un support chromatographique du type silice greffée C_{18} 10 μm (Macherey-Nagel) en polarité de phase inversée, le solvant utilisé est le mélange méthanol-eau.

Ce système a été utilisé pour purifier l'épisyngarésinol isolé des fractions de dimères.

IV.3 CARACTERISATION ANALYTIQUE DES EXTRAITS

IV.31 Analyse qualitative par chromatographie sur gel perméable

Des séparations analytiques par CGP ont été conduites sur les gels Sephadex LH-20 et LH-60 en utilisant comme solvant le diméthylformamide auquel on ajoute 1 %, en volume d'acide acétique. Une fois les gels gonflés dans ce solvant on remplit des colonnes en acier de 75 cm de long et de 0,75 cm de diamètre.

Ces colonnes sont installées sur un appareillage pour chromatographie liquide haute pression (CLHP) :

- pompe : Waters M 6000 A
- injecteur : Rhéodyne 71-25
- détecteur ultraviolet : UVISCO 1840

La vitesse d'écoulement est maintenue très précisément à 6 ml/h. La stabilité du système est vérifiée en injectant de manière occasionnelle un mélange test (lignine MWL + acétone).

Les chromatogrammes sont exprimés en unités K_d' définies par K. Lundquist et coll. (155) comme suit :

$$K_d' = \frac{V_e - V_p}{V_a - V_p}$$

V_e = volume d'élution du soluté ; V_p = volume d'élution d'un polymère du type lignine MWL ou de l'encre de Chine (correspond pratiquement au volume mort de la colonne) ; V_a = volume d'élution de l'acétone.

On peut ainsi comparer des résultats obtenus à partir des chromatogrammes enregistrés dans les mêmes conditions, notamment ceux de la littérature (155, 156) ou encore en enregistrant des composés modèles :

du type monomère : acide parahydroxybenzoïque, vanilline, férulate d'éthyle, alcool coniférylique,

du type dimère : (méthoxy-3 hydroxy-4 phényl)-1 méthoxy-2 phénoxy)-2 propanediol-1,3.

du type trimère ; (méthoxy-3 hydroxy-4 phenyl)-1 methoxy-2 (hydroxy-1 éthyl)-4 phénoxy -1 (methoxy-2 phenoxy)-2 propanediol-1,3.

du type polymère ; lignine MWL de peuplier, polymère artificiel de l'alcool coniférylique, DHP.

IV.32 Chromatographie en couche mince

Nous utilisons des plaques de chromatographie proposées par la compagnie Merck : Kieselgel 60 F₂₅₄, épaisseur 0,2 mm.

Les composés phénoliques sont séparés efficacement par le mélange toluène-dioxane-acide acétique (90:25:4). Les hydrates de carbone sont séparés d'un mélange de composés phénoliques par la butanone saturée d'eau.

Les composés phénoliques sont facilement repérés sous une lampe UV (280 nm) une fois le solvant évaporé au sèche-cheveux.

On peut révéler de manière définitive les produits élués en vaporisant les plaques avec un mélange H₂SO₄-formaline (1 %) après un chauffage de quelques minutes à 140°C on obtient des taches brun-noires excepté pour l'acide parahydroxybenzoïque. Les hydrates de carbone peuvent être également révélés de cette manière.

De nombreuses réactions spécifiques de composés phénoliques sont décrites dans la littérature. Nous avons plus particulièrement utilisé les réactifs suivants :

- exposition des chromatogrammes aux vapeurs d'iode (les composés de type stilbène deviennent orangés brunâtre),
- vaporisation d'un mélange d'acide chlorydrique concentré - solution à 15 % de 2 méthyl-indol dans l'éthanol (1:4) ; l'hydroxyméthyl-furfural devient jaune),
- vaporisation d'une solution à 0,1 M de phloroglucinol dans l'éthanol à 60 % ; (l'aldéhyde coniférylique devient violet-rouge, l'aldéhyde sinapylique devient pourpre).

IV.33 Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

Cette technique a été utilisée pour les fractions de type monomères et dimères isolées par CGP. Les analyses ont été effectuées en collabora-

tion avec le Service d'Etudes Analytiques du CENG (179) et C. Lapierre du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Institut National Agronomique de Grignon pour sa compétence spécifique dans la séparation et l'analyse des dérivés triméthylsilylés obtenus lors de l'acidolyse des lignines (157).

IV.331 Analyse des dérivés triméthylsilylés de la fraction des monomères

a) Préparation des échantillons :

3 mg de produits sont dissouts dans 1 ml de dioxanne anhydre. Environ 5 µl d'échantillon sont silylés (24 heures, à 20°) par 50 ml de bis (triméthylsilyl) trifluoro-acétamide avec 50 µl dioxanne et 10 µl pyridine.

b) Conditions analytiques

- le chromatographe GIRDEL 30, avec un injecteur évaporateur, un détecteur à ionisation de flamme et colonne capillaire en silice CP Sil 5 (40 m x 0,25 mm d.i., CHROMPACK) est couplé à un spectromètre de masse quadripolaire, NERMAG R10 10B, opérant en impact électronique (énergie des électrons : 70 ev),

- les séparations sont réalisées, à partir de 2 µl d'échantillon, à l'aide d'hélium comme gaz vecteur (14 p.s.i. en tête de colonne) et de 120 à 275°C (+5°C/min).

L'attribution des pics est effectuée d'une part par l'analyse des spectres de masse et d'autre part par comparaison avec des composés modèles traités de la même façon (77).

IV.332 Analyse des constituants de la fraction des dimères Préparation des échantillons

Pour analyser la fraction de dimère non dérivatisé, une prise d'essai de 25 mg de la fraction sèche est mise en solution dans 5 ml d'acétone. 3 µl de cette solution sont injectés directement dans le chromatographe.

Pour analyser les dérivés acétylés, on dissout 0,5 mg de l'échantillon dans 2 ml du mélange anhydride acétique-pyridine (1:1). On agite pendant 30 mm à 45°. Le milieu réactionnel est transvasé dans une ampoule à décanner, on ajoute 5 ml d'eau. On extrait la phase aqueuse obtenue par 5 ml d'éther éthylique. On injecte 3 à 5 μ l de la phase éthérée.

a) Conditions analytiques

L'appareillage est constitué :

- d'un chromatographe en phase gazeuse Varian 3700 équipé d'un diviseur de débit et d'une colonne capillaire à silice fondue (longueur, 10 m ; diamètre interne, 0,22 mm ; phase stationnaire, CP Sil 5 : gaz vecteur, hélium ; débit, 1,4 ml mm⁻¹ ; température injecteur, 340°C ; température initiale et finale du four : 150° et 240°C ; programmation 10°C mm⁻¹).

- d'un spectromètre de masse MAT 212. Le couplage de ces deux appareils est réalisé à l'aide d'une interface dite "open split" munie d'un dispositif d'élimination du solvant.

- d'un ensemble d'acquisition et de traitement de données SS 200.

L'attribution des pics est effectuée d'une part par l'analyse des spectres de masse et d'autre part en analysant des composés modèles dans les mêmes conditions.

IV.4 MODIFICATIONS CHIMIQUES DES LIGNINES

IV.41 Acétylation

On dissout 300 mg de lignine dans 5 ml de pyridine auquel on ajoute 5 ml d'anhydride acétique. On purge avec de l'azote et on laisse le mélange réactionnel 24 H à l'obscurité, à température ambiante.

Dans la majorité des cas, les lignines acétylées sont fractionnées par précipitation dans l'éther éthylique (250 ml pour 100 mg) : on définit ainsi une fraction acétylée insoluble dans l'éther éthylique (AIE) et une fraction acétylée soluble dans l'éther éthylique (ASE).

Dans quelques cas on récupère les lignines acétylées en évaporant les réactifs. Pour cela on ajoute au milieu réactionnel un morceau de glace et du méthanol, on attend une heure avant d'évaporer les réactifs. Au cours de l'évaporation du toluène et enfin du méthanol sont ajoutés et évaporés.

IV.42 Traitement à la soude

On dissout 100 mg de lignine insoluble dans l'éther éthylique dans 5 ml d'une solution de NaOH 2N. On laisse 20 heures à 50°C. La lignine est précipitée en abaissant le pH, et lavée abondamment à l'eau. La lignine insoluble est dissoute dans l'acétone et précipitée dans l'éther éthylique (200 ml). Les extraits aqueux sont extraits au chloroforme. On recherche alors par CCM l'acide parahydroxybenzoïque dans toutes les fractions ainsi définies. La lignine précipitée est également analysée en RMN ^{13}C .

IV.43 Hydrogénation

1 g de lignine est dissout dans 300 ml du mélange méthanol-eau (25:5). L'hydrogénation est effectuée par l'hydrogène à pression atmosphérique en présence de palladium sur charbon activé (5 %). On utilise 200 mg de catalyseur. On laisse 20 heures sous agitation à température ambiante. La lignine est récupérée par centrifugation sur cellite puis précipitée dans l'éther éthylique. Ce système a été testé d'abord pour réduire le férulate d'éthyle et le digaiacylstilbène.

IV.5 SYNTHESE DE COMPOSES MODELES

IV.51 Synthèse d'un dimère du type -0-4 dans la série gaïacyle : (Le (méthoxy-3 hydroxy-4 phenyl)-1 (méthoxy-2 phénoxy)-2 propanediol-1,3

La figure 88 présente les différentes étapes de synthèse de ce dimère. Les étapes nécessaires à la synthèse du composé sont décrites par L.L. Landucci et coll. (180) pour la réduction de la cétone, nous avons suivi le protocole de D.R. Dimmel et Coll. (181), la débenzylation

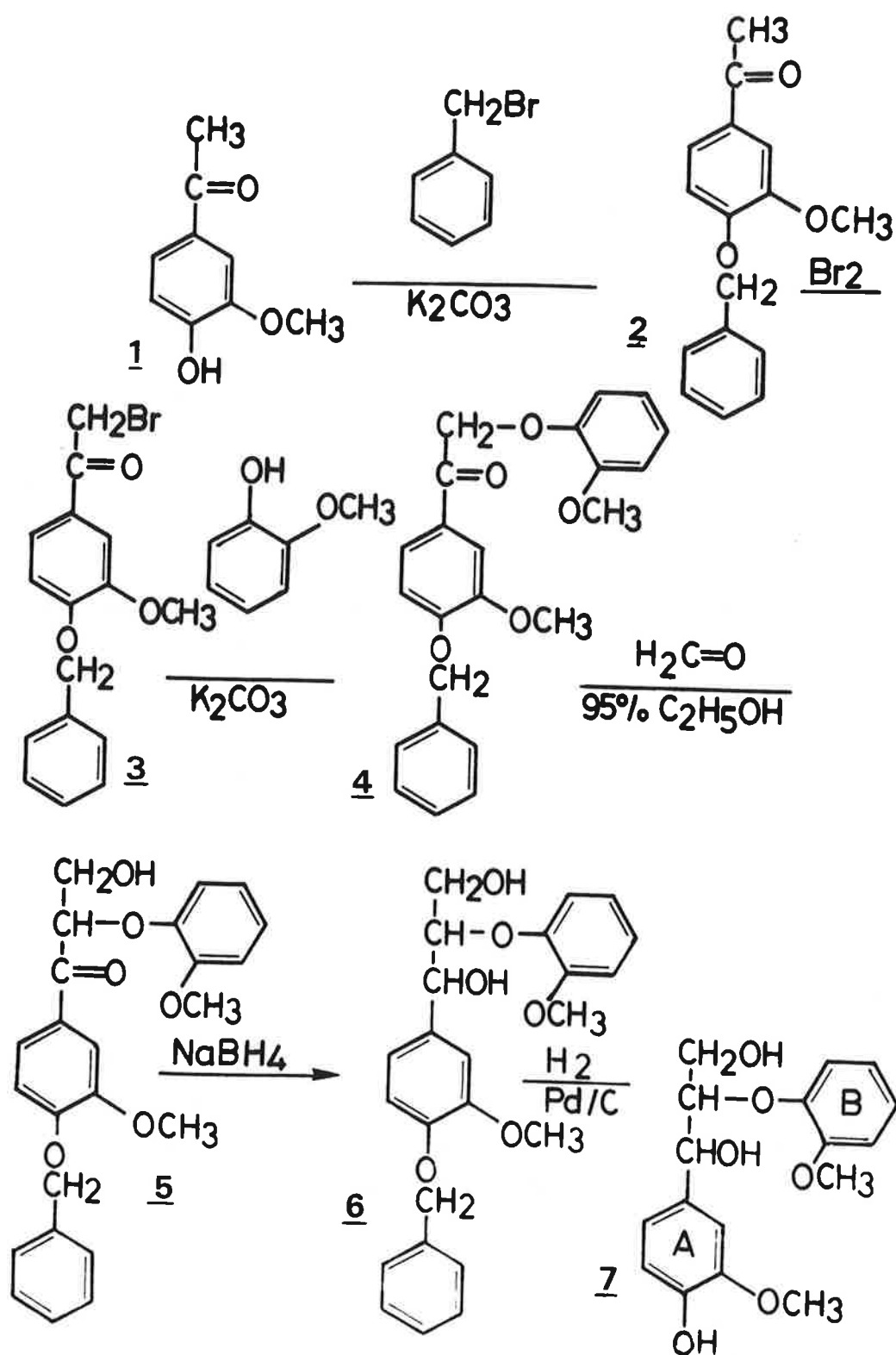


Figure 88 : Synthèse d'un dilignol du type β -0-4.

finale est décrite par L.L. Landucci et Coll. (182). Nous allons donc récapituler ces étapes :

Synthèse de 2 :

à 24,2 g (0,2 mole) d'acétophénone 1 dissout dans 750 ml d'éthanol on ajoute 25,4 g (0,2 mole) de bromure de benzyle et 20,2 g (0,2 mole) de carbonate de potassium. On met à reflux, tout en contrôlant la réaction par CCM, elle est complète au bout de trois heures. On évapore en partie le solvant, on ajoute alors de l'éther de pétrole pour obtenir la cristallisation du composé 2.

rendement (r) = 90 %, pont de fusion (Pf) = 86°C

Rf dans l'hexane-acétate d'éthyle (1:1) = 0,48.

Synthèse de 3 :

32 g (0,125) de 2 sont dissouts en chauffant dans un litre d'éthanol, on ajoute 20,8 g (0,13 mole) de brome, on fait passer dans la solution un courant d'azote gazeux pour entraîner l'HBr formé, le produit 3 formé précipite. La réaction est complète au bout de 70'. La solution rouge foncé du départ est devenue jaune clair. On récupère le produit 3 par filtration (le produit 3 est très peu soluble dans l'éthanol d'où l'intérêt de l'utiliser plutôt que CHCl_3 généralement utilisé ()).

R = 65 % Pf = 98 - 102°C Rf = 0,63.

Synthèse de 4 :

30 g (0,09 mole) de 3 sont dissouts dans 150 ml d'acétone ainsi que 11,12 g (0,09 mole) de gaïacol et on ajoute 12,4 g (0,09 mole) et K_2CO_3 . L'ensemble est mis à reflux, la réaction est complète en 6 heures. On récupère la phase organique en filtrant le reste de K_2CO_3 que l'on rince par de l'acétone. La phase organique est évaporée ; on obtient la cristallisation du produit 4 en ajoutant de l'éther de pétrole.

Rd = 90 % Pf = 96 à 101°, Rf = 0,50

Synthèse de 5 :

Du fait des risques de polymérisation au cours de cette étape d'aldolisation nous l'effectuons sur une quantité réduite de produit 4 ; à 8,5 g (0,0025 mole) du composé 4 on ajoute 41 ml d'éthanol à 95 %, 4 ml d'une solution à 37 % de formaldéhyde (0,049 ml) et 400 mg (0,029 mole) de K_2CO_3 . On purge l'atmosphère au dessus du mélange par l'azote gazeux. La température est régulée, la réaction s'effectuant en phase hétérogène, nécessite une agitation mécanique. La réaction est complète au bout de

les traces de méthanol. On dissout 0,97 g du produit 7 dans une ampoule à décanter), auquel on ajoute à la seringue 0,81 ml (2 équivalents molaires) de triméthylsilane. On laisse réagir deux minutes. On ajoute alors une solution saturée en hydrogénocarbonate jusqu'à obtenir un pH neutre qui conduit à la formation de la méthylène quinone (solution colorée en jaune). La phase organique est récupérée et séchée sur Na_2SO_4 . On vérifie la présence de la méthylène quinone en enregistrant le spectre d'absorption dans l'UV de la solution, il présente une absorption maximale à 310 nm. La solution peut être conservée plusieurs heures au réfrigérateur.

IV.523 Synthèse de structure α -0-4, β -0-4

Les agents nucléophiles sont connus pour réagir sur les méthylènes quinones, au niveau carbone C- α .

On ajoute ainsi à la solution de méthylène quinone, un nombre équivalent de mole d'apocynol dissout dans un minimum de CHCl_3 purifié. La réaction se produit lorsque l'on évapore le solvant, on la suit en enregistrant les spectres UV et par chromatographie sur couche mince. Le CCM montre qu'il y a un très grand nombre de produits formés ; la CPG dans le système LH.60 DMF-acide acétique (100:1) indique que l'on a bien synthétisé des produits de type, trimère mais également des oligomères de polymérisation supérieure.

Dans tous les cas, nous avons utilisé le mélange réactionnel comme modèle de structure alkyl-diaryl éther α -0-4, β -0-4.

IV.53 Synthèse du déhydrogénopolymère (DHP) de l'alcool coniférylique

IV.531 Synthèse de l'alcool coniférylique

a) Synthèse du férulate d'éthyle :

45 g d'acide férulique commercial sont dissouts dans 500 ml d'éthanol en présence HCl (1 ml) et mis à reflux. Au bout de 20 heures l'ester est dominant. On réduit alors la solution par évaporation à un volume de 150 ml auquel on ajoute 300 ml d'une solution saturée en

6 heures (le produit 4 a disparu ; vérification par CCM). Le milieu est mis à refroidir et les cristaux du composé 5 sont récupérés par filtration et sont lavés par de petites quantités d' H_2O .

Rd = 79 % Pf = 102 à 106° Rf = 0,14.

Synthèse de 6 :

8,14 g (0,004 mole) de la cétone 5 dissouts dans 300 ml d'éthanol sont réduits par une solution de NaBH_4 de molarité 2,3 (4,35 g dans 500 ml H_2O) que l'on ajoute goutte à goutte à température ambiante. Une fois cette addition terminée, on laisse sous agitation 30 minutes. L'analyse par CCM révèle que la réaction est complète. On ajoute goutte à goutte une solution HCl de molarité 6 jusqu'à la neutralité.

De l'eau est également ajoutée pour refroidir la solution. La solution est alors extraite 3 fois par CHCl_3 , les extraits sont séchés sur Na_2SO_4 et évaporés.

(Rd = 70 % Rf = 0,099).

Synthèse de 7 :

8,6 g (0,020 mole) du produit 6 sont dissous dans 75 ml d'éthanol à 95 % on ajoute 500 mg de palladium sur charbon (10 %). L'hydrogénation est effectuée par l'hydrogène gazeux (environ 0,5 l) à pression atmosphérique et à température ambiante pendant 20 heures.

La solution organique est filtrée sur Celite et le produit est récupéré par évaporation.

Rd = 90 %.

IV.52 Synthèse d'un trimère ayant une structure alkyl-diaryl ether α -0-4 β -0-4

IV.521 Synthèse de l'apocynol

L'apocynol est obtenu en réduisant la fonction cétonique de l'acétovanillone : le protocole est celui qui nous a permis de réduire le composé 6 en 7 (§ IV.51).

IV.522 Synthèse de la méthylène quinone - QM

Le chloroforme utilisé est préalablement purifié sur une colonne d'aluminium basique (grade I, 10 g pour 14 ml de solvant), pour enlever

bicarbonate de sodium. Une phase huileuse se forme. On enlève la phase aqueuse et on lave une fois à l'eau et 2 fois avec une solution saturée en NaCl la phase huileuse ; on sèche celle-ci sur Na_2SO_4 , elle cristallise alors rapidement. Rd = 95 %.

b) Synthèse de l'alcool coniférylique :

La synthèse se fait sous argon. On ajoute goutte à goutte 20 g de férulate d'éthyle en solution dans 500 cc d'éther anhydre, à 10 g de LiAlH_4 en suspension dans 500 cc d'éther anhydre. Pendant l'addition la température du bain est maintenue inférieure à -17°C . Pour extraire l'alcool, on détruit l'hydrure en excès et le sel de lithium par 100 cc d'éther mouillé et 250 cc d'eau. On maintient une agitation efficace pendant 1 heure. On acidifie légèrement la milieu avec de la carbo-glace jusqu'à ce que la phase solide devienne blanche. Le mélange devient jaune. On filtre. On extrait à l'éther. Lavage avec une solution saturée de NaCl. Séchage sur Na_2SO_4 . Rd = 70 %.

IV.532 Synthèse du DHP

Nous avons suivi le protocole proposé par T.K. Kik et coll. (183).

Trois solutions sont préparées :

A) à 540 ml d'une solution de tampon phosphate, on ajoute 1,1 ml d'eau oxygénée à 110 volume,

B) on dissout 2,3 g d'alcool coniférylique dans 20 ml d'acétone que l'on ajoute à 540 ml d'une solution de tampon phosphate pH = 6,5) contenant 54 mg de peroxydase.

C) on dissout 14 mg de peroxydase dans 250 ml de solution de tampon phosphate.

Toutes les solutions sont maintenues à l'abri de la lumière. La solution C est mise dans un erlen dans lequel on maintient une agitation mécanique et un courant d'azote. On ajoute alors chacune des solutions A et B à la solution précédente par un goutte à goutte maintenu à 22 ml/-heure par une pompe péristaltique du type Gilson. Ce système assure une assez bonne reproductibilité des conditions opératoires. Une fois les

solutions A et B épuisées on maintient l'agitation 18 heures. Le DHP est récupéré par centrifugation lavé deux fois et lyophilisé. On récupère ainsi 1,9 à 2,2 g de polymère à chaque synthèse.

IV.6 EXTRACTION DES LIGNINES DE BOIS NON TRAITES

Les lignines de bois non traité ont été extraites selon la méthode de Björkman (61, 62, 63) et sont classiquement notées lignines MWL (Milled Wood Lignin). Nous avons extrait ainsi les lignines MWL des bois de peuplier (*Populus tremula*), de bouleau (*Betula* sp) et de sapin (*Abies album*). La lignine MWL enrichie en ^{13}C a été extraite du bois de peuplier (*Populus tremula*) cultivé en atmosphère enrichie en $^{13}\text{CO}_2$ (132, 135).

Les copeaux de bois que l'on a écorcés sont réduits en sciure (particules de taille approximative 20 mesh/inch < 800 μ) dans un broyeur type Forplex.

- Cette sciure est extraite pendant 48 h, dans un Soxhlet au mélange éthanol-benzène (1:2). Ces extractions ont pour but d'éliminer les graisses, les tanins, les pigments.

- On sèche énergiquement cette sciure sous vide de la pompe vers 50-60°C, en présence de P_2O_5 , pendant quelques jours, en renouvelant P_2O_5 .

- La sciure séchée est alors traitée dans un broyeur à billes vibrant type Vibratom. Dans chaque pot, on place :

- . 10 g de sciure,
- . 350 ml de toluène anhydre (mis à reflux sur du sodium, puis distillé),
- . des billes de céramique (8/10e du volume).

- On purge l'air avec un courant d'azote (4), et le broyeur est mis en route pour environ 72 heures.

- On recueille la dispersion (toluène/sciure après avoir enlevé et rincé les billes avec du toluène. On sépare sciure et toluène par filtration.

- On sèche la sciure - dessiccateur chauffant 50-60°C + vide de la pompe.

- On met la sciure dans un mélange dioxanne (6)/eau (100:4).

- 10 g de sciure, 200 cc de colvant à température ambiante, à l'abri de l'air, si possible dans un récipient purgé avec N_2 .

L'extraction intensive de la lignine demanderait des mois. On se contente de :

- . 1 extraction de 12 h,
- . 1 extraction de 12 h,
- . 1 extraction de 3 jours,

en renouvelant le solvant chaque fois.

Purification

La solution dioxanne/eau contenant la lignine est évaporée sous vide (ne pas chauffer au-dessus de 60°C). Le résidu sirupeux obtenu est dissous à raison de 1 g dans 20 ml CH_3COOH contenant 10% d'eau. On ajoute, goutte à goutte, cette solution dans de l'eau (250 ml d'eau/g de produit), en agitant l'eau. On centrifuge le précipité. On le sèche et le redissout dans un mélange 1,2-dichloroéthane/éthanol 2:1. On élimine le solide non dissous par centrifugation, puis on refait précipiter la lignine en ajoutant cette solution goutte à goutte dans de l'éther éthylique.

On lave le précipité 2 fois à l'éther, puis une fois à l'éther de pétrole. On centrifuge. On sèche.

On récupère ainsi 5 à 10 % de lignine par rapport au bois de départ.

IV.7 ANALYSES SPECTROSCOPIQUES

IV.7.1 Résonance magnétique nucléaire

IV.7.1.1. Appareillage.

Toutes les expériences monodimensionnelles (CI, DEPT, QUAT, ...) ont été effectuées sur un appareil Bruker WM.200 opérant à une fréquence

de 200 MHz pour le proton. Celui-ci est équipé d'un calculateur Aspect 2000 et d'un générateur d'impulsions. Les expériences bidimensionnelles (2D INADEQUATE, COSY homonucléaire ^1H - ^1H et COSY hétéronucléaire ^{13}C - ^1H) ont été effectuées sur un spectromètre AM.400 opérant à une fréquence de 400 MHz sur le proton.

IV.712 Solvants et concentration.

Le solvant généralement utilisé est le DMSO deutérié (diméthylsulfoxyde) et, dans ce cas, la température est fixée à 323°K. D'autres solvants deutériés ont été occasionnellement utilisés : chloroforme, acétone et diméthylformamide. Généralement 300 à 500 mg de lignine sont dissouts dans 1,8 à 2 ml de solvant. Des tubes d'un diamètre de 10 mm sont utilisés pour ces expériences.

Tous les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS (tétraméthylsilane) en référence interne dont on ajoute une ou deux gouttes aux solutions.

IV.713. Séquences et paramètre utilisés.

Pour les différentes expériences bidimensionnelles, ainsi que pour l'expérience JMOD, nous avons directement utilisé les microprogrammes proposés par la compagnie Bruker (184). Le microprogramme pour enregistrer sélectivement les carbones quaternaires, a été écrit à partir des données de la littérature (115). Pour les autres expériences (CI, DEPT, ...), nous avons apporté quelques modifications aux programmes de base proposés.

a) Expérience CI

C'est le programme dit de découplage en créneaux inverses (inverse gated decoupling) : le découplage des protons est effectué uniquement pendant l'acquisition. En langage Bruker, le microprogramme utilisé est le suivant :

```
1    ZE
2    D1 DO S2
3    BB D2
4    GO = 2 BB
5    WR ≠ 1
6    10 to 2, times 300
EXIT
paramètres ;
```

paramètres :

$P_1 = 32 \mu s, (90^\circ) {}^1H$; $P_2 = 64 \mu s, (180^\circ) {}^1H$; $P_3 = 15 \mu s, (90^\circ) {}^{13}C$;
 $P_4 = 30 \mu s, (180^\circ) {}^{13}C$; $PW=RD=DE=0$; $D_2 = 0,033s, 1/2 {}^1J^{13}C-{}^1H$; $S_1 =$
 OH ; $S_2 = 6H$;
 $PO = 16 \mu s$; $NS = 16$; pour le "JOB" PO.001 ;
 $PO = 32 \mu s, 45^\circ {}^1H$; $NS = 32$; pour le "JOB" PO.002 ;
 $PO = 48 \mu s$; $NS = 16$; pour le "JOB" PO.003
 $D_1 = 3 \text{ sec.}$

Pour calibrer les impulsions sur le proton, on utilise le programme de base (DEPT.AU) en cherchant à annuler ($PO = 90^\circ {}^1H$) les signaux CH_2 en faisant varier P_1 , P_2 et P_0 en conséquence.

c) Expérience QUAT

Nous proposons le programme suivant :

```

1  ZE
2  D1 D0 S1
3  P1 PH1 D2
4  (P2 PH2)P3:D PH3
5  D2
6  GO=2 PH4
7  WR ≠ 1
8  LO TO 2, TIMES 300
EXIT

```

```

PH1 = A0 A0 A2 A2 A1 A1 A3 A3
PH2 = A0 A2 A2 A0 A1 A3 A3 A1
PH3 = B0 B0 B2 B2 B1 B1 B3 B3
PH4 = R0 R0 R2 R2 R1 R1 R3 R3

```

Paramètres :

$D_1 = 4s$; $P_1 = 15 \mu s, 90^\circ {}^{13}C$; $S_1 = OH$; $P_2 = 30 \mu s, 180^\circ {}^{13}C$; $P_3 = 32$
 $\mu s, 90^\circ {}^1H$; $D_2 = 0,033 \text{ ms}, 1/2 {}^1J {}^{13}C-{}^1H$; $PW = RD = DE = 0$; $NS = 150$.

$D_1 = 11$ s, temps de répétition entre chaque expérience ; $S_2 = 6H$, puissance nécessaire au découplage des protons (en MOD = 0) ; $D_2 = 1$ ms ; PW = 15 μ s impulsion à 90° sur les ^{13}C ; RD = 0 ; NS = 150.

b) Experience DEPT

Nous avons réécrit le programme de base (DEPT AU) proposé par Bruker, de manière à pouvoir enchaîner et répéter les trois expériences de base nécessaires. Le programme peut être arrêté quand on veut, chacune des expériences ayant alors le nombre désiré d'accumulations.

```

1  ZE
2  WR *1
3  IF $1
   IF DATA
4  LO TO 2,TIMES 3
5  RF *1.001
   RF DATA.001
6  RF P0.001
7  RE DATA
8  RJ P0
9  D1 DO S1
10 <P1 PH1 D2>:D
11 <P2 PH2>:D <P3 PH4 D2>
12 <P0 PH3>:D <P4 PH4 D2 S2>
13 GO=9 BB
15 WR DATA
16 IF DATA
17 IF P0
18 LO TO 7,TIMES 3
   RF DATA.001
   RF *1.001
19 RE DATA
   WR *1
   IF DATA
   IF *1
20 LO TO 19,TIMES 3
21 LO TO 5,TIMES X
   DO
22 EXIT
PH1=B0 B0 B0 B0 B0 B0 B0 B0 B2 B2 B2 B2 B2 B2 B2 B2
PH2=B0 B2
PH3=B1
PH4=A0 A0 A2 A2 A1 A1 A3 A3 A2 A2 A0 A0 A3 A3 A1 A1

```

d) Expérience JMOD

Nous avons utilisé le programme Bruker sans modification. Les valeurs $1/J$ et $1/2J$ sont calculées pour des valeurs de 1J $^{13}C-^1H$ de 110 à 160 Hz, le temps de répétition entre chaque expérience est fixé à 3 secondes.

e) Expériences d'inversion récupération et d'écho de spins

Les spectres 1H et ^{13}C nécessaires pour calculer les T_1 ont été enregistrés avec l'expérience d'inversion-récupération avec un découplage large bande des protons pendant la durée de l'acquisition, lorsque l'expérience est effectuée en carbone treize.

L'expérience CPMG-AU proposé par Bruker pour mesurer les T_2 a été utilisée dans notre cas pour suivre l'évolution des raies larges observées en RMN ^{13}C dans certaines lignines. Un découplage large bande des protons est alors appliqué pendant l'acquisition.

f) Expérience bidimensionnelle de corrélation
proton-proton par les couplages scalaires.

Nous avons utilisé le microprogramme Bruker COSY-an. L'impulsion à 90° d'excitation est de 5,5 μs . Nous avons choisi une impulsion de mélange (P_2) à 45° . 256 expériences sont effectuées, pour chaque expérience, le nombre d'accumulation est de 64. Le temps de répétition est de 3 secondes, la largeur spectrale de 2400 Hz dans F_2 . Deux multiplications gaussiennes ont été effectuées suivant F_1 et F_2 avant la double transformée de Fourier. La taille de la matrice est de 256x2048 transformée sur 1048x2048.

IV.7137. Expérience bidimensionnelle de corrélation
carbone-proton par les couplages scalaires.

Nous avons utilisé le microprogramme XHCORR.AU. Les largeurs spectrales suivant F_1 et F_2 sont respectivement 8928 Hz et 1200 Hz. L'impulsion à 90° sur les ^{13}C est de 15 μs et celle sur les protons est de 25 μs . On déduit alors les valeurs de P_1 , P_2 , P_3 , P_4 . 256 expériences (valeurs de D_0 différentes) sont effectuées pour chaque expérience le nombre d'accumulations est de 48. Le temps de répétition est fixé à 3

secondes. Le délai D3 est 0,033 ms, le délai D4 = .002. La matrice de départ de taille 256x2048 est transformée en une matrice de taille 1024x2048.

Deux multiplications sinusoïdales suivant F1 et F2 ont été effectuées avant la double transformée de Fourier. La représentation en valeur absolue a été choisie.

g) Expérience bidimensionnelle de corrélation
carbone-carbone par les couplages scalaires INADEQUATE.

Nous avons utilisé le programme INADSYM.AU qui permet d'obtenir une carte à deux dimensions de type COSY. L'impulsion à 90° sur les carbones treize est de 15,5 μ s. Le temps de répétition (D1) est de 1,5 seconde (réduit à une seconde, les corrélations entre les carbones quaternaires disparaissent). Nous avons utilisé une impulsion P3 de 21,3 μ s correspondant à 120°, ce qui favorise alors les signaux des multiples quanta. 64 expériences ont été réalisées, chacune correspondant à 1024 accumulations (30 heures d'expérience). Le délai D2 = $(2N + 1)/4J$ est calculé pour N=0 et deux valeurs de J ont été essayées : 40 et 70 Hz. La carte de la figure 28 correspond à une valeur de 0,0036 ($J_{13C-13C} = 70$ Hz). La largeur spectrale utilisée en F2 est de 12.500 Hz. La matrice de départ d'une taille 64x1024 est transformée en une matrice de taille 512x1024. La résolution digitale dans la dimension F2 est de 24,8 Hz par point.

Pour accroître le rapport signal sur bruit de la carte 2D finale, nous avons effectué la somme de 3 expériences d'INADEQUATE effectuées sur le même échantillon de lignine enrichie en ^{13}C , et avec les mêmes conditions expérimentales, excepté les délais D1 et D3. Ces derniers étaient les suivants :

expérience n° 1	$D_1 = 1$ s	$D_3 = 0,003$	NS = 1024
expérience n° 2	$D_2 = 1,5$ s	$D_3 = 0,006$	NS $\pm$ 1024
expérience n° 3	$D_2 = 1,5$ s	$D_3 = 0,003$	NS = 1024.

Les trois expériences donnaient des cartes 2D très semblables, excepté l'absence de certaines corrélations entre les carbones quaternaires pour l'expérience n° 1. La somme des trois expériences a été effectuée, avant leur double transformation de Fourier, automatiquement par le microprogramme suivant :

```

1 ZE
2 RE ≠ 1
  RE ≠ 2
  RE ≠ 3
  RE ≠ 4
3 AT ≠ 2
4 AT ≠ 3
5 WR ≠ 4
6 IF ≠1
  IF ≠2
  IF ≠3
  IF ≠4
7 IN = 2
8 EXIT

```

Paramètres : NE = 64

DC = 1

Après double transformée de Fourier, on obtient la carte de la figure 31.

Les spectres 1D des figures 28 et 31 correspondent au spectre ^{13}C découplé des protons, enregistré avec la même résolution digitale (24,8 Hz par point) et la même fenêtre spectrale que dans la dimension F2.

IV.714. Exploitation quantitative des spectres RMN

L'opérateur doit être conscient que, si les conditions expérimentales utilisées (107,108,109) permettent d'enregistrer des spectres quantitatifs (séquences, traitement du signal), la fiabilité de l'analyse quantitative repose alors uniquement sur le soin apporté à l'intégration des signaux choisis. Le programme d'intégration proposé par Bruker nous a donné entière satisfaction (résultats comparables à une pesée ou à l'utilisation d'un planimètre), si l'on prend la précaution de phaser correctement les signaux et de redéfinir la ligne de base : notre critère est d'obtenir une intégrale nulle lorsqu'il n'y a pas de signal, et de rejeter les intégrales qui croissent ou décroissent de part et d'autre des signaux. Pour cela, on peut agrandir les signaux, reprendre les corrections de phase, redéfinir la ligne de base, et l'on procède ensuite à l'intégration. Moyennant ces précautions, l'intégration d'un signal est très reproductible.

Le diagramme ci-dessous visualise les régions des spectres de lignines (acétylées ou non) enregistrées avec les expériences CI ou DEPT que nous avons retenues pour l'analyse quantitative.

Echantillon de lignine acétylée non acétylée	Région spectrale considérée (ppm)	Information structurale accessible
CI	152 à 100	total des carbones aromatiques
CI	152-150	carbones C-3 et C-5 des syringyles dans les structures β -O-4
CI	100 à 56	carbones aliphatiques liés à des oxygènes
CI	56	carbones méthoxyliques
DEPT	130 à 100	CH aromatiques
DEPT	131	C-2 et C-6 des unités para-hydroxybenzoïques
DEPT	100 à 70	CH aliphatiques liés à des oxygènes
DEPT	70 à 56	CH ₂ aliphatiques liés à des oxygènes
DEPT	53,8 à 53,4	C- β des structures β - β et β -5
DEPT		CH ₂ aliphatiques saturés
CI	152 à 100	total des carbones aromatiques
CI	100 à 56	carbones aliphatiques liés à des oxygènes
CI	56	carbones méthoxyliques
CI	168,9	carbones d'acétoxyles phénoliques
CI	170,8	carbones d'acétoxyles aliphatiques laire
CI	170	" IIaire

- 1 F. RAMADE
Ecologie des ressources naturelles
Massen - Paris (1981) p. 33 à 39:
- 2 Chemical feedstock alternatives
America Institute of Chemical Engineers New York (1977)
- 3 Future sources of organic raw materials
(CHEMRAWN I) TORONTO (1978)
- 4 H. LIETH
Modeling the primary productivity of the world
Cienc. Cult. : (1975), 189, 847
- 5 I. S. GOLDSTEIN
Organic chemicals from biomass - I. S. Goldstein
Editor, CRC Presse. (1981) p 3-7
- 6 H. CHERADAME
La technologie du papier
La Recherche : (1983), 14, 1236-1243
- 7 D. FENGEL G. WEGENER
Wood in chemistry -ultrastructure- reactions
Walter de Gruyter - Berlin - New York - 1984 -
Pulping Processes, p 415-481
- 8 S. Y. LIN
Lignin utilization : potential and challenge
Progress in Biomass Conversion (1983), 4, 32-77.
- 9 E. SYÖSTROM
Wood chemistry - Fundamentals and applications-
Academic Press. New-York (1981)
Chemicals from wood and by products after pulping p. 190-207.
- 10 G. de GAUDEMARIS, J.P. ARLIE et J.C. GUIBET
Les carburants de substitution.
La Recherche : (1986), 17, 175, 376-384.
- 11 réf. (5), p. 143.
- 12 réf. (7), p. 526.
- 13 réf. (7), p. 462.
- 14 B.R. ALLEN, M.J. COUSIN et G.E. PIERCE
Pretreatment method for degradation of lignin.
1980 To Problem Focused Research Applications, National Sciences
Foundation ; Batelle Laboratories, Columbo, Ohio.
- 15 Canadian patents and development Ltd,
Brevet français (1978) 7820556

- 16 Y. SCHWOB
Compte rendu n° 1602, 22 juin 1982
Centre Technique du Papier de Grenoble
- 17 F. KOLLMANN, E. SUENZI, A. STAMM.
Principle of wood science and technology
Springer Verlag, Berlin, 1^{ère} édition, 1975, vol 2, p. 590-595.
- 18 A. ASPLUND
The origin and development of the defibrator process.
Svensk Papperstidning : (1953), 56, 550-558
- 19 M. GLIHMAN
ler colloque international d'ingénierie bioindustrielle
Biofutur : (1983), 11, 36.
- 20 A. KLEMOLA G.A. NYMAN
Steam hydrolysis of birchwood - the effect of hydrolysis on the
hemicellulose, cellulose and lignins of birchwood.
Paperi ja puu : (1966), 10, 595-603
- 21 S. YLLNER, D. OSTBERG and L. STOCKMAN
A study of the removal of the constituents of pine wood in the
sulphate process using a continuous liquor flow method.
Svensk Papperstidning : (1957), 69, 795-802
- 22 T.P. SCHULTZ, M.C. TEMPLETON, G.J. BIERMANN and G.D. MAGINNIS
Steam explosion of mixed hardwood chips, rice hulls, corn stalks,
and sugar cane bagasse.
Journal of Agricultural and Food Chemistry : (1984), 32, 1166-1172.
- 23 T.P. SCHULTZ, G.D. Mc GINNIS and C.S. BIERMANN
Similitarities and differences in pretreating woody biomass by
steam explosion, wet oxydation, autolydrolysis and rapid steam
hydrolysis/continuous extraction.
In press : energy from biomass and wastes VIII institute of gas
technologie, chicago, IL, 1984.
- 24 H. Mamers, J.P. YURITTA et D.J. MENZ
The siropulper, an explosive alternative for non wood pulping.
Tappi : (1981), 64, 7, 93-96.
- 25 D. MACKIE
Comparison of steam explosion with and without acid catalysts.
Rotorua Meeting - New Zealand (1985).

- 26 R.H. MARCHESSAULT, S. COULOMBE, T. HANAI and H. MORIKAWA
Monomers and oligomers from wood.
Transactions : (1980), 26, 2, 52-56.

- 27 T.P. SCHULTZ and C.J. BLERMANN, and G.D. Mc GINNIS.
Steam explosion of mixed hardwood chips as a biomass pretreatment
Ind. Eng. Chem. Res. Dev : (1983) p. 22, 3, 344-348.

- 28 D. BARNET
Autohydrolyse rapide du bois de peuplier (populus tremula) :
évolution de la composition des échantillons en fonction de la
durée du traitement, Isolement et caractérisation d'oligosacchari-
des acides.
(1984) : thèse du docteur de 3e cycle, Université Scientifique et
Médicale de Grenoble.

- 29 E. Nava SAUCEDO
Autohydrolyse rapide du bois de tremble (populus tremuloïdes) :
étude comparative des échantillons obtenus sous différents
traitements séparations et caractérisation des mono-et disacchari-
des.
(1982) : thèse de docteur Ingénieur, Université Scientifique et
Médicale de Grenoble.

- 30 R.M. MARCHESSAULT, S. COULOMBE, Hiramichi MORIKAWA, and D. ROBERT.
Characterization of aspen exploded wood lignin
Canadian journal of chemistry : (1982), 60, 18, 2372-2382.

- 31 H.L. CHUM, M. RACTLIFF, M.A. SCHROEDER and D.W. SOPHER
Electrochemistry of biomass -derived materials
I characterization, fractionation and reductive electrolysis of
ethanol extracted explosively depressurized aspen lignin
Journal of Wood Chemistry and Technology : (1984), 4, 4, 505-532.

- 32 J.A. HEMMINGSON
The structure of lignin from pinus radiata exploded wood.
Journal of Wood Chemistry and Technology : (1983), 3, 3, 289-312.

- 33 J.A. HEMMINGSON
Structural aspects of lignins from eucalyptus regnas wood steam
exploded by IOTEC and siropulper processes.
Soumis au Journal of Wood Chemistry and Technology : (1987)

- 34 A. KLEMOLA
Investigations of Birchwood (Betula pubexeus) lignin degraded by
hydrolysis.
Suomen Kemistilehti : (1968), A. 41, 166-180

- 35 A. KLEMOLA
Steam hydrolysis of birchwood, part II fractionation and preliminary investigation of steam hydrolysis lignin.
Suomen Kemistilehti : 1967, B 40, 329-335.
- 36 A. KLEMOLA
Steam hydrolysis of birchwood, part III
Investigation of low-molecular aromatic degradation products.
Suomen Kemistilehti : (1968), B 41, 83-98.
- 37 A. KLEMOLA
Steam hydrolysis of birchwood, part IV
PMR spectroscopic studies of degraded lignin.
Suomen Kemistilehti : (1968), B 41, 99-107
- 38 A. KLEMOLA
Steam hydrolysis of birchwood, part V.
An investigation of carbonyl and carboxyl groups in the degraded lignin.
Suomen Kemistilehti : (1968), A 41, 152-160
- 39 A. KLEMOLA
Steam hydrolysis of Birchwood, part VI.
An investigation of the hydroxyl groups in the degraded lignin.
Suomen Kemistilehti : (1968), B 41, 160-168.
- 40 M. G. S. CHUA and M. WAYMAN
Characterization of autohydrolysis aspen (p. tremuloïdes) lignins.
part 1. Composition and molecular weight distribution of extracted autohydrolysis lignin.
Canadian Journal of Chemistry : (1979), 57, 1141-1149.
- 41 M. WAYMAN and M.G.S. CHUA
Characterization of autohydrolysis aspen (P. Tremuloïdes) part 2.
alkaline nitrobenzene oxydation studies of extracted autohydrolysis lignin.
Journal of Canadian Chemistry : (1979), 57, 99-2602.
- 42 M.G.S. CHUA and M. WAYMAN
Characterization of autohydrolysis aspen (P. Tremuloïdes) lignins
Part. 3. Infrared and ultraviolet studies of extracted autohydrolysis lignin.
Journal of Canadian Chemistry : (1979), 57, 2603-2612
- 43 M. WAYMAN and M.G.S. CHUA
Characterization of autohydrolysis aspen (P. tremuloïdes) lignins.
Part 4. Residual autohydrolysis lignin.
Journal of Canadian Chemistry : (1979), 57, 2612-2616.

- 44 S.I. ARONOVSKY and R.A. GORTNER
The cooking process.I. Role of water in the cooking of wood.
Ind. Eng. Chem. : (1930), 22, 264-276

- 45 C.V. PIPER and L.J. BERNARDIN
A spectrophotometric method for the chromatographic analysis of
sugars.
Tappi : (1958), 41, 9-16

- 46 G.A. RICHTER
Some aspects of prehydrolysis pulping.
Tappi : (1956), 39, 4, 193-210

- 47 R.L. CASEBIER, S.K. HAMILTON, and H.L. HERGERT.
Chemistry and mechanism of water prehydrolysis on southern pine
wood.
Tappi : (1969), 52, 12, 2369-2377

- 48 F.E. BRAUNS
The chemistry of lignin.
Academic Press : New-York (1952)

- 49 T.P. SCHULTZ and G.D. Mc GINNIS
Pretreatment of sweetgum and white oak using the steam explosion
and RASH processes.
soumis à Journal of Wood Chemistry and Technology.

- 50 J.H. LORA and M. WAYMAN
Autohydrolysis of aspen milled wood lignin
Canadian Journal of Chemistry : (1980), 58, 669-676.

- 51 J.H. LORA and M. WAYMAN
Autohydrolysis extraction : a new approach to sulfur free pulping.
Tappi (1978) : 61, 12, 88-89.

- 52 K. SUDO, K. SHIMIZU and K. SAKURAI
Characterization of steamed wood lignin from beech wood
Holzforschung : (1985), 39, 281-288.

- 53 K.V. SARKANEN
Lignins occurrence, formation, structure and reactions.
K.V. SARKAMEN. G.H. LUDWIG Editors. Wiley interscience 1971
Precursors and their polymerisation, p 95-163.

- 54 B. MONTIES
Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non
azotés.
B. Monties éditeur, Gauthier-Villars 1980, Les Lignines, p.122-153.

- 55 K. FREUDENBERG, and A.C. NEISH
Constitution and biosynthesis of lignin.
Springer Verlag-Berlin-Heildelberg-New York. (1968)
- 56 K.V. SARKANEN and H.L. HERGERT.
réf. (53)
Classification and distribution, p. 43-94
- 57 ref. (7)
lignin heterogeneity, p 148-151
- 58 T. HIGUCHI
Biochemical aspects of lignification and heartwood formation.
Wood Research : (1976), 160, 59, 180-199.
- 59 A.G. WALTON and J. BLACKWELL
Biopolymers.
Academic Press : New-York and London (1973). Structural Units of
biopolymers, p. 1 à 8
- 60 E. ADLER
Lignin chemistry : past, present and future
Wood Science and Technology : (1977), 11, 169-218.
- 61 A. BJÖRKMAN
Studies on finely divided wood. Part I. Extraction of lignin with
neutral solvents
Svensk Papperstidning (1956), 59, 13, 477-485.
- 62 A. BJÖRKMAN
Studies on finely divided wood. Part 3.
Extraction of lignin carbohydrate complexes with neutral solvents
Svensk Papperstidning : (1957), 60, 7, 243-351.
- 63 A. BJÖRKMAN
Lignin and lignin. Carbohydrate complexes, Extraction from wood
meal with neutral solvents.
Industrial and Engineering Chemistry : (1957), 49, 9, 1395-1398.
- 64 Z.Z. LEE, G. MESHITSUKA, N.S. CHO and J. NAKANO
Characteristics of milled wood lignins isolated with different
milling times.
Mokuzai Gakkaishi : (1981), 27, 9, 671-677.
- 65 W.G. GLASSER, C.A. BARNETT and Y. SANO
Classification of lignins with different genetic and industrial
origin.
Applied Polymer Symposia : 37, 441-460.

- 66 S. LARSSON and G.E. MIKSCHÉ
Gas chromatographic analysis of lignin oxydation products. IV.
Structure of Birch lignin.
Acta Chemica Scandinavica : (1971), 25, 647-662

- 67 N. MOROHOSHI and W.C. GLASSER
The structure of lignins in pulps. Part 4. Comparison of five
lignin depolymerisation techniques.
Wood Science and Technology (1979), 13, 165-178

- 68 H. NIMZ, K. DAS and N. MINERMURA
Niedermolekulare Spaltprodukte des Lignins, 1
Der Abbau des Buchenlignins mit Thioessigsäure
Chemische Berichte : (1971), 104, 1871-1876.

- 69 H. NIMZ and K. DAS
Niedermolekulare Spaltprodukte des Lignins, 2
Durch Abbau mit Thioessigsäure erhaltene dimere Abbauphenole des
Buchenlignins.
Chemische Berichte : (1971), 104, 1359-2380.

- 70 K. LUNDQUIST and R. LUNDGREN
Acid degradation of lignin, part VII the cleavage of ether bonds
Acta Chemica Scandinavica : (1972), 26, 2005-2023.

- 71 K. LUNDQUIST and K. HEDLUND
Acid degradation of lignin V degradation products related to the
phenylcoumaran type of structure.
Acta Chemica Scandinavica : (1971), 25, 2199-2210.

- 72 K. LUNDQUIST and G.E. MIKSCHÉ
Nachweis eines neuen Verknüpfungsprinzip von
Guajacylpropaneinheiten im Fichtenlignin.
Tetrahedron Letters : (1965), 25, 2131-2136.

- 73 H. NIMZ
Beech lignin. Proposal of a constitutional scheme
Angewandte Chemie : (1974), 13, 5, 313-321.

- 74 T. YASUDO and A. SAKAKIBARA
Hydrogenolysis of protolignin in compression wood V isolation of
two trimeric compounds with -lactone ring
Holzforschung : (1981), 35, 183-187.

- 75 B.H. HWANG, A. SAKAKIBARA and K. MIKI
Hydrogenolysis of protolignin XVII isolation of three dimeric
compounds with -0-4, 13-1 and -0-4 linkages from hardwood lignin.
Holzforschung : (1981), 35, 229-232.

- 76 B.H. HWANG and A. SAKAKIBARA
Hydrogenolysis of protolignin XVIII isolation of a new dimeric compound with a heterocycle involving -, -diether.
Holzforschung : (1981), 35, 297-300.

- 77 C. LAPIERRE, C. ROLANDO and B. MONTIES
Characterization of poplar lignins acidolysis products : capillary gas - liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds.
Holzforschung : (1983), 37, 189-198.

- 78 A. SAKAKIBARA
A structural model of softwood lignin.
Wood Science and Technology : (1980), 14, 89-100.

- 79 O. GOLDSCHMID
réf. (53). Ultraviolet Spectra p. 241-266

- 80 réf. (7), p 151-164

- 81 P.W. LANGE
The distribution of lignin in the cell wall of normal and reaction wood from spruce and a few hardwoods.
Svensk Papperstidning : (1954), 57, 525-532

- 82 B.S. FERGUS, A.R. PROCTER, S.A.N. SCOTT and D.A.I. GORING.
The distribution of lignin in spruce wood as determined by ultraviolet microscopy.
Holzforschung : (1970), 24, 118-124.

- 83 K.V. SARKANEN, H.M. CHANG and B. ERICSSON
Species variation in lignins I infrared spectra of guaiacyl and springyl models.
Tappi : 1967, 50, 11, 572-575.

- 84 K.V. SARKANEN, H.M. CHANG and G.G. ALLAN
Species variation in lignins. III conifer lignins
Tappi : 1967, 50, 12, 583-587.

- 85 K.V. SARKANEN, H.M. CHANG and G.G. ALLAN.
Species variation in lignins. III hardwood lignins.
Tappi : 1967, 50, 12, 587-590.

- 86 H.L. HERGERT
réf. (53). Infrared spectra p. 267-297

- 66 S. LARSSON and G.E. MIKSCH
Gas chromatographic analysis of lignin oxydation products. IV.
Structure of Birch lignin.
Acta Chemica Scandinavica : (1971), 25, 647-662

- 67 N. MOROHOSHI and W.C. GLASSER
The structure of lignins in pulps. Part 4. Comparison of five
lignin depolymerisation techniques.
Wood Science and Technology (1979), 13, 165-178

- 68 H. NIMZ, K. DAS and N. MINERMURA
Niedermolekulare Spaltprodukte des Lignins, 1
Der Abbau des Buchenlignins mit Thioessigsäure
Chemische Berichte : (1971), 104, 1871-1876.

- 69 H. NIMZ and K. DAS
Niedermolekulare Spaltprodukte des Lignins, 2
Durch Abbau mit Thioessigsäure erhaltene dimere Abbauphenole des
Buchenlignins.
Chemische Berichte : (1971), 104, 1359-2380.

- 70 K. LUNDQUIST and R. LUNDGREN
Acid degradation of lignin, part VII the cleavage of ether bonds
Acta Chemica Scandinavica : (1972), 26, 2005-2023.

- 71 K. LUNDQUIST and K. HEDLUND
Acid degradation of lignin V degradation products related to the
phenylcoumaran type of structure.
Acta Chemica Scandinavica : (1971), 25, 2199-2210.

- 72 K. LUNDQUIST and G.E. MIKSCH
Nachweis eines neuen Verknüpfungsprinzip von
Guajacylpropaneinheiten im Fichtenlignin.
Tetrahedron Letters : (1965), 25, 2131-2136.

- 73 H. NIMZ
Beech lignin. Proposal of a constitutional scheme
Angewandte Chemie : (1974), 13, 5, 313-321.

- 74 T. YASUDO and A. SAKAKIBARA
Hydrogenolysis of protolignin in compression wood V isolation of
two trimeric compounds with γ -lactone ring
Holzforschung : (1981), 35, 183-187.

- 75 B.H. HWANG, A. SAKAKIBARA and K. MIKI
Hydrogenolysis of protolignin XVII isolation of three dimeric
compounds with β -0-4, β -1-3 and β -0-4 linkages from hardwood lignin.
Holzforschung : (1981), 35, 229-232.

- 76 B.H. HWANG and A. SAKAKIBARA
Hydrogenolysis of protolignin XVIII isolation of a new dimeric compound with a heterocycle involving -, -diether.
Holzforschung : (1981), 35, 297-300.

- 77 C. LAPIERRE, C. ROLANDO and B. MONTIES
Characterization of poplar lignins acidolysis products : capillary gas - liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds.
Holzforschung : (1983), 37, 189-198.

- 78 A. SAKAKIBARA
A structural model of softwood lignin.
Wood Science and Technology : (1980), 14, 89-100.

- 79 O. GOLDSCHMID
réf. (53). Ultraviolet Spectra p. 241-266

- 80 réf. (7), p 151-164

- 81 P.W. LANGE
The distribution of lignin in the cell wall of normal and reaction wood from spruce and a few hardwoods.
Svensk Papperstidning : (1954), 57, 525-532

- 82 B.S. FERGUS, A.R. PROCTER, S.A.N. SCOTT and D.A.I. GORING.
The distribution of lignin in spruce wood as determined by ultraviolet microscopy.
Holzforschung : (1970), 24, 118-124.

- 83 K.V. SARKANEN, H.M. CHANG and B. ERICSSON
Species variation in lignins I infrared spectra of guaiacyl and springyl models.
Tappi : 1967, 50, 11, 572-575.

- 84 K.V. SARKANEN, H.M. CHANG and G.G. ALLAN
Species variation in lignins. III conifer lignins
Tappi : 1967, 50, 12, 583-587.

- 85 K.V. SARKANEN, H.M. CHANG and G.G. ALLAN.
Species variation in lignins. III hardwood lignins.
Tappi : 1967, 50, 12, 587-590.

- 86 H.L. HERGERT
réf. (53). Infrared spectra p. 267-297

- 87 R. KESRAOUI
Aspects chimiques et biochimiques des liaisons lignine-hydrates de carbone.
(1983) thèse de Docteur de 3e cycle Université scientifique et médicale de grenoble.

- 88 J.R. OBST.
Guaiacyl and syringyl lignin composition in hardwood cell components.
Holzforschung : 1982, 36, 143-152.

- 89 R. BENN and H. GÜNTHER
Modern pulse methods in high-resolution NMR spectroscopy.
Angewante Chemie : (1983), 22, 350-380.

- 90 J.N. SHOOLERY.
Recent developments in ^{13}C and proton NMR.
Journal of Natural Products : (1984), 42, 2, 266-259.

- 91 C.H. LUDWIG, B.J. NIST and J.L. McCARTHY.
Lignin XII the high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of protons in compounds related to lignin.
Journal of the American Chemical Society : (1964), 86, 1186-1197.

- 92 C.H. LUDWIG, B.J. NIST and J.L. McCARTHY
Lignin XIII. The high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of protons in acetylated lignins.
Journal of the American Chemical Society : (1964), 86, 1197-1202.

- 93 K. LUNDQUIST
NMR studies of lignins. 3 ^1H NMR spectroscopic Data for lignin Model compounds.
Acta Chemica Scandinavica : (1979), B 33, 6, 418-420.

- 94 K. LUNDQUIST, A. PATERSON and L. RAMSEY.
NMR Studies of lignins. 6 interpretation of the ^1H NMR spectrum of acetylated spruce lignin in a detersacetone solution.
Acta Chemica Scandinavica : (1983), B 37, 8, 734-736.

- 95 K. LUNDQUIST, R. SIMONSON and K. TINGOVIK
On the occurence of carbohydrates in milled wood lignin preparations.
Svensk Papperstidning : (1979), 9, 272-275.

- 96 K. LUNDQUIST, R. SIMONSON and K. TINGSVIK
Studies on lignin carbohydrate linkages in milled wood lignin preparations.
Svensk Papperstidning : (1980), 16, 452-454.

- 97 K. LUNDQUIST and T. OLSON.
NMR Studies of lignins. 1. Signals due to protons in formyl groups.
Acta Chemica Scandinavica : (1977), B 31, 9, 788-792.

- 98 H.M. NIMZ and H.D. LUDEMANN.
Kohlenstoff-13-NMR- spektren von ligninen 6) lignin and DHP
acetate.
Holzforschung : (1976), 30, 33-40.

- 99 H.M. NIMZ, I. MOGHARAB, und H.D. LUDEMANN.
13_C-Kernresonanzspektren von ligninen, 3. Vergleich von
Fichtenlignin mit künstlichem Lignin nach Frenenberg.
Makromolekulare Chemie : (1974), 175, 2563-2575.

- 100 H.M. NIMZ, D. ROBERT, O. FAIX and M. NEMR
carbon-13 NMR spectra of lignins, 8 structural differences between
lignins of Hardwood softwoods, grasses and compression wood.
Holzforschung : (1981), 35, 16-26.

- 101 K.P. KRINGSTAD and R. MORCK 13_C NMR spectra of kraft lignins.
Holzforschung : (1983), 37, 237-244.

- 102 R. MORCK and K.P. KRINGSTAD 13_C NMR spectra of kraft lignins II
kraft lignins acetates.
Holzforschung : (1985), 39, 109-119.

- 103 M.G.S. CHUA, C.L. CHEN and H.M. CHANG.
13_C NMR Spectroscopic study of spruce lignin degraded by
Phanerochaete chrysosporium, I new structures
Holzforschung : (1982), 36, 165-172.

- 104 M.C.S. CHUA, C.L. CHEN and H.M. CHANG 13_C NMR spectroscopic study
of spruce lignin degraded by Phanerochaete chrysosporium. II
synthesis and chemical shifts of model compounds.
Holzforschung : (1982), 36, 239-247.

- 105 H.Y. HASSI, M. AOYAMA, D. TAI, C.L. CHEN and J.S. GRATZL
Substituent effects on 13_C chemical shifts of aromatic carbons in
β-0-4 and β-5 type lignin model compounds.
à paraître dans le Journal of Wood and Technology : (1987), 7, 2,

- 106 R. MORCK (suède), C.H. CHEN (USA) communications personnelles.

- 107 S.N. SHOOLERY
Some quantitative applications of 13_C NMR spectroscopy.
Progress in NMR Spectroscopy : (1977), 11, 79-93.

- 108 S. GILLET
Analyse par résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 des coupes lourdes d'origine pétrolière. (1979) thèse de Docteur Ingénieur-Université de Nancy I.
- 109 D. ROBERT
Quantitative structural analysis of lignins by ^{13}C NMR.
Communication au Symposium Canadian de la chimie du bois à Niagara Falls (Canada). (1982)
- 110 D. R. ROBERT and G. BRUNOW
Quantitative estimation of hydroxyl groups in milled wood lignin from spruce and a dehydrogenation polymer from cariferyl alcohol using ^{13}C NMR spectroscopy. Holzforchung : (1984), 38, 85-90.
- 111 D. ROBERT, M. BARDET and D. GAGNAIRE
Some studies about quantitative structural changes in lignins traced by ^{13}C NMR.
International Symposium on Wood Pulping Chemistry. Tsukuba (Japan). (1983)
- 112 D. ROBERT, M. BARDET, G. GELLEROTEDT and E.L. LINDFORS.
Structural changes in lignin during kraft cooking. Part 3. on the structure of dissolved lignins.
Journal of Wood Chemistry and Technology : (1984), 4, 3, 239-263.
- 113 W. Mc FARLANE and D.S. RYCROFT
Multiple resonance. Annual reports on NMR Spectroscopy.
G.A. Editor academic press : (1985), 16, 293-364.
- 114 D.M. DODDRELL, D.T. PEGG and M.R. BENDALL
Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfer.
Journal of Magnetic Resonance : (1982), 48, 323-327.
- 115 R.B. BENDALL and D.T. PEGG
Complete accurate editing of decoupled ^{13}C spectra using DEPT and a quaternary-only sequence.
Journal of Magnetic Resonance : (1982), 53, 272-296.
- 116 A. BAX, R. FREEMAN, and T.A. FRENKIEL
An NMR technique for tracing out the carbon skeleton of an organic molecule.
Journal of the American Chemical Society : (1981), 103, 2102-2104.
- 117 D.L. TURNER
Carbon-13 autocorrelation NMR using double- quantum coherence.
Journal of Magnetic Resonance : (1982), 49, 175-178.

- 118 H.M. NIMZ, U. TSCHIRNER, M. STAKLE, R. LEHMANN and M. SCHLOSSER.
Carbon-13 NMR spectra of lignins, to comparison of structural units
in spruce and beech lignin.
Journal of Wood Chemistry and Technology : (1984), 4, 3, 265-284.
- 119 M.L. MARTIN, G.S. MARTIN and S.S. DELPUECH
Practical NMR spectroscopy. Heyden (1980). Basic Concepts, p.1-32.
- 120 R. BREWER et E. HAHN
La mémoire des atomes.
Pour la Science : (1985), 88, 68-76.
- 121 Réf. 119 Relaxation time determinations p. 244-290.
- 122 R. FREEMAN and H.D.W. HILL
Dynamic nuclear magnetic resonance.
L.M. Jackman and F.A. Eotton éditeurs : Academic Press. New-York
(1975) chapitre 5
- 123 P.H. BOLTON
Simplification of the proton magnetic resonance spectra of large
molecules such as proteins.
Journal of Magnetic Resonance : (1981), 45, 418-421.
- 124 J.Y. LALLEMAND
Utilisation d'impulsions 180° en RMN FT.
Ecole RMN - CNRS Strasbourg (1982)
- 125 C. LE COCQ and J.Y. LALLEMAND
Precise carbon-13 NMR multiplicity determination.
Journal of the Chemical Society. Chemical communications : (1981),
50-52.
- 126 P. FENG-KUI and R. FREEMAN
A simple scheme for determining multiplicity in carbon-13 NMR
spectra.
Journal of Magnetic Resonance : (1982), 48, 318-322.
- 127 D.J. COOKSENAND, and B.E. SMITH
Improved methods for assignments of multiplicity in ¹³C NMR spec-
troscopy with application to the analysis of mixture.
Organic Magnetic Resonance : (1981), 16, 2, 111-116.
- 128 D.M. DODDRELL and D.T. PEGG.
Assignment of proton decoupled carbon-13 spectra of complex
molecules by using polarization transfer spectroscopy. A superior
method to off-resonance decoupling.
Journal of the American Chemical Society : (1980), 102, 6388-6390.

- 129 G.A. MORRIS, and R. FREEMAN
Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer.
Journal of the American Chemical Society : (1979), 101, 760-762.

- 130 K. LUNDQUIST, N. PAXEUS, M. BARDET and D. ROBERT.
Structural characterization of aquatic humic substances by NMR spectroscopy.
Chemica Scripta : (1985), 25, 373-375.

- 131 D. ROBERT, G. GELLERSTEDT and M. BARDET.
Carbon-13 NMR analysis of lignins obtained after sulfonation of steam exploded aspen wood.
Nordic Pulp and Paper Research Journal, (1986), 1, 3, 18-25.

- 132 C. LAPIERRE, B. MONTIES, E. GUITTET and J.Y. LALLEMAND.
Photosynthetically ^{13}C -labelled poplar lignins : ^{13}C NMR experiments.
Holzforschung : (1984), 38, 333-342.

- 133 D. ROBERT
Marquage sélectif (^2H et ^{13}C) et étude par RMN ^1H et ^{13}C d'un précurseur de la lignine, l'alcool coniférylique et de son polymère le DHP, composé modèle de lignine.
(1977) thèse de doctorat ès-sciences Université Scientifique et Médicale de Grenoble.

- 134 D.C.C. SMITH P.
Hydroxybenzoate groups in lignin from aspen (populus tremula).
Journal of the American Chemical Society : (1955), 77, 2340-2351.

- 135 C. LAPIERRE, J.P. GAUDILLIERE, B. MONTIES, E. GUITTET, C. ROLANDO and J.Y. LALLEMAND.
Enrichissement photosynthétique en carbone treize de lignines de peuplier : caractérisation préliminaire par acidolyse et RMN ^{13}C .
Holzforschung : (1983), 37, 217-224.

- 136 F. FAIX and D. ROBERT : communication personnelle.

- 137 G. BRUNOW and K. LUNDQUIST. Comparison of a synthetic dehydrogenation polymer of coniferyl alcohol with milled wood lignin from spruce using ^1H NMR spectroscopy.
Papperi ja Puu : (1980), 11, 669-672.

- 138 E. GUITTET, J.Y. LALLEMAND, C. LAPIERRE and B. MONTIES.
Applicability of ^{13}C "INADEQUATE" experiment to lignin, a natural polymer.
Tetrahedron Letters : (1985), 26, 22, 2671-2674.

- 139 H.Y. HASSI, C.L. CHEN and J.S. GRATZL
Carbon-13 NMR characterization of lignosulfonates.
Tappi Research and Development Conference Proceedings, Appleton, WI, (1984).
- 140 M. HAUTEVILLE, K. LUNDQUIST and S.V. UNGE
 ^1H NMR spectroscopy investigation of the distribution of erythro and threo forms of β -O-4 structures in lignins.
Acta Chemica Scandinavica : (1986), B 40, 31-35.
- 141 W.V. GERASIMOWICZ, K.B. HIEKS, and P.E. PFEFFER.
Evidence for the existence of associated lignin. Carbohydrate polymers as revealed by carbon-13 CPMAS solid state NMR spectroscopy.
Macromolécules (1984), 17, 2597-2603.
- 142 K. LUNDQUIST, B. OHLSSON and R. SIMONSEN
Isolation of lignin by means of liquid-liquid extraction.
Svensk Papperstidning : (1977), 80, 5, 143-144.
- 143 G. EXCOFFIER, D. DUPEYRE et M. DURAND
Communication personnelle.
- 144 W. ZIMMEMANN, H. NIMZ and E. SEEMÜLLER
 ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopie Study of Extracts from cork's of Rubus idaeus, Solanum tuberosum and quercus suber.
Holzforschung : (1985, 39, 45-49
- 145 J.N. SMOOLERY
Some applications of high resolution nuclear magnetic resonance to the study of lipids.
AOCS Monography : (1983), 10, 220-240
- 146 M. BARDET and D. ROBERT
Structural changes in lignin degradation during steam hydrolysis of an aspen wood.
International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vancouver (Canada) : (1985)
- 147 D. ROBERT, M. BARDET and D. GAGNAIRE
Recent progress in liquid and solid state NMR analysis of lignins : application to the study of lignins from exploded wood.
International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Paris : (1987)
- 148 K. LUNDQUIST
Low molecular weight lignin hydrolysis products
Applied Polymer Symposium : (1976), 28, 1393-1407.

- 149 G. GELLERSTEDT and J. GIERER
The reactions of lignin during neutral sulfate pulping. Part VIII, sulfenic acids isolated after treatment of spruce wood meal with neutral sulfite.
Acta Chemica Scandinavica : (1977), B 31, 729-730.

- 150 G. GELLERSTEDT and J. GIERER The reactions of lignin during neutral sulfate cooking part I. the behaviour of β -Arylether structures.
Acta Chemica Scandinavica : (1968), B 22, 2510-2518.

- 151 G. GELLERSTEDT and J. GIERER
The reactions of lignins during acidic sulfite pulping.
Svensk Papperstidning : (1971), 74, 5, 117-127.

- 152 T.N. SOUNDARARAJAN and M. WAYMAN.
The determination of the molecular weight and molecular weight distribution of dehydrogenase polymers of coniferyl alcohol and lignins.
Journal of Polymer Science, part C, (1970), 30, 521-531.

- 153 T.M. OBIAGA and M. WAYMAN
Improved calibration procedure for gel permeation chromatography of lignins
Journal of Applied Polymer Science : (1974), 18, 1943-1952.

- 154 S. PELINEN and M. SALKINOJA-SALOMEN
High performance size exclusion chromatography of lignins and its derivatives.
Journal of Chromatography : (1985), 328, 299-308.

- 155 K. LUNDQUIST and B. WEESLEN
Gel filtration of lignin model compounds.
Acta chemica scandinavica : (1975), B 25, 5, 1920-1922.

- 156 P. KRISTERSSON, K. LUNDAUIST, R. SIMONSEN, and K. TINGSVIK.
Gel permeation chromatography of lignin carbohydrate compounds.
Holzforschung : (1983), 37, 51-53.

- 157 C. LAPIERRE
Hétérogénéité des lignines de peuplier : mise en évidence systématique.
(1986). Thèse de doctorat d'état, Université de Paris Sud centre d'Orsay.

- 158 H. ERDTMAN
Moderne methoden der pflanzenanalyse
K. Paech and M.V. Tracey éditeurs. Springer-Berlin : (1955), vol 3, p. 428.

- 159 S. OMORI and A. SAKAKIBARA
Isolation of new dimeric and trimeric compounds with lignan type linkages from hydrolysis products of hardwood lignin.
Mokuzai Gakkaishi : (1974), 20, 1, 48-49

- 160 C.K. ATAL, K.L. DHAR and A. PELTER.
Isolation and structure determination of (+) diaeudesmin, the first naturally occurring diascially substituted 3,7-Dioxabicyclo (3,3,0) octane lignan.
Journal of the Chemical Society (C) : (1967), 2228-2230.

- 161 F. NAKATSUBO, M. TANAHASHI and T. HIGUEHI
Acidolysis of Bamboo lignin II,
Wood Research : (1972), 53, 9-18.

- 162 E. HASLAM
The stereochemistry of jesamolín
Journal of the Chemical Society (C) : 2332-2334.

- 163 A. PELTER, R.S. WARD, E.V. RAO and K.V. SASTRY.
Revised structures for pluviatitol, methyl pluviatitol and xanthoxylol. General methods for the assignments for the stereochemistry to 2,6-Diaryl-3,7-Dioxabicyclo (3,3,0) octane lignans.
Tetrahedron : (1976), 32, 2783-2788.

- 164 K. LUNDQUIST and L. ERICSON
Acid degradation of lignin. III formation of formaldehyde.
Acta Chemica Scandinavica : (1970), N° 24, 3681-3686.

- 165 D. ROBERT, M. BARDET C. LAPIERRE et G. GELLERSTEDT
Structural changes in Aspen lignin during steam explosion
soumis à publication au Journal of Wood and Technology.

- 166 Y. SANO
Hydrolysis of lignin with dioscape and water. Hydrolysis of some model compounds.
Mokuzai Gakkaishi (1976), 22, 9, 526-531

- 167 Y. SANO
Hydrolysis of lignin with dioxane and water. Degradation of some model compounds.
Mokuzai Gakkaishi (1977), 23, 10, 487-493

- 168 K. LUNDQUIST, G.E. MIKSCHÉ, L. ERICSSON and L. BERNDTSON
Über das vorkommen von glyceraldehyd-2-Arylätherstrukturen im lignin.
Tetrahedron Letters : (1967), 46, 4587-4591.

- 169 Hydrolyse flash et separation sélective des constituants du bois.
Rapport de fin de contrat, contrat public n° 126, document CTP
N°1187.
Centre Technique du Papier, Grenoble, septembre 1984.
- 170 M.P. STEVENS
Polymer chemistry. An introduction.
Addison Wesley, Publishing compagny : (1975)
Phenol urea and melanine formaldehyde polymers. p. 319-331
- 171 M. DESTOISIEN
Contribution à l'étude du comportement des lignines dans des
formulations de polyacéthanes
(1984) Thèse de docteur-Ingénieur. Université Scientifique et
Médicale de Grenoble.
- 172 W.G. GLASSER, O.H.H. HSU, D.L. REED, R.C. FORTE and L.C.F. WU
Lignin-derived polyols, polyisocyanates, and polyurethanes.
American Chemical Society Symposium Series, Urethane Chemistry and
Applications : (1981), 172, 311-338/
- 173 L.C.F. WU and W.G. GLASSER
Engineering plastics from lignin. I. Synthesis of hydroxypropyl
lignin.
Journal of Applied Polymer Science : (1984), 29, 1111-1123.
- 174 W.G. GLASSER, C.A. BARNETT, T.G. RIALS and V.P. SARAF.
Engineering plastics from lignin. II characterization of hydroxy-
alkyl lignin derivatives.
Journal of Applied Polymer Science : (1984), 29, 1815-1830.
- 175 V.P. SARAF and W.G. GLASSER
Engineering plastics from lignin. III structure property relation-
ships in solution East polyurethane films.
Journal of Applied Polymer Science : (1984) 29, 1831-1841.
- 176 V.P. SARAF, W.G. GLASSER, G.L. WILKES and J.E. Mc GRATH.
Engineering plastics from lignin. VI structure. Property
relationships of PEG. Containing polyurethane networks.
Journal of Applied Polymer Science : (1985), 30, 2207-2224.
- 177 A.J. GORDON and R.A. RICHARD
The Chemist's Companion. A Handbook of Practical Data, Techniques
and References
(1972) Wiley-Interscience Publications, p. 437.
- 178 B. COQ, C. GONNET and J.L. ROCCA
Techniques de remplissage de colonnes de chromatographie liquide à
haute pression avec des microparticules poreuses.
J. of Chromatography (1975), 106, 249-262

- 179 C. NICOTRA, J.SERSE, D. ROBERT, M. BARDET et K. LUNDQUIST
Etude analytique par couplage CPG capillaire. Spectrométrie de masse des fractions "monomère" et "dimère" des lignines issues du bois de peuplier après autohydrolyse rapide.
Rapport Technique n° 84-586, Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble.

- 180 L.L. LANDUCCI, S.A. GEDDES et T.K. KORK
Synthesis of ^{14}C labeled 3-methoxy-4 hydroxy- (2-methoxy-phenoxy)- -hydroxypropiophenone, a lignin model compound.
Holzforschung (1081) 35, 66-69.

- 181 D.R. DIMMEL and D. SHEPART
Synthesis of lignin model dimers by novel techniques.
Journal of Wood Chemistry and Technology (1982), 2(3), 297-315.

- 182 J. RALPH and R. YOUNG
Stereochemical aspects of additions reactions involving lignin model quinone methides.
Journal of Wood Chemistry and Technology (1983), 3(2), 161-181.

- 183 T.K. KIRK, W.J. CONNORS, R.D. BLEAM, W.F. MACKETT and J.G. ZEIKUS
Preparation and microbial decomposition of synthetic ^{14}C lignins.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (1975), 72, 2515-2519.

- 184 ASPECT 2000. System software Manual.
D I S N M R P, version 83071,
Copyright 1983 Bruker Instrumentation incorporation.

AUTORISATION DE SOUTENANCEDOCTORAT D'ETAT

Vu les dispositions de l'Article 5 de l'Arrêté du 16 avril 1974,

Vu les rapports de M....D. GAGNAIRE.....

M....J.J. DELPUECH.....

M....F. PLA.....

M. Michel BARDET..... est autorisé à
présenter une thèse en soutenance pour l'obtention du grade de
DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES.

Fait à Grenoble, le 15 JUIN 1987

Le Président de l'I.N.P.G.

Georges LESPINARD
Président
de l'Institut National Polytechnique
de Grenoble

P.O. le Vice-Président.

Le Président de l'U.S.T.M.G.



Le Président

J.J. PAYAN

RÉSUMÉ

Les modifications structurales de la lignine de bois de Populus tremuloïdes traité par autohydrolyse rapide ont été établies, d'une part par une étude générale qualitative et quantitative en RMN du carbone treize, et d'autre part par une étude plus spécifique des composés de faible masse moléculaire, isolés des lignines extraites.

La RMN appliquée à l'étude structurale de lignines, macromolécules sans unités répétitives bien définies, a fait l'objet d'une étude particulière, plus précisément dans l'utilisation des séquences multi-impulsionnelles à une dimension (DEPT) et à deux dimensions (2D INADEQUATE). L'apport de la séquence DEPT, notamment dans son développement quantitatif, est démontré par l'étude structurale comparative de lignines d'origine taxonomique diverse, extraites de bois moulu (lignines MWL d'angiospermes et gymnospermes) et de lignines artificielles, DHP, synthétisées à partir d'alcool coniférylique.

La chromatographie sur gel perméable et la spectroscopie infrarouge ont également été utilisées.

Mots clés :

Lignines : structure et modifications chimiques

Autohydrolyse rapide du bois

Biomasse

Lignines MWL, DHP

RMN haute résolution du carbone treize :

- qualitative
- quantitative
- multiimpulsionnelle (DEPT-INADEQUATE)

Chromatographie sur gel perméable

Spectroscopie infrarouge.